

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Optimización de cepas bacterianas aisladas de los arrozales de las Marismas del Guadalquivir para su aplicación en la síntesis biotecnológica de precursores de polímeros utilizados en la fabricación de bioplásticos.

MARÍA FERNÁNDEZ GÓMEZ

SEVILLA 2016

1. INTRODUCCIÓN	pág. 1
1.1. LOS PLÁSTICOS	pág. 1
1.2. LOS BIOPLÁSTICOS	pág. 6
1.2.1. Monómeros producidos por vía biotecnológica	pág. 7
1.2.1.1. 2,3-butanodiol	pág. 8
1.2.2. Poliuretano	pág. 10
1.3. BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA	pág. 11
1.3.1. Microbiología industrial	pág. 12
1.3.2. Manipulación de vías metabólicas para la sobreproducción de bioproductos de interés industrial	pág. 14
1.4. UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOPRODUCTOS	pág. 16
1.4.1. Cáscara de naranja	pág. 17
1.4.2. Pulpa de remolacha	pág. 18
1.4.3. Desechos de piña	pág. 19
1.5. FAMILIA BACTERIANA ENTEROBACTERIACEAE	pág. 20
1.5.1. Descripción de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	pág. 20
1.5.2. Patogenia de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	pág. 20
1.5.3. Fermentación en la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	pág. 23
1.5.4. Obtención de bioproductos por enterobacterias	pág. 23
1.5.5. Asociación a plantas en enterobacterias	pág. 24
1.6. LA PLANTA DE ARROZ COMO FUENTE DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO	pág. 25
1.7. CULTIVO DE ARROZ EN LAS MARISMAS DEL GUADALQUIVIR	pág. 26
2. OBJETIVOS	pág. 26
3. MATERIAL Y MÉTODOS	pág. 27
3.1. MUESTREO Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS	pág. 27
3.1.1. Toma de muestras	pág. 27
3.1.2. Tratamiento de muestras	pág. 28
3.1.2.1. Tratamiento de muestras de suelo rizosférico	pág. 28
3.1.2.2. Tratamiento de muestras de raíz y parte aérea	pág. 29
3.2. MEDIOS DE CULTIVO	pág. 29

3.3. SOLUCIONES TAMPÓN	pág. 32
3.4. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS	pág. 32
3.5. MÉTODOS DE AISLAMIENTO	pág. 33
3.6. MATERIAL BIOLÓGICO	pág. 33
3.6.1. Cepas bacterianas	pág. 33
3.6.2. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas	pág. 34
3.6.3. Plásmidos	pág. 34
3.7. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ADN	pág. 35
3.7.1. Extracción de ADN genómico	pág. 35
3.7.2. Extracción de ADN plasmídico	pág. 35
3.7.3. Determinación de la concentración y pureza del ADN	pág. 36
3.7.4. Amplificación de ADN mediante PCR	pág. 36
3.7.4.1. PCR	pág. 36
3.7.4.2. PCR fingerprinting	pág. 37
3.7.4.3. Primers utilizados	pág. 37
3.7.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	pág. 37
3.7.6. Secuenciación de ADN	pág. 38
3.7.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción	pág. 38
3.7.8. Ligación de fragmentos de restricción	pág. 38
3.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	pág. 38
3.9. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO	pág. 39
3.9.1. Conjugación	pág. 39
3.9.2. Transformación	pág. 39
3.9.3. Recombinación homóloga	pág. 40
3.10. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	pág. 40
3.10.1. Características morfológicas	pág. 40
3.10.1.1. Características macroscópicas	pág. 40
3.10.1.2. Morfología	pág. 40
3.10.2. Características fisiológicas	pág. 41
3.10.2.1. Crecimiento	pág. 41
3.10.2.2. Tolerancia a diversos factores	pág. 42
3.10.3. Pruebas bioquímicas	pág. 43
3.10.3.1. Prueba oxidasa	pág. 43

3.10.3.2. Prueba catalasa	pág. 43
3.10.3.3. Pruebas IMViC	pág. 43
3.10.3.4. Batería de pruebas API 20E	pág. 45
3.10.3.5. Producción de ácido y gas a partir de carbohidratos	pág. 45
3.10.3.6. Determinación de actividades enzimáticas	pág. 46
3.10.3.6.1. Medida de actividad enzimática BDH	pág. 47
3.10.3.6.2. Medida de actividad enzimática GAPDH	pág. 48
3.10.3.6.3. Medida de actividad enzimática LDH	pág. 48
3.11. SENSIBILIDAD FRENTE A ANTIBIÓTICOS	pág. 49
3.12. OBTENCIÓN DE 2,3-BDO	pág. 50
3.12.1. Ensayo de producción de 2,3-BDO mediante fermentación	pág. 50
3.12.2. Recuperación de metabolitos resultantes de la fermentación	pág. 50
3.13. OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES	pág. 50
3.13.1. Pre-tratamiento de los residuos	pág. 50
3.13.2. Hidrólisis ácida	pág. 50
3.13.3. Hidrólisis enzimática	pág. 51
3.13.4. Autohidrólisis	pág. 51
3.13.5. Detoxificación de los hidrolizados	pág. 51
3.14. MÉTODOS ANALÍTICOS	pág. 51
3.14.1. Cuantificación de metabolitos resultantes de la fermentación	pág. 51
3.14.1.1. Cuantificación mediante cromatografía	pág. 51
3.14.1.2. Cuantificación por método enzimático	pág. 52
3.14.2. Cuantificación de sacarosa	pág. 52
3.14.2.1. Cuantificación por cromatografía	pág. 52
3.14.2.2. Cuantificación por refractometría	pág. 53
3.14.2.3. Cuantificación de la concentración celular	pág. 53
3.15. ADHESIÓN A CÉLULAS AUCARIOTAS	pág. 54
4. RESULTADOS	pág. 55
4.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS	pág. 55
4.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	pág. 56

4.2.1. Identificación por secuenciación del gen ARN ribosomal 16S (ADNr 16S)	pág. 56
4.2.2. Identificación por PCR fingerprinting (huella genética)	pág. 58
4.3. SELECCIÓN DE UNA CEPA PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO	pág. 59
4.3.1. Screening de producción de 2,3-BDO de las cepas seleccionadas	pág. 59
4.3.2. Utilización de carbohidratos	pág. 60
4.3.3. Caracterización de la cepa <i>E. aerogenes</i> SC10	pág. 62
4.3.3.1. Caracterización fenotípica	pág. 62
4.3.3.2. Pruebas bioquímicas	pág. 63
4.3.3.3. Sensibilidad frente a antibióticos	pág. 64
4.3.3.4. Crecimiento	pág. 64
4.3.3.5. Producción de 2,3-BDO	pág. 66
4.4. MEJORA DE LA CEPA <i>E. aerogenes</i> SC10 PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO	pág. 67
4.4.1. Sobreproducción de 2,3-BDO mediante modificación de vías implicadas en la producción de metabolitos en la ruta metabólica de síntesis de este compuesto	pág. 67
4.4.1.1. Modificación de la vía metabólica de síntesis de lactato	pág. 68
4.4.1.1.1. <i>Efecto de la síntesis de lactato en la producción de 2,3-BDO en <i>E. aerogenes</i></i>	pág. 68
4.4.1.1.2. <i>Estudio in silico del gen codificante de la enzima lactato deshidrogenasa (<i>ldhA</i>)</i>	pág. 69
4.4.1.1.3. <i>Obtención de una cepa con interrupción del gen <i>ldhA</i></i>	pág. 69
4.4.1.2. Modificación de la vía metabólica de oxidación de gliceraldehído-3-fosfato	pág. 71
4.4.1.2.1. <i>Efecto de la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato en la producción de 2,3-BDO en <i>E. aerogenes</i></i>	pág. 71
4.4.1.2.2. <i>Estudio in silico del gen codificante de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>gapA</i>)</i>	pág. 73
4.4.1.2.3. <i>Obtención de una cepa con sobreexpresión del gen <i>gapA</i></i> ...	pág. 73
4.4.1.3. Modificación de la vía metabólica de reducción de acetoína	pág. 74
4.4.1.3.1. <i>Efecto de la reducción de acetoína en la producción de 2,3-BDO en <i>E. aerogenes</i></i>	pág. 74
4.4.1.3.2. <i>Estudio in silico del gen codificante de la enzima acetoína reductasa/butanodiol deshidrogenasa (<i>bdh</i>)</i>	pág. 75
4.4.1.3.3. <i>Obtención de una cepa con sobreexpresión del gen <i>bdh</i></i>	pág. 76

4.4.1.4. Obtención de cepas con modificación de varios genes	pág. 77
4.4.1.4.1. Doble sobreexpresión de los genes <i>bdh</i> y <i>gapA</i>	pág. 77
4.4.1.5. Caracterización de las cepas mutantes obtenidas	pág. 78
4.4.1.5.1. Estudio de crecimiento	pág. 78
4.4.1.5.2. Estudio de utilización de carbohidratos	pág. 80
4.4.1.5.3. Estudio de tolerancia a distintos factores	pág. 80
4.4.1.5.4. Estudio de actividades enzimáticas	pág. 85
4.4.1.6. Estudio de producción de 2,3-BDO por las cepas mutantes	pág. 86
4.4.1.6.1. Optimización de las condiciones de producción de 2,3- BDO en <i>E. aerogenes</i>	pág. 86
4.4.1.6.2. Ensayo de producción de 2,3-BDO por las cepas mutantes	pág. 90
4.5. UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3- BDO	pág. 94
4.5.1. Caracterización de residuos agroindustriales	pág. 94
4.5.2. Obtención de azúcares fermentables a partir de residuos agroindustriales	pág. 94
4.5.3. Detoxificación de los residuos	pág. 97
4.5.4. Ensayos de crecimiento	pág. 98
4.5.5. Producción de 2,3-BDO a partir de los residuos	pág. 98
4.6. OBTENCIÓN DE CEPAS SEGURAS PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO	pág. 99
4.6.1. Estudio <i>in silico</i> de los genes de síntesis de fimbrias	pág. 100
4.6.2. Obtención de una cepa con interrupción del gen <i>fimD</i>	pág. 100
4.6.3. Caracterización de las fimbrias en las cepas con interrupción del gen <i>fimD</i>	pág. 103
4.6.3.1. Caracterización fenotípica de las cepas con delección de las fimbrias	pág. 103
4.6.3.2. Ensayo de adhesión a células eucariotas	pág. 104
4.6.3.3. Estudio de efectos en el crecimiento	pág. 104
4.6.3.4. Estudio de efectos en la producción de 2,3-BDO	pág. 104
5. DISCUSIÓN	pág. 105
6. CONCLUSIONES	pág. 119
7. BIBLIOGRAFÍA	pág. 121

Índice de tablas

- Tabla 1.** Principales productos microbianos de interés en microbiología industrial y biotecnología.
- Tabla 2.** Antibióticos utilizados en este trabajo.
- Tabla 3.** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.
- Tabla 4.** Plásmidos utilizados en este trabajo.
- Tabla 5.** Primers utilizados en este trabajo.
- Tabla 6.** Programas bioinformáticos utilizados en este trabajo para el análisis de ADN.
- Tabla 7.** Diferentes aspectos tenidos en cuenta para determinar la morfología de las colonias bacterianas.
- Tabla 8.** Cepas aisladas a partir de las diferentes zonas de muestreo.
- Tabla 9.** Cepas seleccionadas y similitud con especies de la base de datos según secuenciación del ADNr 16S.
- Tabla 10.** Datos de producción de 2,3-BDO a las 24 h de cultivo de las especies aisladas.
- Tabla 11.** Resultados de prueba de utilización de glucosa y sacarosa.
- Tabla 12.** Características macroscópicas de la cepa *E. aerogenes* SC10 y la cepa de referencia *E. aerogenes* CECT 684^T.
- Tabla 13.** Sensibilidad a distintos antibióticos de las cepas *E. aerogenes* SC10 y *E. aerogenes* CECT 684^T.
- Tabla 14.** Resultados de utilización de diversos carbohidratos por parte de la cepa silvestre y mutantes de *E. aerogenes* SC10.
- Tabla 15.** Azúcares obtenidos mediante tratamientos de hidrólisis de los distintos residuos.
- Tabla 16.** Cuantificación de azúcares de autohidrolizado de naranja antes y después de su detoxificación.
- Tabla 17.** Crecimiento de la cepa *E. aerogenes* SC10 medios de cultivo preparados a partir de residuos.

- Fig. 1.** Momificación utilizando polímeros naturales en el antiguo Egipto.
- Fig. 2.** Evolución de la producción mundial de plásticos en los últimos años.
- Fig. 3.** Proceso de fabricación de plástico a partir de petróleo.
- Fig. 4.** Gránulos de poliéster en células de *Bacillus megaterium*.
- Fig. 5.** Esteroisómeros del 2,3-BDO.
- Fig. 6.** Esquema de la ruta microbiana de síntesis de 2,3-BDO a partir de piruvato.
- Fig. 7.** Proceso industrial de obtención de zumo y subproductos a partir de naranja.
- Fig. 8.** Proceso industrial de obtención de azúcar y subproductos a partir de remolacha.
- Fig. 9.** Proceso industrial de obtención de pulpa de piña.
- Fig. 10.** Adhesión de enterobacteria a célula huésped a través de fimbrias tipo I (Mulvey et al., 1998).
- Fig. 11.** Planta de arroz.
- Fig. 12.** Cultivo de arroz sano (izquierda) y cultivo afectado por Akegare (derecha).
- Fig. 13.** Marismas del Guadalquivir, cultivo de arroz.
- Fig. 14.** Situación de las diferentes zonas de recogida en las marismas del Guadalquivir y de las unidades de cultivo o tablas (T1, T2, T3) dentro de cada zona de recogida; Los Pobres (A), Hato Ratón (B) y La Compañía (C). Imagen obtenida a partir de plano de GoogleEarth (<http://earth.google.com>).
- Fig. 15.** Toma de muestras de plantas de arroz.
- Fig. 16.** Distintas divisiones de la planta de arroz: tallos y hojas (TH), raíces (R) y suelo rizosférico (S).
- Fig. 17.** Patrón de crecimiento bacteriano típico. Parámetros para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento.
- Fig. 18.** Resultados para la prueba de rojo fenol.
- Fig. 19.** Esquema de obtención de extracto libre de células a partir de cultivo bacteriano.
- Fig. 20.** Reacción catalizada por la enzima butanodiol deshidrogenasa.
- Fig. 21.** Reacción catalizada por la enzima gliceraldehído-3-P deshidrogenasa.
- Fig. 22.** Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa.
- Fig. 23.** Distribución porcentual de las cepas aisladas agrupadas por género.
- Fig. 24.** Perfiles obtenidos a partir de la PCR-ERIC, agrupados por aislados pertenecientes a la misma especie (a) y gráficas obtenidas a partir de los patrones de bandas mediante el programa ImageJ (b)

- Fig. 25.** Aspecto de las colonias de la cepa *E. aerogenes* SC10 y la cepa de referencia *E. aerogenes* CECT 684^T sembradas en medio TSA (imágenes **a** y **b**) y medio MacConkey (imágenes **c** y **d**).
- Fig. 26.** Microfotografía de las cepas *E. aerogenes* SC10 y *E. aerogenes* CECT 684^T teñidas mediante tinción Gram (**a**) y tinción negativa (**b**).
- Fig. 27.** Curvas de crecimiento en medio TSB (**a**) y medio EA suplementado con sacarosa (**b**).
- Fig. 28.** Producción de 2,3-BDO a las 24 h de la cepa de estudio *E. aerogenes* SC10 y la cepa de referencia *E. aerogenes* CECT 684^T en cultivo con medio EA y 90 g/L de sacarosa.
- Fig. 29.** Ruta metabólica de síntesis de 2,3-BDO en *E. aerogenes* (Jung *et al.*, 2012).
- Fig. 30.** Esquema del metabolismo del piruvato en *E. aerogenes*. En rojo, señalada enzima lactato deshidrogenasa (código EC:1.1.1.28 según nomenclatura IUBMB), responsable de la conversión de piruvato a D-lactato.
- Fig. 31.** Contexto genómico del gen *ldhA* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011).
- Fig. 32.** Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con interrupción del gen *ldhA*.
- Fig. 33.** Esquema del metabolismo de la glucosa en *E. aerogenes*. En rojo, señalada enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (código EC:1.2.1.12 según nomenclatura IUBMB), responsable de la conversión de G3P a 1,3-PG.
- Fig. 34.** Contexto genómico del gen *gapA* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011).
- Fig. 35.** Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con sobreexpresión del gen *ldhA*.
- Fig. 36.** Esquema del metabolismo del butanoato en *E. aerogenes*. En rojo, señalada enzima acetoína reductasa (código EC:1.1.1.76, 1.1.1.304 y 1.1.1.- según nomenclatura IUBMB), responsable de la conversión de acetoína a 2,3-BDO.
- Fig. 37.** Contexto genómico del gen *bdh* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011).
- Fig. 38.** Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con sobreexpresión del gen *bdh*.
- Fig. 39.** Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con sobreexpresión de los genes *bdh* y *gapA*.
- Fig. 40.** Curvas de crecimiento obtenidas para las distintas cepas en medio EA suplementado con sacarosa.
- Fig. 41.** Velocidades específicas en la primera y segunda fase exponencial (μ_1 y μ_2) de la curva de crecimiento diáuxico de las diferentes cepas de estudio.
- Fig. 42.** Tolerancia a distintas temperaturas de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.

- Fig. 43.** Tolerancia a distintas concentraciones de sacarosa de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.
- Fig. 44.** Tolerancia a distintas concentraciones de 2,3-BDO de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.
- Fig. 45.** Tolerancia a distintos valores de pH de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.
- Fig. 46.** Actividad enzimática BDH en las cepas con sobreexpresión del gen *bdh*.
- Fig. 47.** Actividad enzimática GAPDH en las cepas con sobreexpresión del gen *gapA*.
- Fig. 48.** Actividad enzimática LDH en las cepas con interrupción del gen *ldhA*.
- Fig. 49.** Crecimiento y producción de 2,3-BDO en los medios de cultivo TSB, EA y SRT.
- Fig. 50.** Crecimiento y producción de 2,3-BDO en medio de cultivo con y sin extracto de levadura (A y B) a las 24 h.
- Fig. 51.** Relación biomasa/2,3-BDO en cultivos de 24 h de *E. aerogenes*.
- Fig. 52.** Evolución de la concentración de 2,3-BDO por *E. aerogenes* a diferentes horas de cultivo.
- Fig. 53.** Evolución del consumo de sacarosa y producción de 2,3-BDO por las cepas de estudio a lo largo del cultivo.
- Fig. 54.** Concentraciones obtenidas para los principales metabolitos producidos en la ruta de síntesis de 2,3-BDO por la cepa silvestre y mutantes.
- Fig. 55.** Productividad y rendimiento de la producción de 2,3-BDO obtenidos para las distintas cepas del estudio.
- Fig. 56.** Placas de TLC en las que se aprecian disacáridos (D), monosacáridos (M) y polisacáridos (P) provenientes de residuos de naranja, piña y remolacha.
- Fig. 57.** Rendimientos en % obtenidos para la autohidrólisis (1), hidrólisis enzimática (2) e hidrólisis ácida (3) de los distintos residuos tratados.
- Fig. 58.** Producción de 2,3-BDO a partir de residuos de naranja y piña.
- Fig. 59.** Contexto genómico del cluster *fim* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynthe. Las regiones promotoras se indican con flechas grises.
- Fig. 60.** Estrategia utilizada para inserción del sitio de restricción *XhoI* mediante mutagénesis dirigida por PCR
- Fig. 61.** Estrategia utilizada para la interrupción del gen *fimD*.
- Fig. 62.** Curvas de crecimiento en medio de cultivo TSB.

a.C.	antes de Cristo
A₂₃₀	absorbancia medida a 230 nm
A₂₆₀	absorbancia medida a 260 nm
A₂₈₀	absorbancia medida a 280 nm
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
Amp^R	fenotipo de resistencia a ampicilina
ANAIP	Asociación Española de Industriales del Plástico
ASPO	<i>Association for the Study of Peak Oil and Gas</i>
BDBGP	<i>Berkeley Drosophila Genome Project</i>
BDH	enzima butanodiol deshidrogenasa
BDO	butanodiol
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
c.s.p.	cantidad suficiente para
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DO₆₀₀	densidad óptica medida a 600 nm
EE.UU.	Estados Unidos
ERIC	<i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
FEDIT	Federación Española de Entidades de Innovación y Tecnología
Fig.	figura
g	gramos
G3P	gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Gm^R	fenotipo de resistencia a gentamicina
h	hora
HMF	hidroximetil furfural
IEA	<i>International Energy Agency</i>
IMViC	pruebas Indol Rojo de Metilo Voges-Proskauer Citratos
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
Kb	kilobase
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Km^R	fenotipo de resistencia a kanamicina
L	litro

<i>lacZ</i>	gen que codifica la enzima β -galactosidasa
LB	medio Luria-Bertani
LDH	enzima lactato deshidrogenasa
M	molar
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
μL	microlitro
μm	micrómetro
μmol	micromol
mM	milimolar
mob⁺	fenotipo de plásmido mobilizable
Mt	millón de toneladas
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
nd	no detectado
nm	nanómetro
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PBT	poliéster poli(tereftalato de butilenglicol)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PG	bifosfoglicerato
PGPB	plant growth promoting bacteria
PLA	poli(ácido láctico)
PTT	poli(tereftalato de trimetilenglicol)
PVC	policloruro de vinilo
r.p.m.	revoluciones por minuto
Sac^R	fenotipo de resistencia a sacarosa
SOB	super optimal broth
Taq	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tampón (Tris, borato, EDTA)
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
Tra⁺	fenotipo de plasmido conjugativo
TSA	<i>trypticase soy agar</i>
TSB	<i>trypticase soy broth</i>
U	unidad de actividad enzimática
UFC	unidad formadora de colonias

UNE-EN	Una Norma Española-Estándar Europeo
UV	ultravioleta
V	voltio
W	vatio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galacto-piranosido

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS PLÁSTICOS

El plástico es el primer material sintético creado por el hombre, aunque antes de su aparición, ya se utilizaban algunos polímeros naturales, como el betún, la goma y el ámbar. Se tienen referencias del uso de estos materiales hacia el año 2000 a.C. en Egipto (**figura 1**) y Babilonia, para diversas aplicaciones, desde la fabricación de artículos rituales hasta la impregnación de los muertos para su momificación (García, 2009).



Figura 1. Momificación utilizando polímeros naturales en el antiguo Egipto.

Los plásticos son compuestos con forma de cadena, conocidos químicamente como polímeros, formados por la unión de moléculas más pequeñas denominadas monómeros. El nombre común de plásticos se debe a la propiedad que tienen de ser deformables por plasticidad (frente a la elasticidad), bajo la influencia del calor, la presión o de ambos a la vez. Este término abarca productos que difieren entre sí por su estructura química, sus propiedades físicas, sus aplicaciones prácticas y sus procesos de fabricación (Elías, 2000).

En función de su procedencia los plásticos pueden clasificarse en:

- **Naturales:** se obtienen directamente de materias primas vegetales como resinas, almidón, fibras de madera, algodón, cáñamo o aceites de semillas, o materias primas animales como la caseína de la leche.
- **Sintéticos (artificiales):** se elaboran a partir de compuestos derivados de petróleo, gas natural o carbón.

En la actualidad, la mayoría de los plásticos comercializados, al igual que la mayoría de productos químicos de gran volumen, pertenecen al segundo grupo, y son obtenidos a partir de petróleo.

El primer plástico semisintético, obtenido por transformación de polímeros naturales, fue el nitrato de celulosa, descubierto a finales de la década de 1850, y presentado como primer plástico del mundo por su inventor, Alexander Parkes. Se comercializó con los nombres de *Parkesina* y *Xylonita*, aunque su desarrollo comercial fue escaso.

La comercialización se impulsó más tarde gracias a la fabricación de bolas de billar en Estados Unidos con este material en sustitución del marfil (datos de PlasticsEurope).

En 1907 el químico neoyorquino Leo Baekeland patenta el primer plástico realmente sintético, la baquelita, que se utilizó en el desarrollo de las nuevas tecnologías, con aplicaciones como carcasas de teléfonos y radios. En los años posteriores se sucede otra serie de descubrimientos, entre ellos el del celofán y el PVC.

El desarrollo de los plásticos modernos se vio impulsado en 1922 a partir de la entrega del Premio Nobel al químico alemán Staudinger. Posteriormente, la Segunda Guerra Mundial supuso un fuerte estímulo para la investigación en el campo de los plásticos, ya que se produjo la necesidad de encontrar sustitutos a los materiales tradicionales, de los cuales había falta de suministro.

En 1940, se inician la industrialización y la comercialización de los plásticos, favorecidas por el bajo coste del petróleo en esa época, y a principios de los años 70 los plásticos son ya los materiales más utilizados en todo el mundo (datos de la Asociación Española de Industriales del Plástico (ANAIP)).

Hoy en día, los plásticos reemplazan ya a la mayoría de materiales tradicionales como la madera, el metal, el vidrio, y el papel. Esto es debido a que poseen propiedades como facilidad de manipulación, bajo peso, durabilidad y resistencia a la corrosión, que a su vez hacen que su uso sea más económico frente a otros materiales (Kuhlke y Walsh, 2002).

Entre los usos más representativos de los plásticos se encuentran los siguientes (Domenech, 1994):

- Industria médica y sanitaria: lentes de contacto, prótesis, instrumental.
- Industria del automóvil y otros medios de transporte: carrocerías y piezas.
- Industria del envase y embalaje: bolsas, recipientes, cajas, bandejas.
- Industria de la construcción: ventanas, puertas, revestimientos, cañerías, aislantes, tanques.
- Industria textil: tejidos industriales y telas para confección de prendas de vestir.
- Electricidad y electrónica: cables, piezas para teléfonos móviles, etc.
- Deporte y ocio: ropa, zapatillas, balones, equipos de seguridad, etc.

- Agricultura: tuberías, macetas, contenedores, invernaderos, etc.
- Industrias varias dedicadas a la fabricación de artículos para el hogar: muebles, juguetes, elementos para cocina y baño, electrodomésticos, etc.

Observando los datos de producción mundial de plásticos, podría decirse que estos materiales han inundado nuestra vida cotidiana:

- La producción mundial de plásticos pasó de 1,5 millones de toneladas (Mt) al año en 1950 a 299 Mt en 2013, de los que sólo en Europa se produjeron 64 Mt.
- El consumo anual mundial de plásticos sintéticos experimenta un incremento anual de entre un 3 y un 15 % (**figura 2**).
- La producción durante los últimos diez años ha sido equivalente a la de todo el siglo XX.
- Se calcula que en 2020 se comercializarán en la UE 66,5 Mt de plástico y que la producción mundial de plásticos podría triplicarse de aquí a 2050 (Libro verde, Comisión Europea).



Figura 2. Evolución de la producción mundial de plásticos en los últimos años. Modificado de PlasticsEurope (2015).

Centrándonos en España, en nuestro país se consumen un total de 115 kilos de plástico por persona y año, por lo que el sector de los plásticos tiene una importancia notable en la economía española. Lo confirman datos de la Asociación Española de Industriales de Plásticos (ANAIP), considerando este sector en España un sector en alza que representa el 2,2% del Producto Interior Bruto del país, y el 26% dentro de la industria química.

De esta forma, la industria de transformación de plásticos en España es hoy una de las 9 más desarrolladas del mundo. Por delante de España se encuentran EE.UU., China, Japón, Alemania, Francia, Italia, Canadá, y Reino Unido (datos de la ANAIP).

El elevado consumo de plásticos, que como se ha mencionado anteriormente, derivan en su mayoría del petróleo, conlleva una serie de consecuencias negativas para el medio ambiente, principalmente la disminución de las reservas fósiles y la liberación de emisiones al suelo, agua y atmósfera que incluyen metales pesados, clorofluorocarbonos, compuestos orgánicos volátiles, óxidos de azufre y polvo. Estas emisiones dan lugar a efectos globales como la disminución de la capa de ozono, aumento del efecto invernadero y lluvia ácida (Andrady, 2003).

En cuanto al consumo de petróleo, según datos de la Agencia Internacional de Energía (IEA), la fabricación industrial a escala global de productos químicos, entre los que se encuentran los polímeros y sus productos intermediarios, consumen 3 billones de barriles de petróleo por año, además de las materias primas y energía. Esto da lugar a dos tipos de problemas: por un lado, los impactos ambientales mencionados y, por otro la limitación de reservas y su futuro agotamiento. La disponibilidad del petróleo en el futuro está a debate, se trata de un recurso no renovable que tarde o temprano llegará a su fin y aunque no se ha definido cuándo la producción mundial de petróleo empezara a declinar, investigaciones de diversos organismos, como la *Association for the Study of Peak Oil and Gas* (ASPO), apuntan a que el descenso en la producción mundial de petróleo tendrá lugar en el presente siglo. Así, el aumento continuado de la extracción de petróleo a partir de fuentes convencionales presenta cada vez más riesgos, ya que los nuevos descubrimientos no reponen el petróleo extraído, y estos riesgos constituyen un serio obstáculo para asegurar la demanda existente a medio plazo (IEA, 2008).

Por último, cabe mencionar los conflictos, tensiones políticas entre países productores y el terrorismo ocasionados a causa de la producción y comercio del petróleo.

Además de la problemática del petróleo, la síntesis química de plásticos requiere de caros y complejos procedimientos de obtención y separación para lograr la pureza deseada del producto final, así como costes significativos asociados con el tratamiento de los desechos.

El proceso de obtención de plásticos a partir del petróleo es un proceso largo y complejo (**figura 3**) que incluye las siguientes etapas:

1. Formación natural de **petróleo y gas natural** a partir de plancton sedimentado en el fondo marino durante millones de años. El petróleo bruto es una mezcla compleja de miles de componentes, por lo que para ser útil, debe procesarse.

2. Proceso de **destilación** llevado a cabo en una refinería, donde el petróleo crudo es separado en diferentes fracciones más ligeras. Para ello el petróleo es calentado y convertido en gas. Este gas se hace pasar por una columna y posteriormente se condensa en líquidos que constituyen las diferentes fracciones. Cada fracción es una mezcla de hidrocarburos con diferente tamaño y estructura molecular. Una de estas fracciones, la **nafta**, es el elemento crucial para la fabricación de los plásticos.

3. Proceso de **fragmentación** de la nafta en moléculas de hidrocarburo más pequeñas como etileno, propileno y butileno.

4. Proceso de **polimerización** de estas moléculas pequeñas en cadenas formando los polímeros. Cada polímero tiene sus propiedades diferentes, su estructura y su tamaño dependiendo de los distintos tipos de monómeros básicos que se utilicen.

5. Proceso de **transformación** en el que se convierten los polímeros en los productos plásticos finales (PlasticsEurope).

Además, durante la fabricación de los plásticos se incorporan aditivos para mejorar sus propiedades, como plastificantes para incrementar la flexibilidad y resistencia del polímero, o pigmentos, para conferir a los plásticos un color determinado.

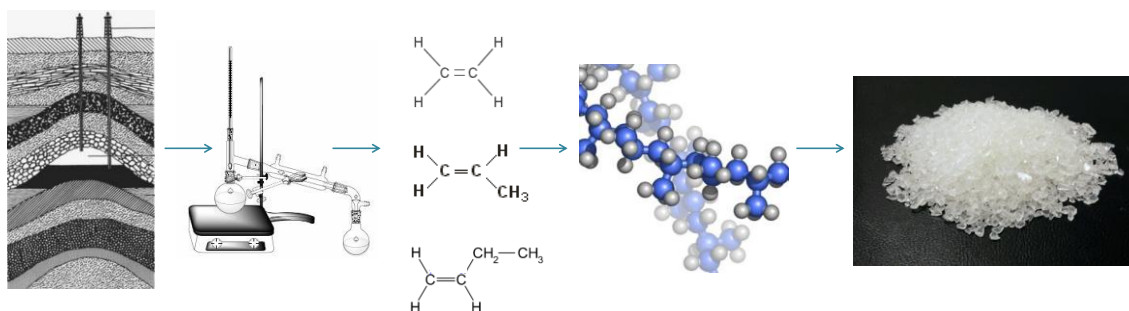


Figura 3. Proceso de fabricación de plástico a partir de petróleo.

1.2. LOS BIOPLÁSTICOS:

La problemática generada por el uso indiscriminado de plásticos sintéticos y su persistencia en el ambiente junto con la disminución de las reservas de petróleo y las constantes fluctuaciones en su precio, han estimulado la búsqueda de fuentes alternativas para la fabricación de los materiales plásticos así como para la síntesis de otros productos, entre los que se encuentran los biofueles y los bioplásticos.

Los bioplásticos constituyen una familia de materiales con distintas propiedades y rango de aplicaciones que se clasifican en las siguientes categorías principales:

- Plásticos procedentes de **materiales renovables**. En este grupo se incluyen tanto los extraídos directamente a partir de biomasa, como el almidón y la celulosa, como aquellos cuyos monómeros pueden producirse mediante fermentación de recursos renovables, aunque el proceso de polimerización posterior sea por vía química convencional.
- Polímeros **biodegradables** que cumplen todos los criterios de las normas científicamente reconocidas para biodegradabilidad y compostaje de plásticos y productos plásticos. En Europa esta norma es la UNE-EN 13432:2001.
- Bioplásticos sintetizados por **vía biotecnológica**. Aquí se incluyen tanto la síntesis de los monómeros requeridos para la fabricación de los bioplásticos cuya polimerización se lleva posteriormente a cabo por vía química, como la síntesis integral de los bioplásticos mediante procedimientos biotecnológicos (FEDIT, 2008).

Los primeros datos de producción de bioplásticos se remontan a 1926, cuando científicos del Instituto Pasteur de París lograron producir poliéster a partir de la bacteria *Bacillus megaterium* (**figura 4**). Sin embargo, no fue hasta 1973, debido a la crisis del petróleo, cuando proliferaron los estudios enfocados en este tipo de plásticos.

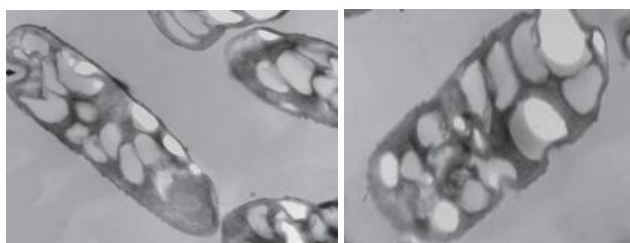


Figura 4. Gránulos de poliéster en células de *Bacillus megaterium*.

En la actualidad, la producción mundial de bioplásticos representa tan solo un 1% de los plásticos que cada día se ponen en el mercado. Pero las previsiones de crecimiento son muy alentadoras para esta industria, ya que si en 2012 se produjeron en todo el mundo 1,4 Mt de estos materiales, en 2017 se espera haber multiplicado por cuatro esta cifra hasta alcanzar los 6,2 Mt (EuropeanBioplastics).

El crecimiento de la producción de bioplásticos en los últimos años, es sin duda una respuesta a las necesidades de mercado y al alto precio del petróleo y su futuro agotamiento.

En cuanto a sus aplicaciones, la mayor parte se encuentran en el sector agrícola, sector de envases y embalajes y algunas aplicaciones emergentes en el sector textil.

1.2.1. Monómeros producidos por vía biotecnológica

De entre los diferentes tipos de bioplástico, son los monómeros producidos por vía biotecnológica en los que se centra nuestro trabajo.

En la actualidad la mayor aportación de la biotecnología a la producción de bioplásticos consiste en la síntesis de estos monómeros en masa a partir de biomasa (materias primas renovables que forman parte de residuos agrícolas o industriales ricos en carbohidratos) mediante tecnologías de fermentación microbiana (FEDIT, 2008). La materia prima o sustrato para la realización de las fermentaciones son los azúcares fermentables, fundamentalmente la glucosa y otras hexosas. A partir de estos azúcares, los microorganismos producen energía y compuestos químicos necesarios en su metabolismo, a la vez que generan una serie de subproductos. Así, el uso de materias primas renovables y la sustitución de procesos químicos por procesos biológicos en la síntesis de bioplásticos hacen que estos contribuyan positivamente a la conservación de los recursos naturales y a la protección del medio ambiente.

Entre los monómeros que pueden producirse por vía biotecnológica se encuentran el ácido láctico, 1,3-propanodiol, ácido succínico, ácido adípico y butanodiol, que posteriormente pueden utilizarse para la síntesis de poli(ácido láctico) (PLA), poli(tereftalato de trimetilenglicol) (PTT), poliéster poli(tereftalato de butilenglicol) (PBT), poliamida y poliuretano, respectivamente.

Nuestro trabajo se ha centrado en la obtención de 2,3-butanodiol por vía biotecnológica para la fabricación de poliuretano.

1.2.1.1. 2,3-butanodiol

El butanodiol es un compuesto de cuatro carbonos con grupos hidróxido en distintas posiciones. El 2,3-BDO, también conocido como 2,3-butilenglicol, es el único que se produce de manera natural por varios microorganismos, no existiendo rutas metabólicas naturales que den lugar a 1,4-BDO o 1,3-BDO. Su fórmula molecular es $C_4H_{10}O_2$, su masa molecular es de 91.12, tiene su punto de ebullición entre 177 y 182°C y punto de congelación a -60 °C. Puede encontrarse en forma de líquido incoloro e inodoro o en forma cristalina (Celinska y Grajek, 2009).

Existen tres estereoisómeros para el 2,3-BDO: los ópticamente activos, con forma *dextro* (2S, 3S) o *levo* (2R, 3R) y el ópticamente inactivo o *meso* (figura 5).

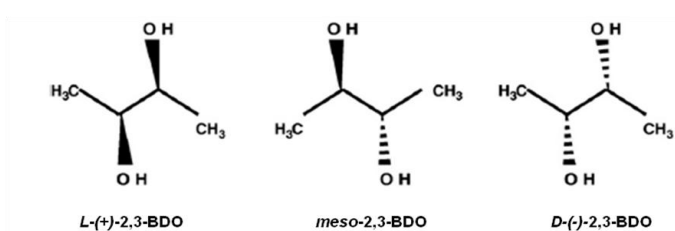


Figura 5. Estereoisómeros del 2,3-BDO.

Además de su aplicación para la fabricación de uretano, el 2,3-BDO tiene un gran número de aplicaciones industriales, entre las que se encuentran la fabricación de tintas, perfumes, agentes suavizantes o explosivos, así como aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica (Syu, 2001). Las formas ópticamente activas son productos con alto valor en la síntesis dirigida de compuestos quirales, compuestos esenciales en la fabricación de productos farmacéuticos (Sabra *et al.*, 2015).

Mediante diversas reacciones químicas (deshidratación, deshidrogenación, cetalización y esterificación), pueden obtenerse distintos derivados del 2,3-BDO que proporcionan diferentes aplicaciones. De esta forma, pueden obtenerse disolventes a partir de su deshidratación, aditivos alimentarios a partir de su deshidrogenación, agentes de mezcla para gasolina a partir de su cetalización y plastificantes a partir de su esterificación (Haveren, 2008).

Según datos de finales del año 2014, la producción mundial de butanodiol es de 3,35 Mt. Además, la producción de 2,3-BDO crece actualmente a un ritmo anual de un 4-7% debido al incremento de la demanda de muchos de sus derivados (Li, 2012; 2013). Por todo esto, puede afirmarse que se trata de un producto altamente demandado y con alto interés comercial.

- *Síntesis química de 2,3-BDO:*

El 2,3-BDO sintético, obtenido a partir del petróleo, no cuenta con un extenso mercado, debido a que solo se obtiene con una única estructura, y los costes para su síntesis son elevados (Sabra *et al.*, 2015).

- *Síntesis biológica de 2,3-BDO :*

La síntesis de 2,3-BDO como producto de fermentación bacteriana es conocida desde hace mucho tiempo. Las primeras investigaciones se llevaron a cabo en 1906 por Harden y Walpole y en 1912 por Harden y Norris. La bacteria empleada entonces fue *Klebsiella pneumoniae* (Magee y Kosaric, 1987).

El interés en la producción de este compuesto a escala industrial creció durante la Segunda Guerra Mundial, utilizándose principalmente como precursor para la fabricación de 1,3-butadieno, a partir del cual se fabricaba caucho sintético. En esta época se desarrollaron procesos biológicos de obtención de 2,3-BDO pero no llegaron a aplicarse a escala comercial y fueron sustituidos por las tecnologías petroquímicas.

La producción biológica de 2,3-BDO, aunque estudiada a lo largo de más de 100 años, continúa siendo interesante hoy en día debido a las numerosas aplicaciones de este compuesto anteriormente descritas. Además, debido a la imparable subida del precio del petróleo, los procesos de producción biológica de butanodiol podrían suponer una ventaja competitiva para la industria.

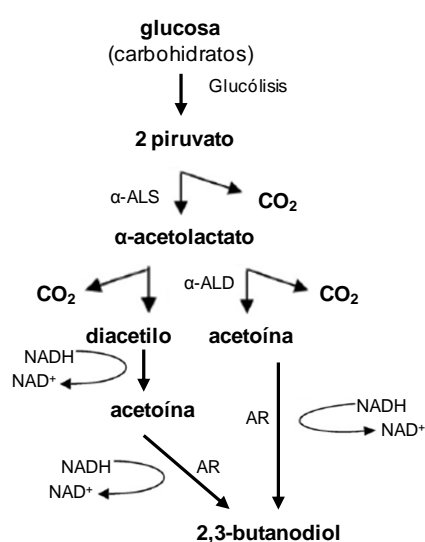


Figura 6. Esquema de la ruta microbiana de síntesis de 2,3-BDO a partir de piruvato.

La ruta metabólica que conduce a la formación de 2,3-BDO se trata de una fermentación que tiene lugar bajo condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis en la que se forman una serie de metabolitos además del 2,3-BDO: acetato, lactato, formato, succinato, acetoína y etanol, que pueden variar dependiendo del microorganismo y las condiciones de cultivo.

Esta ruta parte del piruvato generado durante la glucólisis a partir de monosacáridos mediante la ruta de Embden-Meyerhof (**figura 6**). En la síntesis de 2,3-BDO a partir de piruvato están implicadas tres enzimas claves.

Estas enzimas son la α -acetolactato sintasa, α -acetolactato descarboxilasa y 2,3-BDO deshidrogenasa (o acetoína reductasa) (Ji *et al.*, 2011). La enzima α -acetolactato sintasa transforma una molécula de piruvato en acetaldehído-tiamina pirofosfato y la condensa con una segunda molécula de piruvato para formar α -acetolactato. El α -acetolactato, en función de las condiciones de aireación en que se encuentre el cultivo, puede seguir dos rutas alternativas: en condiciones de anaerobiosis, el α -acetolactato sufre una descarboxilación oxidativa para dar lugar a acetoína. Bajo condiciones de microaerobiosis, el α -acetolactato puede sufrir una descarboxilación espontánea que da lugar a la formación de diacetilo. Este último es convertido en acetoína mediante una reacción de reducción catalizada por la enzima acetoína reductasa (Maddox, 1996; Sabra *et al.*, 2015).

Aunque no se conoce exactamente la función metabólica de la biosíntesis de 2,3-BDO, este proceso es importante para la prevención de la acidificación (van Houdt *et al.*, 2007), la regulación intracelular del ratio NAD^+/NADH (Johansen *et al.*, 1975) y la obtención de energía para el crecimiento microbiano, ya que el 2,3-BDO puede ser reutilizado durante la fase estacionaria, cuando otras fuentes de carbono se hayan agotado.

Existen numerosos microorganismos capaces de producir 2,3-BDO, aunque sólo algunos lo hacen en cantidades significativas. La mayoría de bacterias productoras de 2,3-BDO pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y entre las especies consideradas de interés industrial se encuentran algunas pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* (Sabra *et al.*, 2015).

1.2.2. Poliuretano

El primer plástico de poliuretano fue sintetizado por Otto Bayer en 1937 (Bayer, 1947), y se denominó Perlon U. Estos productos fueron introducidos en el mercado a finales de los años 40, ocupando una posición importante gracias a sus propiedades. Se trata de un polímero muy versátil que puede tener diferentes aplicaciones gracias a sus características de escasa permeabilidad a los gases, alta resistencia química y excelente aislamiento térmico y eléctrico. Entre estas aplicaciones se encuentran la fabricación de espumas, revestimientos flexibles y rígidos, adhesivos, elastómeros sintéticos y cauchos resistentes a la abrasión.

El poliuretano se compone de grupos uretano, cuya síntesis se lleva a cabo haciendo reaccionar diisocianatos con dialcoholes o poliésteres (Cinta *et al.*, 2006). Mientras que el isocianato siempre tiene origen petroquímico, los alcoholes precursores de uretano pueden sintetizarse de forma biológica a partir de azúcares fermentables como se ha descrito anteriormente. De esta forma se obtienen bioproductos precursores de uretano mediante el uso de procesos biotecnológicos, sustituyendo la síntesis química en gran parte del proceso de obtención del producto final (FEDIT, 2008).

Existen estudios en los que se han utilizado para la obtención de uretano los siguientes dioles obtenidos de forma biológica: butanodiol, polietilenglicol, sorbitol, polidimetilsiloxano, D-sorbitol, L-itol, D-manitol o propilenglicol (1,3-propanodiol).

Este polímero forma parte del grupo de plásticos con mayor demanda a escala europea, por lo que consideramos interesante la búsqueda de alternativas para su fabricación diferentes a la síntesis química.

1.3. BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA

Hasta hora, los intereses de la industria en relación a la utilización de la biotecnología se han centrado principalmente en tres áreas: la producción de alimentos, piensos para alimentación animal, y las aplicaciones de uso sanitario. Sin embargo, los avances logrados en los últimos años en el campo de la biotecnología han permitido considerar su aplicación también para la fabricación de productos químicos en general (FEDIT, 2008).

En la industria, la competencia entre la biotecnología industrial y la química clásica se basa en factores económicos, es decir, en los costes de producción. En cuanto al impacto medioambiental, el consumo de recursos y la generación de residuos, la biotecnología aporta ciertas ventajas frente a los procesos químicos convencionales. Los procesos biotecnológicos cumplen con los requisitos básicos de sostenibilidad, ya que se caracterizan por la reducción en el consumo de recursos, una mayor utilización de materias primas renovables, la reducción en la producción de residuos y la disminución del impacto medioambiental.

1.3.1. Microbiología industrial

La microbiología industrial es la disciplina que utiliza microorganismos, cultivados a gran escala, para obtener productos con valor comercial (Madigan *et al.*, 2003).

Con este fin, en los últimos años se han utilizado diversos microorganismos como microalgas, hongos y bacterias para la producción biológica de productos de interés industrial, entre los que se encuentran los bioplásticos.

Los microorganismos utilizados en la industria deben reunir una serie de requisitos que se detallan a continuación (Madigan *et al.*, 2003).

1. Genéticamente estable.
2. Disponible en cultivo puro.
3. Crecimiento rápido.
4. Crecimiento en medio de cultivo de bajo coste y disponible en grandes cantidades.
5. Capaz de crecer en cultivos a gran escala.
6. Producción eficiente del producto de interés.
7. Facilidad para separar las células microbianas del medio de cultivo.
8. Susceptible de ser manipulado genéticamente.
5. No patógeno y no productor de agentes tóxicos, a menos que uno de estos sea el producto de interés.

El modo más habitual de obtener productos por medio de microorganismos industriales es el proceso de fermentación. En este caso, el término *fermentación* se refiere a cualquier cultivo a gran escala de microorganismos. No debe confundirse con el proceso bioquímico de fermentación consistente en la regeneración del poder reductor (NADH) por un procedimiento no oxidativo.

Existen gran cantidad de productos generados por medio de la microbiología industrial (Madigan *et al.*, 2003):

- **Alimentos, bebidas, suplementos y aditivos alimentarios.**
- Productos derivados de la leche por fermentación mediante bacterias lácticas: queso, yogur, leches fermentadas.

- Bebidas alcohólicas: vino, cerveza, sake. Productos de destilación de bebidas alcohólicas (brandy, whisky, vodka, ginebra, ron, vinagre).
- Pan y derivados.
- Vitaminas: ácido ascórbico (vitamina C), riboflavina, vitamina B12.
- Aminoácidos: ácido glutámico, lisina, triptófano, glicina, aspartamo.
- Proteína celular (SCP, single cell protein) como suplemento alimentario.

- **Productos sanitarios.**

- Antibióticos.
- Hormonas protéicas (hormona del crecimiento, insulina).
- Factores de coagulación sanguínea.
- Proteínas y enzimas para reactivos diagnósticos.
- Enzimas de restricción y para Ingeniería genética en general.
- Esteroides.
- Vacunas.

- **Enzimas industriales.**

- Enzimas hidrolíticas: proteasas y celulasas para detergentes. Amilasas, xilanasas como aditivos para piensos animales.
- Glucosa isomerasa para la producción de fructosa como edulcorante.
- Enzimas inmovilizadas.

- **Productos químicos industriales.**

- Alcoholes: etanol, metanol.
- Acetona.
- Polisacáridos: xantanos, dextranos.
- Combustibles: etanol, metano, hidrógeno, propano, butanol.
- Materias primas para la fabricación de plásticos.

En la **tabla 1** se muestran ejemplos de productos citados arriba y los microorganismos a partir de los que pueden obtenerse.

Tabla 1. Principales productos microbianos de interés en microbiología industrial y biotecnología.

PRODUCTO	MICROORGANISMO
Productos industriales	
Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acetona y butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
2,3-butanodiol	<i>Enterobacter, Serratia</i>
Enzimas	<i>Aspergillus, Bacillus, Trichoderma</i>
Productos agrícolas	
Giberelinas	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Aditivos alimentarios	
Aminoácidos	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Ácidos orgánicos	<i>Aspergillus niger</i>
Nucleótidos	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Vitaminas	<i>Ashbya, Eremothecium, Blakeslea</i>
Polisacáridos	<i>Xanthomonas</i>
Productos médicos	
Antibióticos	<i>Penicillium, Streptomyces, Bacillus</i>
Alcaloides	<i>Claviceps purpurea</i>
Insulina, hormona del crecimiento, somatostatina	<i>Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae</i> , y otros (ADN recombinante)
Biocombustible	
Hidrógeno	Microorganismos fotosintéticos
Metano	<i>Methanobacterium</i>
Etanol	<i>Zymomonas, Thermoanaerobacter</i>

Modificado de Madigan *et al.* (2003).

1.3.2. Manipulación de vías metabólicas para la sobreproducción de bioproductos de interés industrial

Una de las estrategias para obtener bioproductos industriales en grandes cantidades y abaratar los costes de su producción consiste en la creación de microorganismos con nuevas características deseables para la fabricación de dichos productos de interés, mediante manipulaciones genéticas (Prescott, 1993).

Este concepto se conoce como ingeniería de vías metabólicas y se define como “mejora de las actividades celulares mediante la manipulación de funciones enzimáticas, de transporte y reguladoras de la células mediante el uso de tecnología recombinante del ADN” (Bailey, 1991).

Los principales objetivos de la ingeniería de vías metabólicas son (Nielsen, 2001):

- Mejorar el rendimiento y productividad
- Ampliar el rango de sustratos que pueden ser utilizados
- Eliminar o reducir la formación de productos secundarios
- Introducir vías para la síntesis de nuevos productos

El desarrollo de las técnicas de ingeniería genética y las aplicaciones bioinformáticas, junto con la secuenciación de genomas completos de diversos organismos, ha facilitado la utilización de la ingeniería de vías metabólicas para mejorar la producción industrial de diversos productos.

Dentro de la ingeniería de vías metabólicas pueden distinguirse distintas categorías:

- Expresión de genes heterólogos para la síntesis de proteínas.
- Ampliación del rango de sustratos utilizables: en algunos procesos industriales es interesante extender el rango de sustratos utilizables por el microorganismo de interés para hacerlo más eficiente en cuanto a aprovechamiento de residuos.
- Modificación de vías para la síntesis de productos: creación de microorganismos que sintetizan diferentes productos de interés, además de los que producen de forma natural, y microorganismos que los sintetizan de forma más eficiente. Se lleva a cabo mediante la modificación de las vías metabólicas existentes o inserción de nuevas vías.
- Vías para la degradación de xenobióticos: generación de nuevas vías o modificación de las existentes para la degradación de diferentes xenobióticos por parte de un mismo microorganismo.
- Modificación de las funciones celulares para la mejora de procesos de producción: incluye expresión de genes heterólogos, delección de genes y sobreexpresión de genes homólogos, para por ejemplo mejorar la tolerancia a ciertas condiciones.
- Eliminación o reducción de productos secundarios: eliminación de productos no deseables que pueden interferir en la síntesis de los productos de interés.
- Mejora del rendimiento o productividad de distintos productos: puede obtenerse incrementando la actividad de síntesis del producto de interés mediante la inserción de copias adicionales del gen correspondiente, modificando la regulación de las vías implicadas o modificando el metabolismo central del carbono (Nielsen, 2001).

Nuestro trabajo puede incluirse en las categorías de modificación de vías metabólicas para síntesis de productos, eliminación y reducción de productos secundarios no deseables y mejora del rendimiento y productividad.

Eliminación o reducción de productos secundarios

En los procesos fermentativos, debido a la complejidad del metabolismo celular, resulta inevitable que se formen productos secundarios además del producto deseado. La formación de estos productos da lugar a un consumo de carbono necesario también para la síntesis del producto de interés, dando lugar por tanto a pérdidas en el rendimiento.

Mejora de rendimiento y productividad

El rendimiento en la producción industrial es realmente importante en cuanto a los costes de producción. El rendimiento depende fundamentalmente de los flujos metabólicos, por lo tanto, es posible incrementar el rendimiento de la producción de cierto producto mediante la redirección de los flujos metabólicos hacia el metabolito de interés. Lo mismo ocurre cuando se desea mejorar la productividad.

1.4. UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOPRODUCTOS

Los procesos agroindustriales generan grandes cantidades de subproductos o residuos que si no son reciclados o tratados apropiadamente se acumulan en la naturaleza generando diversos problemas ambientales (liberación de CO₂, contaminación de cursos de agua, malos olores), a la vez que suponen un problema de gestión para las empresas productoras.

Por otra parte se pierden potenciales materias primas para la industria, ya que estos residuos poseen un alto contenido en compuestos como azúcares, pigmentos, fibra alimentaria y proteínas, entre otros, que pueden ser útiles al transformarlos mediante tratamientos químicos o microbiológicos en productos de elevado valor (Barragán *et al.*, 2008).

Estos problemas han provocado el interés de la comunidad científica en el aprovechamiento de los residuos agroindustriales para la obtención de productos de alto valor.

La mayor parte de los residuos agroindustriales corresponden a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa que pueden ser desdoblados en monosacáridos y disacáridos fermentables, a partir de los cuales se pueden obtener productos de interés (Sánchez *et al.*, 2010).

La conversión de biomasa lignocelulósica hacia productos de alto valor mediante procesos biotecnológicos (bioproductos) constan de diversas etapas: generación de biomasa, pretratamiento de la biomasa (fraccionamiento de los diversos componentes), hidrólisis de los polisacáridos a azúcares fermentables, bioprocesamiento (fermentación), separación y purificación de los bioproductos.

En la actualidad se utilizan fundamentalmente dos fuentes de azúcares en los procesos de fermentación: almidón, procedente de cereales y patatas, y sacarosa, derivada de cultivos de caña de azúcar y frutales. La hidrólisis de almidón genera únicamente glucosa, mientras que la de sacarosa da lugar a una mezcla equimolar de glucosa y fructosa, además de poder ser utilizada directamente por los microorganismos.

Entre los residuos utilizados como fuente de sacarosa se encuentran la cáscara de naranja, la pulpa de remolacha y la pulpa de piña.

1.4.1. Cáscara de naranja

España es uno de los principales países productores de naranja del mundo, así como el mayor productor de la Unión Europea. Con una producción de 5,16 millones de toneladas, ocupa el sexto lugar a nivel mundial detrás de China, Brasil, Estados Unidos, India y Méjico (FAO, 2013).

La producción de esta fruta se destina tanto a su consumo en fresco como a la industria de elaboración de zumos. Esta actividad industrial genera cada año un millón de toneladas de desechos, y esto es debido a que durante el proceso, entre el 45 y 60 % en peso de la fruta se obtiene como residuo (**figura 7**), en su mayoría cáscaras (Marina *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2009).



Figura 7. Proceso industrial de obtención de zumo y subproductos a partir de naranja.

La cáscara de naranja se compone de carbohidratos simples (16.9%), almidón (3.75%) pectina (42.5%), celulosa (9.21%), hemicelulosa (10.5%), proteínas (6.5%), aceite esencial (4.8) y cantidades trazas de lignina (Ecónomos *et al.*, 1998; Ayala *et al.*, 2013).

Este desecho se utiliza para la fabricación de pienso animal, obtención de aceites esenciales y pigmentos y extracción de pectina (Marina *et al.*, 2005). Además, debido a sus propiedades antioxidantes se ha propuesto su empleo en el desarrollo de alimentos funcionales (Gorinstein *et al.*, 2001). Para todas estas aplicaciones la cáscara de naranja debe ser primero desecada, debido a su rápida pudrición por su elevado contenido en agua, por lo que no resultan demasiado rentables (Mamma *et al.*, 2008). Por ello se han propuesto vías alternativas para su utilización en la síntesis de productos resultantes de la fermentación, principalmente etanol (Grohmann *et al.*, 1996; Oberoi *et al.*, 2010).

1.4.2. Pulpa de remolacha

La pulpa de remolacha es un subproducto originado en la industria de obtención del azúcar de mesa a partir de remolacha. El cultivo de este vegetal así como su procesamiento se lleva a cabo en todos los países de la Unión Europea (a excepción de Luxemburgo), y representa un papel importante en la economía de muchas áreas rurales, con alrededor de 300.000 explotaciones dedicadas a este cultivo (Berlowska *et al.*, 2016).

En el proceso de obtención de azúcar a partir de remolacha se obtienen además una serie de subproductos como raíces, hojas, pulpa y melaza (**figura 8**). La pulpa y la melaza constituyen los principales subproductos, pudiéndose obtener a partir de una tonelada de remolacha una media de 160 kg de azúcar, 500 kg de pulpa fresca y 38 kg de melaza. La pulpa puede emplearse como tal (pulpa fresca) con un contenido en materia seca del 10-12%, prensada con un contenido en materia seca del 20-25%, o bien deshidratada hasta conseguir un producto con un 88-90% de contenido en materia seca (Calsamiglia *et al.*, 2004).



Figura 8. Proceso industrial de obtención de azúcar y subproductos a partir de remolacha.

La pulpa de remolacha está compuesta principalmente de polisacáridos como celulosa (22-30%), hemicelulosa (24-32%), lignina (1-2%) y pectina (38-62%). Además contiene proteínas (7-8%), ácidos urónicos (21-23%) y sacarosa residual (0.5%) (Michel *et al.*, 1988; Berlowska *et al.*, 2016).

La producción anual de este subproducto de la remolacha en la Unión Europea ronda los 8 millones de toneladas en su forma prensada y 5.5 millones de toneladas de pulpa desecada (Barjol *et al.*, 2003). Su principal uso es la fabricación de pienso para animales, aunque existen numerosos trabajos en los que se ha estudiado su uso como materia prima para la obtención de bioproductos como etanol y biodiesel, entre ellos los de Rezić *et al.* (2013), Bellido *et al.* (2105) y Madian *et al.* (2015). Menos numerosos son los estudios sobre su uso en la síntesis de 2,3-BDO, como el llevado a cabo por Sikora *et al.* (2015).

1.4.3. Desechos de piña

La piña es la segunda fruta tropical a nivel mundial en cuanto a volumen de producción, con un valor estimado de 18 millones de toneladas. (FAO, 2009; Adegbite *et al.*, 2014). Los desechos de industrialización de esta fruta suponen hasta un 60%, generándose gran cantidad de residuos que pueden ser utilizados para otras aplicaciones (Aguilar *et al.*, 2005).

A partir de la piña se obtienen diversos productos, entre los que se encuentran piña fresca pelada, piña enlatada, piña deshidratada, zumo o néctar de piña y mermeladas. Su composición incluye pulpa (33%), corazón (6%), cáscara (41%) y corona (20%) (Benítez *et al.*, 2010). En el proceso industrial se extrae la pulpa, quedando como desechos la corona, el corazón y la cáscara (**figura 9**), que suponen hasta un 50% del peso total de la piña. Además de en la industria, estos residuos se generan diariamente en hoteles, restaurantes y mercados.



Figura 9. Proceso industrial de obtención de pulpa de piña.

Los residuos de piña presentan un contenido del 4-8% de proteína, 60-72% de fibra y 35-45% de azúcares solubles (70% de sacarosa, 20% de glucosa y 10% de fructosa), además de minerales en pequeña cantidad. (Abdullah y Hanafi, 2008; Wadhwa y Bakshi, 2013; Pardo *et al.*, 2014).

Los principales usos que se le han dado a los residuos de piña han sido la extracción de bromelina (Hebbar *et al.*, 2008), la producción de vinagre (Raji *et al.*, 2012), producción de ácido cítrico (Kareem *et al.*, 2010) y alimentación animal (Sruamsiri, 2007). Además, se han llevado a cabo trabajos sobre su utilización para la síntesis de bioetanol (Nigam, 1999; Hossain, 2010). No existen sin embargo estudios encaminados a la obtención de otros productos resultantes de la fermentación a partir de este residuo como el 2,3-BDO.

1.5. FAMILIA BACTERIANA ENTEROBACTERIACEAE Y SU APLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE BIOPRODUCTOS

1.5.1. Descripción de la familia *Enterobacteriaceae*

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por ser bacilos aerobios o anaerobios facultativos, Gram negativos, no esporulados, reductores de nitrato a nitrito, catalasa positivos y oxidasa negativos. Algunos forman cápsulas, principalmente los del género *Klebsiella* y también algunas cepas de *Enterobacter* y *Serratia*. La mayoría de los géneros de la familia son móviles, presentando flagelos peritricos (Ristuccia y Cunha, 1985). La mayor parte de estas bacterias se encuentran en el intestino del hombre y de otros animales, aunque también existen enterobacterias saprófitas de vida libre en suelo, agua y plantas. Algunas enterobacterias actúan como agentes infecciosos, siendo responsables de infecciones nosocomiales.

1.5.2. Patogenia de la familia *Enterobacteriaceae*

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* pueden actuar como patógenos, causando infecciones nosocomiales. Las infecciones son especialmente comunes en pacientes que han recibido terapia antimicrobiana y en aquellos ingresados en unidades de cuidados intensivos. La colonización y las infecciones nosocomiales producidas por enterobacterias están asociadas frecuentemente con instrumentación y dispositivos médicos contaminados (Sanders y Sanders 1997).

Las enterobacterias presentan diferentes factores de virulencia: adhesinas, como las fimbrias y proteínas de membrana externa, secreción de toxinas y producción de sideróforos.

- *Sideróforos:*

La presencia de sideróforos permite la supervivencia en los tejidos del organismo hospedador, ya que la disponibilidad de hierro supone un factor limitante en el proceso de infección bacteriana.

En el cuerpo humano, el hierro se encuentra adherido a moléculas transportadoras tales como la hemoglobina, lactoferrina y transferrina, y existe poco hierro de forma accesible para los microorganismos. Por ello, estas bacterias poseen sistemas de alta afinidad que solubilizan el hierro y lo importan a la célula, los sideróforos (Bullen *et al.*, 2005).

- *Secreción de toxinas:*

La secreción de toxinas en enterobacterias hace referencia principalmente a la bacteria *Escherichia coli*, productora de las toxinas Shiga, toxina termolábil (TL) y toxina termoestable (TE).

- *Cápsula:*

La presencia de cápsula en ciertas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* contribuye a evadir las defensas del sistema inmune del organismo hospedador. Está formada por unidades repetidas de polisacáridos conocidos como antígenos K. Éstos protegen a la bacteria de la fagocitosis (Grimont y Grimont, 2005).

- *Membrana externa:*

La membrana externa de las enterobacterias consiste en una doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas y otras proteínas de la membrana externa. El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición.

El lípido A, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce. El oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como antígeno O, cuya presencia ofrece resistencia a bactericidas (Bannerman, 2003; Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

Durante las infecciones por enterobacterias y en general, bacterias Gram negativas, la replicación bacteriana y la muerte celular liberan gran cantidad de lipopolisacáridos al torrente sanguíneo, que se une a las proteínas circulatorias y provoca la secreción de citoquinas inflamatorias (Peri *et al.*, 2010).

- *Fimbrias:*

En enterobacterias se han encontrado fundamentalmente fimbrias de tipo I y tipo III (Adegbola y Old, 1985; Hornick *et al.*, 1991).

Entre las fimbrias mejor caracterizadas están las fimbrias de tipo I de las enterobacterias. Son estructuras con un tamaño aproximado de 0,21 μm de longitud y 7 nm de ancho que se distribuyen de forma uniforme sobre la superficie de las células. Participan en la fijación al organismo hospedador (**figura 10**) a través de la unión a residuos de manosa de glicoproteínas de superficie situadas en las células epiteliales hospedadoras para iniciar el proceso de anclaje.

Se trata de heteropolímeros formados por una subunidad principal, FimA, que constituye más de un 95 % de la fimbria, y una serie de componentes secundarios: FimF y FimG que tienen un importante papel en la biogénesis de la fimbria y FimH que proporciona a las fimbrias su sensibilidad a manosa (Krogfelt y Klemm, 1988; Russell, 1992).

A los componentes FimC y FimD se les atribuye la función de ensamblaje de los componentes de la fimbria, ya que bacterias mutantes con delección de dichos componentes no son capaces de sintetizar fimbrias aún funcionando correctamente la síntesis de la subunidad principal FimA (Orndorff y Falkow, 1984; Klemm *et al.*, 1985).

Las fimbrias de tipo III contribuyen a la adhesión de la bacteria a diversas células hospedadoras, aunque no es muy claro su papel en la patogénesis y no está muy bien definido su receptor (Schroll *et al.*, 2010).

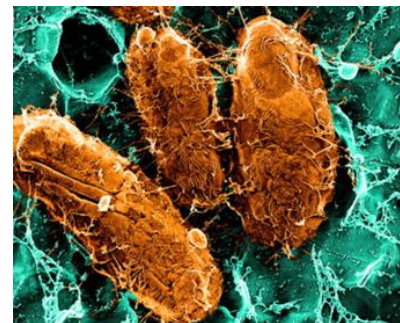


Figura 10. Adhesión de enterobacteria a célula huésped a través de fimbrias tipo I (Mulvey *et al.*, 1998).

Según la legislación española en cuanto a agentes biológicos (Real Decreto 664/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo), la mayoría de especies de enterobacterias se consideran agentes biológicos del grupo 2. Por agente biológico del grupo 2 se entienden aquél que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.

1.5.3. Fermentación en la familia *Enterobacteriaceae*

- *Fermentación ácido mixta:*

Se trata de un tipo de fermentación que es llevada a cabo principalmente por la familia *Enterobacteriaceae*. Bajo condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis estas bacterias fermentan la glucosa dando lugar a una mezcla de ácidos: acético, fórmico, láctico, succínico, y etanol, con la posibilidad también de que se produzcan gases (CO₂ y H₂). Tiene lugar en los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, y *Shigella*.

- *Fermentación butanodiólica:*

Al igual que en el caso anterior, mediante esta fermentación se forma una mezcla de ácidos y gases, pero además se sintetiza 2,3-BDO a partir de piruvato así como su intermediario acetoína. Tiene lugar en los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y *Erwinia* (Jurtschuk, 1996). La formación de 2,3-BDO se describe más detalladamente en el anterior apartado 1.2.1.1.

1.5.4. Obtención de bioproductos por enterobacterias

Las enterobacterias son capaces de generar gran cantidad de productos de interés para la industria como los descritos en el anterior apartado 1.3.1. Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* existe una amplia diversidad de fenotipos que permite que sus aplicaciones sean muy diversas (Chauhan y Varma, 2009).

Se ha descrito el uso de enterobacterias en la producción de biofloculantes (Lu *et al.*, 2005), hidrógeno (Han *et al.*, 2012), etanol (El Asli *et al.*, 2002), butanodiol (Saha *et al.*, 1999; Perego *et al.*, 2000), ácidos orgánicos (Kim *et al.*, 2002).

1.5.5. Asociación a plantas en enterobacterias

En el suelo existen bacterias asociadas a una multitud de plantas, ya sea como bacterias epifíticas, endófitas o en simbiosis con las plantas. Estas bacterias pueden establecer distintos tipos de relación con la planta, pudiendo actuar como patógenos, organismos beneficiosos, o no tener efecto directo en las plantas.

- *Bacterias endófitas:*

Los microorganismos endófitos son capaces de entrar en los tejidos de la planta sin causar daños y pudiendo establecer una relación de mutualismo con ella, bien atacando a los patógenos de la planta, eliminando contaminantes, produciendo fitohormonas o contribuyendo a la disponibilidad de nitrógeno asimilable por las plantas, entre otros (Hallman *et al.*, 1997). La penetración de las bacterias endófitas en la planta puede ocurrir por estomas, heridas o áreas de emergencia de raíces laterales. La mayoría no inducen respuesta de hipersensibilidad y por ello la planta no desarrolla mecanismos de defensa contra ellas.

Existen estudios que prueban los efectos beneficiosos de los endófitos sobre las plantas (Barka *et al.*, 2000), que indican que cuando las plantas son inoculadas con bacterias de carácter endofítico, son más vigorosas y poseen mayor resistencia a tóxicos y patógenos y menor mortalidad.

Las características de las bacterias endófitas permiten que puedan ser utilizadas para incrementar el crecimiento y la producción vegetal, ya sea promoviendo el crecimiento de la planta o actuando como control biológico frente a patógenos.

- *Bacterias rizosféricas:*

La rizosfera se define como una zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos respecto al resto del suelo.

Los microorganismos de esta zona no están íntimamente asociados a las raíces, sin embargo tienen un efecto importante en el crecimiento de las plantas (Markova *et al.*, 2005). En la rizosfera, los microorganismos pueden desempeñar diversas e importantes funciones como la producción de sustancias de crecimiento y la captación de nutrientes.

Entre los microorganismos rizosféricos, los más abundantes son las bacterias, debido a su rápido crecimiento y la habilidad que presentan de utilizar un amplio rango de sustratos como fuentes de carbono o nitrógeno (Jha *et al.*, 2011).

Bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* han sido aisladas de tejidos de un gran número de plantas silvestres y cultivadas (Ingraham *et al.*, 1998). Dentro de esta familia, varios géneros han sido caracterizados como PGPB (bacterias promotoras del crecimiento de plantas): *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Serratia* (Glick *et al.*, 1995).

En plantas de arroz, las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* representan la mayoría de las bacterias endófitas Gram negativas, predominando entre ellas las de los géneros *Enterobacter* y *Pantoea* (Cottyn *et al.*, 2001).

1.6. LA PLANTA DE ARROZ COMO FUENTE DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO

El arroz es una planta herbácea anual de la familia de las gramíneas, subfamilia de las poáceas y género *Oryza*. El arroz cultivado pertenece a la especie *Oryza sativa*.

La planta consta de una serie de órganos vegetativos (raíz, tallo y hojas) y órganos florales constituidos por las panículas (**figura 11**). El fruto es llamado botánicamente cariósipide y es comúnmente conocido como arroz, cuya forma y tamaño pueden variar dependiendo de la variedad de arroz de que se trate.

La planta de arroz se adapta a los ambientes acuáticos, y su cultivo se lleva a cabo en planicies que pueden permanecer inundadas incluso durante el período de crecimiento de la planta (Aguilar, 2010).

El suelo inundado favorece la presencia de zonas oxigenadas así como zonas anóxicas, por lo que pueden encontrarse bacterias con metabolismo aeróbico, anaeróbico o facultativo (Brune *et al.*, 2000). Las condiciones de inundación del suelo y la ausencia de oxígeno junto con la presencia de materia orgánica, pueden dar lugar a fermentaciones por parte de dichas bacterias, originando ácidos orgánicos y otros compuestos derivados de la fermentación como etanol y 2,3-BDO.



Figura 11. Planta de arroz.

De esta forma se produce en la planta de arroz la enfermedad denominada *Akegare* (figura 12), consecuencia de la toxicidad provocada por los productos de fermentación, que ocasiona retraso en el crecimiento radicular y amarilleamiento de las hojas (Aguilar, 2010).



Figura 12. Cultivo de arroz sano (izquierda) y cultivo afectado por *Akegare* (derecha).

El arroz es considerado el cultivo de cereal más importante del mundo, proporcionando alimento a más del 50 % de la población mundial (Gyaneshwar *et al.*, 2001). En España, este cereal constituye uno de los principales productos agrícolas, con varias zonas productoras: las Marismas del Guadalquivir, la albufera de Valencia, el delta del Ebro y las vegas del Guadiana. De estas, las Marismas del Guadalquivir ocupan el primer lugar, generando un 40% aproximadamente del total de la producción de España.

A partir de estos datos y lo referenciado en el apartado anterior, consideramos que el arroz es una fuente abundante y cercana para la búsqueda de microorganismos, concretamente diversos géneros y especies de enterobacterias con posibles aplicaciones para la fabricación de compuestos precursores de bioplásticos resultantes del metabolismo fermentativo, concretamente el 2,3-BDO.

1.7. CULTIVO DE ARROZ EN LAS MARISMAS DEL GUADALQUIVIR

Por definición una marisma es un ecosistema de tipo húmedo, constituido por una gran extensión llana que se inunda por efecto de las mareas y de la llegada de las aguas de los ríos que desembocan en sus proximidades.

Los sistemas marismeños, al ser confluencia de aguas dulces y saladas, con sus correspondientes aportes de materiales, poseen suelos con unos altos contenidos orgánicos y muy fértiles, y unos altos índices de biodiversidad (Del Moral, 1996).

La vegetación característica de la marisma es halófila, debido a la salinidad del terreno, y se trata de una vegetación estacional.

Además, las marismas constituyen hábitats idóneos para numerosos organismos, y más concretamente los arrozales presentes en algunas marismas conforman el hábitat de una amplia variedad de organismos terrestres y acuáticos gracias a la continua presencia de agua fresca (Manachini, 2007). A lo largo de miles de años, la gente del campo además ha incrementado esta biodiversidad con plantas cultivadas, animales domésticos y acuicultura.

Las marismas del Guadalquivir están situadas en el suroeste de la Península Ibérica (**figura 13**), ocupando el antiguo estuario del río con una superficie de más de 100.000 hectáreas repartidas en tres provincias: Sevilla, Huelva y Cádiz.

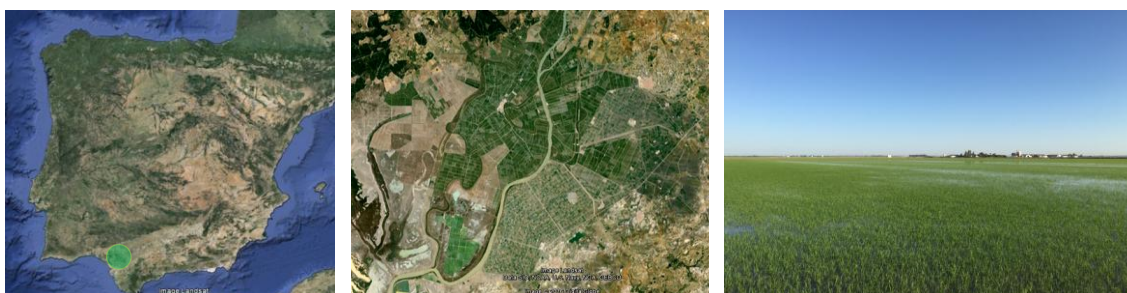


Figura 13. Marismas del Guadalquivir, cultivo de arroz.

Del total de la superficie, unas 38.000 Ha situadas en la parte sevillana se dedican al cultivo de arroz, que se encuentra dividido por el propio río Guadalquivir en las márgenes izquierda y derecha. En la margen derecha, la superficie arroceras se extiende desde la vega de La Puebla del Río por el norte hasta el paraje denominado Veta la Palma por el sur, delimitando con el río Guadalquivir al este y con el río Guadiamar al oeste, y está comprendida en los términos municipales de Isla Mayor y de La Puebla del Río.

También existen varias agrupaciones en el término municipal de Aznalcázar. En la margen izquierda, el cultivo se extiende desde la vega de Coria del Río por el norte hasta las fincas de Maestranza y Rincón del Prado, y el Poblado de San Leandro por el sur, delimitando con el río Guadalquivir al Oeste y con el cultivo de algodón de los Palacios al este, y está comprendido en los términos municipales de La Puebla del Río, Los Palacios, Coria del Río, Dos Hermanas, Utrera, Lebrija y Las Cabezas. Entre cada una de estas zonas arroceras de las Marismas existen diferencias en cuanto al tipo de suelo, la salinidad y la calidad del agua de riego.

Por último, indicar que el cultivo de arroz en las marismas del Guadalquivir es una actividad que se desarrolla desde principios del siglo XIX, representando esta zona el 8% de la superficie europea dedicada al arroz, y la zona arroceras más productiva del mundo (9.000-10.000kg/Ha).

2. OBJETIVOS

En los últimos años la preocupación por el impacto medioambiental y la dependencia del petróleo para la fabricación de plásticos de síntesis química a gran escala, ha despertado el interés de muchos investigadores para obtener estos productos con rendimientos similares mediante procesos biotecnológicos.

Los resultados de estos estudios han demostrado la existencia de microorganismos capaces de sintetizar compuestos precursores de plásticos, lo que ha dado lugar a los denominados bioplásticos.

Con estos antecedentes, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral consiste en la obtención de precursores de polímeros para la síntesis de bioplásticos, concretamente monómeros de uretano a partir de 2,3-butanodiol, así como la mejora en la producción y el aprovechamiento de residuos como materia prima, que pudieran dar lugar a procesos económicamente rentables en la industria y respetuosos con el medio ambiente. Este objetivo ha sido dividido en los siguientes objetivos específicos:

- Aislar enterobacterias asociadas a plantas de arroz de los arrozales de las marismas del Guadalquivir: estudiar la diversidad en las distintas zonas de muestreo y en las distintas partes de la planta de arroz.
- Seleccionar enterobacterias productoras de 2,3-BDO a partir de azúcares fermentables.
- Evaluar el potencial de las bacterias seleccionadas para fermentar carbohidratos.
- Obtener enterobacterias sobreproductoras de 2,3-BDO mediante manipulación genética de las rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de este compuesto.
- Estudiar la posibilidad de aprovechar y valorizar residuos agroindustriales para la obtención de azúcares fermentables como materia prima en la producción de 2,3-BDO.
- Estudiar el efecto de la eliminación de factores de patogenicidad sobre la producción de 2,3-BDO en bacterias seleccionadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTREO Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

3.1.1. Toma de muestras

Las muestras para el estudio se tomaron en diferentes zonas de los arrozales de las marismas del Guadalquivir, y más concretamente en tres tablas o unidades de cultivo distintas dentro de cada zona de recogida. Como se muestra en la **figura 14**, las zonas de recogida fueron:

- Zona “**La Compañía**” (C): zona situada en la margen izquierda del río Guadalquivir, con agua de riego de buena calidad en cuanto a contenido salino.
- Zona “**Los Pobres**” (A): zona situada en la margen derecha del río, con agua de riego de mayor contenido salino y por lo tanto de una calidad inferior para el cultivo.
- Zona “**Hato Ratón**” (HR): zona situada en la margen derecha del río, con agua de riego de pozo y sistema de cultivo ecológico.

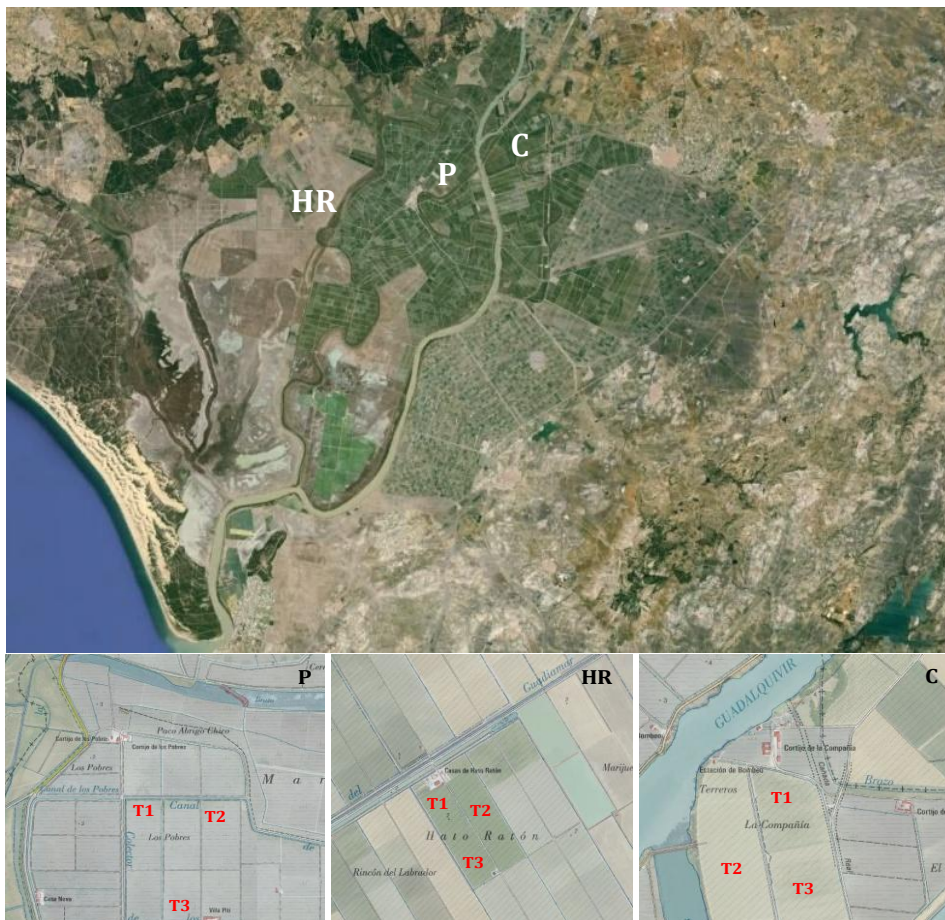


Figura 14. Situación de las diferentes zonas de recogida en las marismas del Guadalquivir y de las unidades de cultivo o tablas (T1, T2, T3) dentro de cada zona de recogida; Los Pobres (A), Hato Ratón (B) y La Compañía (C). Imagen obtenida a partir de plano de GoogleEarth (<http://earth.google.com>).

Las plantas de arroz de las distintas zonas fueron arrancadas de raíz junto con parte de la rizosfera (**figura 15**) y trasladadas al laboratorio con el fin de ser tratadas para el posterior aislamiento de los microorganismos presentes en las mismas.



Figura 15. Toma de muestras de plantas de arroz.

3.1.2. Tratamiento de muestras

Una vez recogidas, las plantas de arroz se dividieron en tres partes: parte aérea, que comprende tallos y hojas, suelo rizosférico y raíces (**figura 16**).

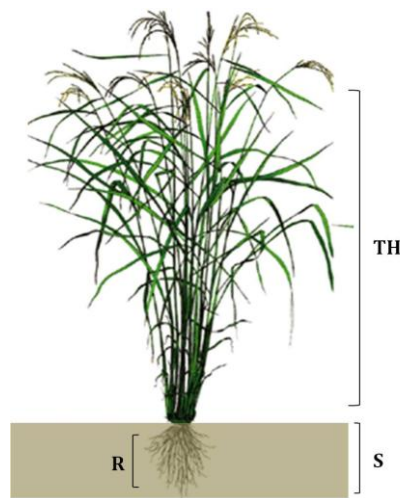


Figura 16. Distintas divisiones de la planta de arroz: tallos y hojas (TH), raíces (R) y suelo rizosférico (S).

3.1.2.1. Tratamiento de muestras de suelo rizosférico

Las muestras de suelo rizosférico fueron obtenidas limpiando la tierra pegada a las raíces y recojiéndola en tubos Falcon. Las muestras que no se analizaron inmediatamente se guardaron a -80°C para su conservación.

3.1.2.2. Tratamiento de muestras de raíz y parte aérea

Las raíces y parte aérea fueron esterilizadas superficialmente con NaClO al 5% antes de proceder con el aislamiento de los microorganismos objeto de estudio. Para ello se lavaron las raíces con etanol al 70% durante 5 minutos, posteriormente con NaClO al 5% durante 10 minutos y finalmente se hicieron 5-6 lavados con agua estéril. Una vez esterilizadas, se tomaron cantidades de 1 gramo de raíces o parte aérea de cada zona de recogida y se trituraron junto con 5 mL de NaCl 0.9% estéril con el homogeneizador POLYTRON® PT 2100 (Kinematica, Lucerna, Suiza). Las muestras que no se analizaron inmediatamente se guardaron a -80°C para su conservación.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se detalla la composición de los diversos medios de cultivo utilizados. El pH de todos ellos se ajustó a un valor aproximado de 7 con NaOH 1M y la esterilización se realizó en autoclave a una temperatura de 121°C durante 20 minutos, a excepción del medio Mossel, que no se autoclavó y se esterilizó calentándolo a 100°C durante 30 minutos.

Medio TSB. Se preparó a partir de un preparado comercial de la marca Difco (Nueva Jersey, EE.UU.), a una concentración de 30 g/L, con la siguiente composición:

Digerido pancreático de caseína	17 g/L
Peptona de soja	3 g/L
Dextrosa	2.5 g/L
NaCl	5 g/L
K ₂ HPO ₄	2.5 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio Mossel. Medio de enriquecimiento para enterobacterias. Se preparó a partir de un preparado comercial de la marca Oxoid, a una concentración de 45 g/L, con la siguiente composición:

Digerido pancreático de gelatina	10 g/L
Verde brillante	15 mg/L
Dextrosa	5 g/L
NaCl	5 g/L
Na ₂ HPO ₄	8 g/L
Oxgall	20 g/L
KHPO ₄	2 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio MacConkey agar. Medio de diferenciación selectivo para enterobacterias y otros bacilos gram negativos. Se preparó a partir de un preparado comercial de la marca Oxoid (Hampshire, Reino Unido), a una concentración de 35 g/L, con la siguiente composición:

Peptona	20 g/L
Lactosa	10 g/L
NaCl	5 g/L
Sales biliares	5 g/L
Rojo neutro	0.075 g/L
Agar	12 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio Clark-Lubs. Medio recomendado para las pruebas de rojo de metilo y Voges-Proskauer para la diferenciación del grupo coli-aerogenes. Se preparó a partir de un preparado comercial de la marca Oxoid (Hampshire, Reino Unido), a una concentración de 17 g/L, con la siguiente composición:

Peptona	7 g/L
Glucosa	5 g/L
K ₂ HPO ₄	5 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio agua de peptona. Medio recomendado para estudiar la fermentación de carbohidratos, así como para realizar la prueba de indol. Se preparó a partir de un preparado comercial de la marca Oxoid (Hampshire, Reino Unido), a una concentración de 15 g/L, con la siguiente composición:

Peptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio agar citrato de Simmons. Medio para la diferenciación de bacterias gram negativas mediante la utilización de citrato. Se preparó a partir de un preparado comercial de la marca Oxoid (Hampshire, Reino Unido), a una concentración de 23 g/L, con la siguiente composición:

MgSO ₄	0.2 g/L
NaNH ₄ HPO ₄ · 4 H ₂ O	0.8 mg/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.2 g/L
NaCl	5 g/L
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	2 g/L
Azul de bromotimol	0.08 g/L
Agar	15 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio LB (Luria Bertani). Medio utilizado para mantener y propagar cepas de *E. coli* (Miller, 1972). Se preparó en el laboratorio a partir de sus distintos componentes adquiridos en la casa Difco (Nueva Jersey, EE.UU.), en las siguientes proporciones:

Triptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Para preparar LB agar, se añadió a la anterior mezcla agar a una concentración de 15 g/L.

Medio EA. El medio de cultivo EA se preparó en base al trabajo de Petrov y Petrova (2009), con la siguiente composición:

Na ₂ HPO ₄	6.8 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
Na ₂ SO ₄	0.28 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.35 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.26 g/L
KCl	0.75 g/L
Ácido cítrico	0.42 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Solución de microelementos*	3 mL/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

* ZnCl₂ (34.2 g/L), MnCl₂ (10 g/L), H₃BO₃ (0.31 g/L), FeCl₃ (2.7 g/L), CuCl₂ (0.85 g/L)

Medio para prueba de utilización de carbohidratos (rojo fenol). Para determinar la utilización de azúcares por medio de la prueba de rojo fenol, se preparó un medio de cultivo con la siguiente composición:

Peptona	20 g/L
NaCl	5 g/L
Rojo fenol	5 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio SOB (Super Optimal Broth). Medio utilizado para obtener una alta eficiencia de transformación de células de *E. coli*.

Peptona	20 g/L
NaCl	5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
KCl	0.2 g/L
MgCl ₂	1 g/L
MgSO ₄	2.5 g/L
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Medio P1. autohidrolizado de residuo de piña.

Medio P2. Medio preparado a partir de autohidrolizado de residuo de piña.

Autohidrolizado de residuo de piña c.s.p. 1L
 Extracto de levadura 5 g/L

Medio N1. autohidrolizado de residuo de naranja.

Medio N2. Medio preparado a partir de autohidrolizado de residuo de naranja.

Autohidrolizado de residuo de naranja c.s.p. 1L
 Extracto de levadura 5 g/L

3.3. SOLUCIONES TAMPÓN

Tampón imidazol. Tampón utilizado en la preparación de soluciones para determinar actividades enzimáticas.

Imidazol-HCl, pH 7 50 mM
 KCl 0.1 M
 MgCl₂ 5 mM
 H₂O c.s.p. 1 L

Tampón fosfato pH 7. Tampón utilizado en la preparación de soluciones para determinar actividades enzimáticas.

Na₂HPO₄ 0.2M 305 mL/L
 NaH₂PO₄ 0.2M 195 mL/L
 H₂O c.s.p. 1 L

3.4. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS

En la **tabla 2** se incluyen los compuestos antimicrobianos adicionados a los medios de cultivo cuando resultó necesario. Todos ellos fueron proporcionados por la casa Sigma. Se muestran los disolventes y concentraciones de las soluciones stock, así como la concentración habitual del uso de los antibióticos para *E. coli*.

Las soluciones preparadas en agua destilada se esterilizaron por filtración mediante filtros de membrana de 0.22 µm de diámetro (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Todas las soluciones se conservaron a -20°C.

Tabla 2. Antibióticos utilizados en este trabajo.

ANTIBIÓTICO	DISOLVENTE	CONCENTRACIÓN STOCK (mg/mL)	CONCENTRACIÓN FINAL PARA <i>E.coli</i> (µg/mL)
Ampicilina	H ₂ O destilada estéril y NaOH	100	150
Estreptomina	H ₂ O destilada estéril	100	20
Gentamicina	H ₂ O destilada estéril	200	20
Kanamicina	H ₂ O destilada estéril	100	50

3.5. MÉTODOS DE AISLAMIENTO

Para el aislamiento se tomaron cantidades de 1 gramo de cada zona de recogida, cada tabla y cada parte de la planta de arroz, que se inocularon en matraces con 100 mL de medio TSB, y se incubaron a 28 °C durante 24 horas. De los cultivos anteriores se tomaron alícuotas de 1 mL y se pasaron a otros matraces con 100 mL de medio de enriquecimiento Mossel, que fueron incubados a 37°C durante 24 horas.

A partir de los cultivos en medio Mossel, se realizaron diluciones seriadas en NaCl 0.9%, y se tomaron alícuotas de 100 µL de las correspondientes a 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ para sembrarlas en placas de agar MacConkey, que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se seleccionaron las colonias de color rosado en este medio, por ser indicativas de fermentación de lactosa, característica propia de enterobacterias. Las colonias seleccionadas se purificaron sembrándolas en placas independientes de agar MacConkey.

3.6. MATERIAL BIOLÓGICO

3.6.1. Cepas bacterianas

En la [tabla 3](#) se muestra la relación de cepas que se han utilizado en el presente trabajo.

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

CEPA BACTERIANA	CARACTERÍSTICAS	FUENTE O REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F, lacZ ΔM15, recA1, hsdR17, supE44, Δ(lac ZYA arg F)	Hanahan, 1983
<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 684 ^T	Cepa silvestre	CECT ¹
<i>Enterobacter aerogenes</i> SC10	Cepa silvestre	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i> EAB	<i>Enterobacter aerogenes</i> SC10 con sobreexpresión del gen <i>bdh</i> . Km ^R	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i> EALD	<i>Enterobacter aerogenes</i> SC10 con delección del gen <i>ldhA</i> . Km ^R	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i> EAG	<i>Enterobacter aerogenes</i> SC10 con sobreexpresión del gen <i>gapA</i> . Gm ^R	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i> EAGB	<i>Enterobacter aerogenes</i> SC10 con sobreexpresión de los genes <i>gapA</i> y <i>bdh</i> . Gm ^R	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i> EALD-GB	EALD con sobreexpresión de los genes <i>gapA</i> y <i>bdh</i> . Gm ^R , Km ^R	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i> EA-SF	<i>Enterobacter aerogenes</i> SC10 con delección del gen <i>fimD</i> . Km ^R	Este trabajo
<i>Enterobacter aerogenes</i> EAGB-SF	EAGB con delección del gen <i>fimD</i> . Km ^R	Este trabajo

¹CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

3.6.2. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas

La temperatura habitual de crecimiento para las cepas del estudio fue de 37°C. Los cultivos se realizaron en condiciones de microaerobiosis o, en algunos casos, anaerobiosis. Los cultivos en condiciones de microaerobiosis se desarrollaron de la forma habitual. Los cultivos en condiciones de anaerobiosis se llevaron a cabo en matraces redondos sellados con tapón de septum, creando las condiciones de anaerobiosis haciendo vacío e introduciendo argón.

Para conservar las cepas se prepararon cultivos líquidos de cada una de ellas en medio TSB, que se conservaron en criotubos junto con glicerol al 40% en relación 1:1 cultivo/glicerol, mediante congelación a -20°C y -80°C.

3.6.3. Plásmidos

En la [tabla 4](#) se presentan los plásmidos utilizados en la presente Tesis Doctoral.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	FUENTE O REFERENCIA
pGEM-T	Amp ^R , vector de clonación	Promega ¹
pUC4-KIXX	Derivado de pUC4K. Km ^R	Vieira y Messing, 1982
pME-LDH	Amp ^R , gen <i>ldhA</i> clonado en pGEM-T	Este trabajo
pJQ200-SK	Gm ^R , <i>sac B</i> , vector suicida	Quandt y Hynes, 1993
pRK600	Plásmido "helper", oriColE1, Tra ⁺ , Cm ^R	Kessler <i>et al.</i> , 1992
pBBR1-MCS2	Vector de clonación. Km ^R , pBBR1 replicon, mob ⁺	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1-MCS5	Vector de clonación. Gm ^R , pBBR1 replicon, mob ⁺	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pME1-kLDH	Km ^R , derivado de pME-LD en el que se ha introducido un cassette de km en el gen <i>ldhA</i>	Este trabajo
pME2-kLDH	Gm ^R , derivado de pJQSK200, con la construcción de pME1-Kldh	Este trabajo
pME-GP	Gm ^R , gen <i>gapA</i> clonado en pBBR1-MCS5	Este trabajo
pME-BD	Km ^R , gen <i>bdh</i> clonado en pBBR1-MCS2	Este trabajo
pME-GB	Gm ^R , genes <i>gapA</i> y <i>bdh</i> clonados en pBBR1-MCS5	Este trabajo
pME-F	Amp ^R , gen <i>fimD</i> clonado en pGEM-T	Este trabajo
pME-FX	Amp ^R , derivado de pME-F con inserción de punto <i>Xho I</i> en el gen <i>fimD</i>	Este trabajo
pME-FXK	Amp ^R , Km ^R , derivado de pME-FX con cassette de km insertado en el gen <i>fimD</i>	Este trabajo
pME2-FXK	Gm ^R , Km ^R , derivado de pJQSK200, con la construcción de pME-FXK	Este trabajo

¹Promega, Wisconsin, EE.UU.

3.7. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ADN

3.7.1. Extracción de ADN genómico

La mayor parte de las extracciones de ADN fueron llevadas a cabo mediante kit comercial. Para ellos, en primer lugar se inocularon las distintas cepas en tubos de ensayo con 5 mL de medio LB, que fueron incubados a 37°C durante 24 h. Tras la incubación las células se recogieron por centrifugación, y a partir del pellet obtenido se extrajo el ADN genómico utilizando el kit comercial Nucleospin® Tissue (Macherey Nagel, Düren, Alemania).

Para las amplificaciones por PCR-ERIC la extracción de ADN genómico de las cepas se realizó utilizando resina Chelex 100® (Bio-Rad, California, EE.UU.), por ser el método optimizado para este tipo de PCR. Para ello se utilizó el protocolo descrito a continuación, siguiendo el método descrito por Walsh *et al.* (1991).

Protocolo de extracción de ADN con resina Chelex®

1. Resuspender una colonia del microorganismo de interés en 300 µL de NaCl 1M estéril
2. Centrifugar durante 5 min a 6000 r.p.m.
3. Descartar sobrenadante
4. Resuspender pellet con 300 µL de H₂O bidestilada estéril
5. Centrifugar durante 5 min a 6000 r.p.m.
6. Descartar sobrenadante
7. Agregar 200 µL de resina al 6%, mezclar con vortex
8. Incubar a 56°C durante 20 min
9. Incubar a 99°C durante 8 min

3.7.2. Extracción de ADN plasmídico

Se realizaron cultivos en medio LB de las cepas hospedadoras en tubos de ensayo con 5 mL de medio LB con el correspondiente antibiótico y fueron incubados a 37°C durante 24 h. Tras la incubación, las células se recogieron por centrifugación y a partir del pellet obtenido se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit comercial DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea).

3.7.3. Determinación de la concentración y pureza del ADN

La pureza y concentración del ADN extraído fueron determinadas con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (la unidad de A_{260} corresponde a una concentración de ADN de 50 $\mu\text{g/ml}$). Para determinar la pureza del ADN se midió además la absorbancia a 280 y 230 nm y se anotaron las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , con el objeto de determinar la presencia de contaminantes orgánicos (absorben a 230 nm) o proteínas (absorben a 260 nm) en las muestras. Se aceptó que un ADN era puro con una relación $A_{260}/A_{280} \sim 1.8$ y una relación A_{260}/A_{230} 1.8-2.2.

3.7.4. Amplificación de ADN mediante PCR

3.7.4.1. PCR

Para la amplificación de fragmentos de ADN se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siguiendo las indicaciones de Sambrook y Russel (2001). Se empleó un termociclador modelo C1000 (Bio-Rad, California, EE.UU.).

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 25 μL , variando las concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción en función de la enzima *Taq* ADN polimerasa utilizada en cada caso y según instrucciones de cada fabricante. De la misma forma, el número de ciclos, el tiempo de elongación y la temperatura de hibridación de los primers variaron según el experimento realizado:

Condiciones de las reacciones de PCR llevadas a cabo en este trabajo

Amplificación del gen <i>ADNr 16S</i>	Amplificación del gen <i>ldhA</i>	Amplificación del gen <i>fimD</i>
1. 95 °C 5'	1. 95 °C 5'	1. 95 °C 5'
2. 95°C 1'	2. 95°C 1'	2. 95°C 1'
3. 52°C 2'	3. 55°C 2'	3. 52°C 2'
4. 72°C 1'30''	4. 72°C 2'	4. 72°C 2'
5. 72°C 7'	5. 72°C 7'	5. 72°C 7'
(2-4) x 30 ciclos	(2-4) x 30 ciclos	(2-4) x 30 ciclos
Amplificación del gen <i>gapA</i>	Amplificación del gen <i>bdh</i>	Mutagénesis dirigida por PCR
1. 94 °C 5'	1. 94 °C 5'	1. 94 °C 5'
2. 94°C 15''	2. 94°C 15''	2. 95°C 15''
3. 60°C 30'''	3. 60°C 30'''	3. 65°C 2'
4. 72°C 1'	4. 72°C 1'	4. 68°C 4'
5. 72°C 7'	5. 72°C 7'	5. 68°C 7'
(2-4) x 30 ciclos	(2-4) x 30 ciclos	(2-4) x 30 ciclos

3.7.4.2. PCR fingerprinting

La amplificación de las secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC) se llevó a cabo mediante PCR-ERIC, empleando un termociclador modelo C1000 (Bio-Rad, California, EE.UU.) y siguiendo las condiciones establecidas en el trabajo de De Bruijn (1992).

3.7.4.3. Primers utilizados

En la **tabla 5** se muestra la relación de primers que se han utilizado en este trabajo.

Tabla 5. Primers utilizados en este trabajo.

PRIMER	SECUENCIA (5' --> 3')
16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16R1488	CGGTTACCTTGTTAGACTTCACC
ERIC1R	TACATTCGAGGACCCCTAAGTG
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG
GenomF	CTCGAGATTTTACAATCGCCCACCAG
GenomR	GGGAGCACAAAAGGGGAAG
gapA_F	ATTCTCGAGCACTAACAAATAGCTGGTGG
gapA_R	AATAAGCTTACCGAAGCCGCTCTTATTGA
bdh_F	TATAAGCTTCCAGCTACACCTGAGTCAAA
bdh_R	ATAGAGCTCGGCAAACCATGTCAGAGCTT
FimD_F	TGAGACCGGAGGGACTATGT
FimD_R	ATACTGCCGCTCTGATTGCT
XhoFim_1	ATTCTCGAGACCAGTAGGTCTGATGGCTG
XhoFim_2	AATCTCGAGACCGCAAGGCGGACCAGCA

3.7.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La comprobación de los productos de PCR se llevó a cabo por electroforesis en gel horizontal de agarosa, mediante el siguiente protocolo:

Protocolo de electroforesis en gel de agarosa

1. Gel de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5 X
2. Tinción del gel con RedSafe™ 20000x (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea)
3. Secado del gel a temperatura ambiente
4. Carga de muestras y marcador peso molecular 1 Kb (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea)
5. Migrado en cubeta con tampón TBE, 20 min, 100V
6. Observación con transiluminador luz UV

3.7.6. Secuenciación de ADN

El análisis por secuenciación de los fragmentos de ADN en este trabajo ha sido realizado por la empresa Stab Vida (Caparica, Portugal) por el método de Sanger.

3.7.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción

La digestión de ADN se realizó en las condiciones óptimas para cada enzima de restricción, según indicaciones del fabricante (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.).


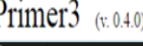
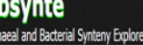




3.7.8. Ligación de fragmentos de restricción

Para las reacciones de ligación se calcularon las proporciones vector:inserto adecuadas en función del tamaño de los fragmentos a ligar. Se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) según indicaciones del fabricante.

3.8. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

En la **tabla 6** se describen los programas bioinformáticos utilizados para los distintos análisis de ADN llevados a cabo en este trabajo.

Tabla 6. Programas bioinformáticos utilizados en este trabajo para el análisis de ADN.

PROGRAMA	UTILIDAD
 BDGP N.N. Promoter prediction	Localización de promotores
 Primer3 (v. 0.4.0)	Diseño de primers
 Absynte Archaeal and Bacterial Synteny Explorer	Estudio de contextos genómicos
 SeqMan Pro	Análisis y corrección de secuencias
 EzTaxon	Comparación de secuencias con bases de datos
 Blast	Comparación de secuencias con bases de datos
 NebCutter NEBcutter V2.0	Obtención de mapas de restricción

3.9. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO

3.9.1. Conjugación

La transferencia de plásmidos por este método desde la bacteria *E. coli* a las cepas de *E. aerogenes* utilizadas en este trabajo, se realizó según el modelo de conjugación triparental, utilizando el plásmido pRK600 como plásmido “helper” (Kessler *et al.*, 1992).

3.9.2. Transformación

El método de transformación utilizado fue el de electroporación. Como células competentes se utilizaron células de *E. coli* DH5 α preparadas en el laboratorio siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

Preparación de células electrocompetentes

1. Pre-inóculo en tubo de ensayo de 5 mL de medio LB de la bacteria a preparar
2. Incubación: 37°C, 24 h
3. Inoculación en matraces con 50 mL de medio LB
4. Incubación a 37°C hasta alcanzar DO₆₀₀ de 0.4-0.6
5. Enfriamiento del cultivo en hielo durante 20 min, transferencia a un tubo Falcon enfriado
6. Centrifugación a 4°C, 10000 r.p.m., 8 min
7. Lavado 3 veces del pellet con 5 mL de glicerol helado al 10%
8. Resuspensión del pellet final en 200 μ L de glicerol al 10%
9. Distribución de las células competentes en alícuotas de 50 μ L, conservación a -80°C

La electroporación se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo, elaborado a partir de los descritos por Ausubel *et al.* (1987) y Miller y Nickoloff (1995):

Electroporación

1. Enfriamiento de cubetas de electroporación en hielo
2. Ajuste de electroporador MicroPulser (Bio-Rad, California, EE.UU.) según bacteria a transformar
3. Adición de 2 μ L del ADN plasmídico a transformar a 50 μ L de células electrocompetentes
4. Transferencia de la mezcla anterior a cubeta de electroporación
5. Aplicación de pulso eléctrico
6. Adición inmediata de 800 μ L de medio SOB
7. Incubación de la mezcla a 37°C durante 1 h
8. Siembra en placas de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente

3.9.3. Recombinación homóloga

Para la obtención de mutantes por recombinación homóloga se utilizó el plásmido suicida por sacarosa pJQ200-SK, en el que se clonaron los distintos genes diana interrumpidos por un cassette de resistencia a determinado antibiótico según la estrategia. Este plásmido se transfirió desde células de *E. coli* DH5 α a células de *E. aerogenes* mediante un proceso de conjugación triparental, anteriormente descrito (apartado 3.9.1.). Los conjugantes se seleccionaron en medio LB con el antibiótico correspondiente y sacarosa al 10%, asegurando así en la cepa receptora la adquisición de la resistencia y por tanto la incorporación del gen interrumpido, y la eliminación del vector pJQ200-SK.















3.10. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

3.10.1. Características morfológicas

3.10.1.1. Características macroscópicas

Para determinar las características macroscópicas de las cepas utilizadas en este trabajo se llevó a cabo una siembra por aislamiento de éstas en placas de Petri con medio TSA, y se incubaron a 37°C durante 24 h. A partir de las colonias obtenidas, visualmente, se evaluaron los aspectos que se recogen en la [tabla 7](#).

Tabla 7. Diferentes aspectos tenidos en cuenta para determinar la morfología de las colonias bacterianas.

FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE
Puntiforme 	Entero 	Plana 	Lisa o rugosa
Circular 	Ondulado 	Elevada 	Mate o brillante
Rizoide 	Lobulado 	Convexa 	Seca o cremosa
Irregular 	Filamentoso 	Crateriforme 	
Filamentosa 		Acuminada 	

3.10.1.2. Morfología

Para determinar la morfología de las bacterias se llevaron a cabo diferentes tinciones:

Tinción de Gram. Dicha tinción se realizó siguiendo la técnica de Gram convencional partiendo de cultivos recientes de las cepas (Moyes *et al.*, 2009).

Tinción de cápsula. Para determinar la presencia o no de cápsula, se llevó a cabo una tinción negativa, específica para observar la cápsula bacteriana. Mediante esta tinción, el fondo de la preparación queda teñido, sin embargo, los polisacáridos capsulares rechazan la tinta china y la cápsula aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos. La tinción se llevó a cabo mediante un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio a partir de de datos de la bibliografía (Tortora *et al.*, 2007):

Tinción negativa

1. Extensión sobre portaobjetos de colonia de cultivo fresco
2. Fijación al aire
3. Gota de tinta china en un extremo del portaobjetos
4. Frotis con tinta china sobre la extensión
5. Secado al aire
6. Tinción con fucsina básica, 1 min
7. Lavado con H₂O destilada
8. Secado al aire
9. Observación al microscopio con objetivo de inmersión

3.10.2. Características fisiológicas

3.10.2.1. Crecimiento

Para establecer las posibles diferencias en el patrón de crecimiento entre las distintas cepas objeto de estudio, en distintas condiciones de cultivo, se realizaron curvas de crecimiento. Para ello se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Curva de crecimiento

1. Pre-inóculo de la cepa en tubo de ensayo con 5 mL de medio de cultivo a partir de colonia fresca
2. Incubación: 37°C, 24 h
3. Inoculación en matraces con 50 mL de medio de cultivo
4. Incubación: 37°C
5. Medida de DO₆₀₀ en espectrofotómetro a partir de la extracción de 1 mL de cultivo hasta alcanzar fase estacionaria. Blanco: medio de cultivo estéril

A partir de los datos de densidad óptica obtenidos se elaboró una gráfica para representar la curva con las distintas fases de crecimiento (**figura 17**) y se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) de cada cepa a partir de la ecuación de la pendiente de la curva calculada en fase exponencial.

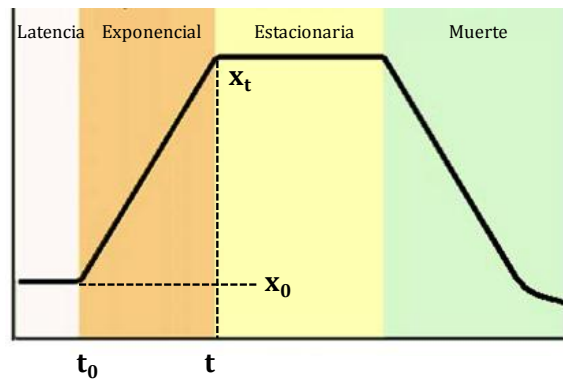


Figura 17. Patrón de crecimiento bacteriano típico. Parámetros para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento.

$$\text{Pendiente} = \mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{X_t - X_0}{(t - t_0)}$$

μ = velocidad específica de crecimiento

t_0 = tiempo en h al que comienza la fase exponencial

t = tiempo en h al que termina la fase exponencial

X_0 = valor de DO_{600} al principio de la fase exponencial

X_t = valor de DO_{600} al final de la fase exponencial

3.10.2.2. Tolerancia a diversos factores

Para determinar la tolerancia de las distintas cepas a diversos factores que podrían afectar a su crecimiento, así como a la producción de 2,3-BDO, o que pudieran resultar una ventaja para la producción industrial de este compuesto, se llevaron a cabo ensayos de recuento de UFC en placas de medio TSA como base, modificado según los factores a evaluar. En primer lugar se prepararon cultivos en tubos de ensayo con 5 mL de medio TSB, que se incubaron a 37°C durante 24 h.

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de los cultivos y se sembraron alícuotas de 100 μ L en placas de medio TSA con las diferentes condiciones y se incubaron durante 48 h. Tras la incubación se llevó a cabo el recuento de UFC en cada una de las placas, y se expresaron los resultados según la siguiente fórmula: $\text{Ufc/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colonias en placa} \times \text{inverso de la dilución}/0.1$.

Tolerancia a pH. Para evaluar la tolerancia a distintos valores de pH, se prepararon placas de TSA ajustando el pH a valores de 4, 5, 6, 7 y 8.

Tolerancia a sacarosa. Para evaluar la tolerancia a distintas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo, se prepararon placas de medio TSA adicionando sacarosa para obtener concentraciones finales de 100, 200 y 300 g/L de sacarosa.

Tolerancia a 2,3-BDO. Para evaluar la tolerancia a distintas concentraciones de 2,3-BDO en el medio de cultivo, se prepararon placas de medio TSA adicionando 2,3-BDO para obtener concentraciones finales de 50, 60, 70, 100 y 150 g/L de 2,3-BDO.

Tolerancia a temperatura. La tolerancia de las cepas a la temperatura se evaluó mediante el crecimiento en placas de medio TSA incubadas a diferentes temperaturas: 28°C, 37°C y 45°C.

3.10.3. Pruebas bioquímicas

Con el objeto de determinar las características metabólicas de las bacterias del trabajo, se realizaron una serie de pruebas bioquímicas.

3.10.3.1. Prueba oxidasa.

Se siguió el método de Kovacs (1956). Para ello, sobre un cuadrado de papel de filtro se extendió con asa de siembra una colonia bacteriana procedente de un cultivo fresco en agar nutritivo y sobre la muestra se añadieron unas gotas de reactivo diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% (Difco, Nueva Jersey, EE.UU.). Se consideró un resultado positivo la coloración azul-violeta del papel del filtro al cabo de 1 min a temperatura ambiente.

3.10.3.2. Prueba catalasa.

Sobre un portaobjetos se realizó una extensión bacteriana con un asa de siembra partiendo de una colonia de un cultivo fresco en agar nutritivo. Sobre esta extensión se colocó una gota de peróxido de hidrógeno y se observó la formación inmediata de burbujas, determinando un resultado positivo la formación de burbujas bien visibles.

3.10.3.3. Pruebas IMViC

Se llevaron a cabo una serie de pruebas bioquímicas denominadas IMViC que consisten en: prueba de indol, prueba de rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer y prueba de citratos.

Este conjunto de pruebas permite diferenciar bacterias dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente se establecen diferencias entre *E. coli* y el grupo formado por los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. Para este grupo, los resultados de las pruebas IMViC son (---+), criterio que se siguió para la selección de los aislados, ya que los géneros del grupo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, son los que se han descrito anteriormente como endófitos habituales de plantas de arroz con características de promoción del crecimiento de plantas y posibles productores de biopolímeros.

Prueba de indol: se determina si la bacteria posee la enzima triptofanasa, que hidroliza el triptófano en indol y alanina. El indol se detecta empleando el reactivo específico de Kovacs. Para dicha determinación, se inocularon las bacterias en tubos de ensayo con 5 mL de medio agua de peptona (que contiene triptófano). Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 h, y tras esta incubación se añadieron unas gotas de reactivo de Kovacs para revelar la prueba, identificando como reacciones positivas aquellas que generaron un anillo rosa-rojizo en la superficie del cultivo, resultado de la reacción entre el indol producido y el p-dimetilamino benzaldehído contenido en el reactivo de Kovacs.

Prueba de rojo de metilo: mediante esta prueba se determina si la bacteria lleva a cabo la fermentación ácido-mixta. Se detecta la formación de ácidos como el acético y fórmico, que son relativamente fuertes y bajan el pH del medio hasta 4-5. Dicho cambio de pH se detecta añadiendo el indicador rojo de metilo al cultivo.

Para esta determinación se inocularon las bacterias en tubos de ensayo con 5 mL de medio de Clark-Lubs, y se incubaron a 37°C durante 48 h. Tras la incubación se añadieron a los tubos unas gotas de rojo de metilo y se observó si se producía viraje del color del medio. Las reacciones positivas se identificaron como aquellas en las que el medio viró a color rojo.

Prueba de Voges-Proskauer: mediante esta prueba se detecta la fermentación butanodiólica. En esta fermentación se produce un precursor del butanodiol, acetoína, que se oxida en presencia de oxígeno para dar lugar a diacetilo. El diacetilo origina una coloración roja al reaccionar con los restos guanidínicos de algunos aminoácidos de la peptona del medio de cultivo.

Para incrementar la sensibilidad de la reacción se utiliza el reactivo alfa-naftol. Para la realización de esta prueba se inocularon las bacterias en tubos de ensayo con 5 mL de medio Clark-Lubs, mismo medio utilizado para la prueba anterior, y se incubaron a 37°C durante 48 h.

Tras la incubación, se añadieron a los tubos unas gotas de alfa-naftol, y se dejaron en reposo durante 20 minutos. Posteriormente se efectuó la lectura, considerando un resultado positivo la aparición de una coloración roja y un resultado negativo la no aparición de dicha coloración.

Prueba de citratos: mediante esta prueba se determina la utilización de citrato como única fuente de carbono y energía. Se emplea un medio con citrato como única fuente carbonada, el medio citrato de Simmons, que contiene citrato sódico y un indicador ácido-base (azul de bromotimol). Se detecta la alcalinización del medio por el consumo del citrato y el consecuente viraje del color verde del medio hacia azul. Para detectar la utilización de citrato, las bacterias se sembraron en tubos de ensayo preparados con agar citrato de Simmons mediante la técnica de agar inclinado. Se incubaron a 37°C durante 48 h, y tras la incubación se llevó a cabo la lectura. Las reacciones positivas fueron aquellas en las que se produjo un viraje del color del medio de verde a azul.

3.10.3.4. Batería de pruebas API 20E

Se llevó a cabo una batería de pruebas bioquímicas utilizando el kit comercial API 20E® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las galerías fueron incubadas a 37°C durante 24 h, y posteriormente se procedió a su lectura e interpretación según indicaciones del fabricante.

3.10.3.5. Producción de ácido y gas a partir de carbohidratos

La capacidad de producción de ácido y gas a partir de carbohidratos por parte de las diferentes cepas se evaluó empleando un medio de cultivo conteniendo los distintos carbohidratos junto con el indicador ácido-base rojo fenol. Así, si la bacteria inoculada era capaz de fermentar determinado carbohidrato con la consiguiente formación de ácido, se pondría de manifiesto mediante el viraje del color del medio a amarillo, color del indicador a pH ácido (Cowan y Steel, 1982).

El protocolo seguido fue el siguiente: al medio de cultivo con rojo fenol se añadieron los carbohidratos previamente esterilizados por filtración a una concentración final del 1%. Se prepararon tubos de ensayo con una campana de Durham (para detectar la producción de gases) con 5 mL de medio de cultivo, y se inocularon tomando colonias de las distintas cepas de placas con cultivos frescos con asa de siembra.

Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 h. Se efectuaron lecturas de los resultados a las 24 y 48 h de cultivo, observando el viraje del medio (figura 18) y la existencia de burbujas de aire dentro de la campana de Durham.

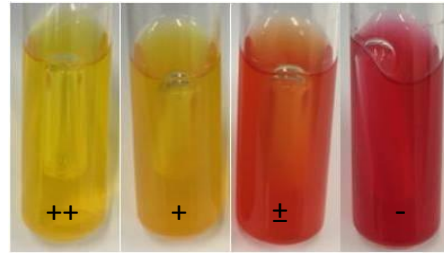


Figura 18. Resultados para la prueba de rojo fenol. +, producción de ácido; ++, producción fuerte de ácido; ±, producción de ácido intermedia; -, resultado negativo.

En otros casos, para determinar la formación de ácido por la fermentación de carbohidratos se utilizó un medio de cultivo como base con CaCO₃, al que se fueron añadiendo soluciones de los distintos azúcares a probar. El medio se distribuyó en placas de Petri que se sembraron con las cepas a ensayar a partir de cultivos frescos, y se incubaron a 37°C durante 24 h. Tras la incubación se llevó a cabo su lectura, considerando un resultado positivo la aparición de un halo de solubilización del medio alrededor de las colonias.

3.10.3.6. Determinación de actividades enzimáticas

Se llevó a cabo un análisis cuantitativo de actividades enzimáticas butanodiol deshidrogenasa (BDH), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y lactato deshidrogenasa (LDH) a partir de extractos libres de células de las diferentes cepas. Los extractos se prepararon mediante un protocolo elaborado a partir del descrito por Lino *et al.* (2002):

Obtención de extracto libre de células

1. Pre-inóculo en tubo de ensayo con 5mL de medio TSB a partir de colonias de cultivo fresco
2. Incubación: 37°C, 24 h
3. Inoculación en matraces con 100 mL de medio TSB
4. Incubación a 37°C hasta alcanzar fase exponencial
5. Recogida de 50 mL del cultivo en un tubo Falcon
6. Centrifugación a 4°C, 8000 r.p.m., 20 min
7. Lavado 2 veces del pellet con tampón fosfato (50 mM, pH7)
8. Resuspensión del pellet final en 20 mL de tampón fosfato (50 mM, pH7)
9. Lisis mediante sonicador a 70 W, 10 pulsos de 60 s, con pausas de 15 s en hielo
10. Centrifugación a 11000 r.p.m., 4°C, 30 min
11. Recuperación del sobrenadante

La concentración en proteínas de los extractos libres de células obtenidos por lisis (figura 19) se determinó mediante espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.).

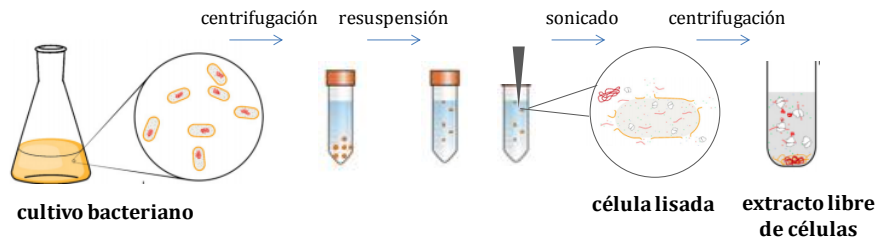


Figura 19. Esquema de obtención de extracto libre de células a partir de cultivo bacteriano.

3.10.3.6.1. Medida de actividad enzimática BDH

La determinación de la actividad enzimática BDH se realizó en base a la siguiente reacción (Nicholson 2008):

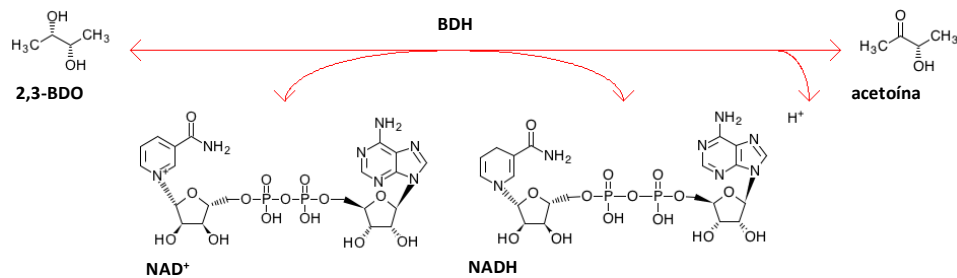


Figura 20. Reacción catalizada por la enzima butanodiol deshidrogenasa. Fuente: KEGG (Kanehisa y Goto, 2000).

Se preparó un tampón de reacción compuesto por NAD⁺ 0.2 mM disuelto en buffer fosfato (pH 7.6, 20 mM). En una cubeta con volumen final de 2 mL, se añadió el tampón de reacción, extracto libre de células a 10 mM, e inmediatamente antes de medir, 2,3-BDO a 0.1 M para iniciar la reacción. A partir de ese momento, se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto mediante espectrofotómetro, para monitorizar la reducción de NAD⁺ a NADH hasta que la absorbancia llegó a un valor estático. El valor de actividad enzimática se cuantificó mediante la fórmula: 1 U actividad BDH= 1 μmol NAD⁺ consumido/min/mg proteína.

La cantidad de NAD⁺ consumida se determinó a partir del valor de su coeficiente de extinción ($\epsilon = 16900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), mediante la ecuación de la ley de Lambert Beer: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ (A = absorbancia, ϵ = coeficiente extinción, c = concentración, l = longitud de paso de la luz).

3.10.3.6.2. Medida de actividad enzimática GAPDH

La determinación de la actividad enzimática GAPDH se realizó en base a la siguiente reacción:

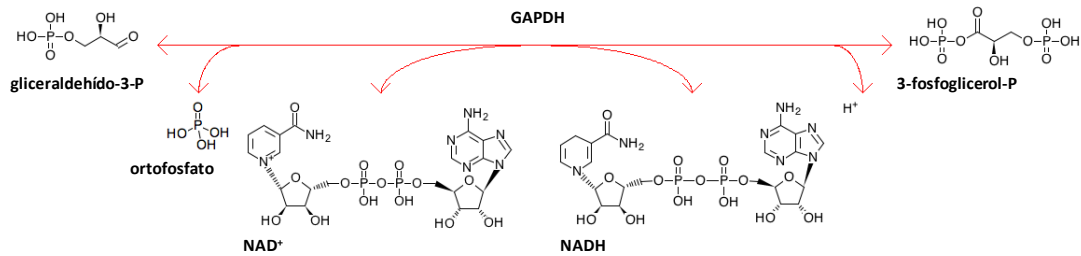


Figura 21. Reacción catalizada por la enzima gliceraldehído-3-P deshidrogenasa. Fuente: KEGG (Kanehisa y Goto, 2000).

Se preparó un tampón de reacción compuesto por trietanolamina 40 mM, EDTA 0.2 mM y NAD⁺ 10mM disueltos en buffer fosfato (pH 7.6, 20 mM), modificando el protocolo descrito por Ferdinand (1964). En una cubeta con volumen final de 2 mL, se añadió el tampón de reacción, extracto libre de células a 10 mM, e inmediatamente antes de medir, gliceraldehído-3-fosfato a 10 mM para iniciar la reacción. Posteriormente se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto mediante espectrofotómetro, para monitorizar la reducción de NAD⁺ a NADH hasta que la absorbancia llegó a un valor estático. El valor de actividad enzimática se calculó mediante la fórmula:

$$1 \text{ U actividad GAPDH} = 1 \mu\text{mol NAD}^+ \text{ consumido/min/mg proteína.}$$

La cantidad de NAD⁺ consumido se determinó a partir del valor de su coeficiente de extinción ($\epsilon = 16900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), mediante la ecuación de la ley de Lambert Beer descrita anteriormente (apartado 3.10.3.6.).

3.10.3.6.3. Medida de actividad enzimática LDH

La determinación de la actividad enzimática LDH se realizó en base a la siguiente reacción reversible:

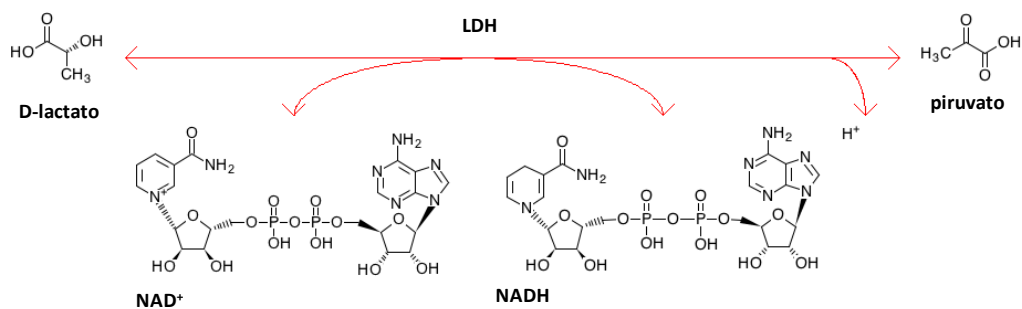


Figura 22. Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa. Fuente: KEGG (Kanehisa y Goto, 2000).

Se preparó tampón imidazol en el que se disolvió NADH 3 mM. En una cubeta con volumen final de 2 mL, se añadió el tampón de reacción, extracto libre de células a 10 mM, e inmediatamente antes de medir, piruvato 5 mM para iniciar la reacción. A continuación se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto mediante espectrofotómetro, para monitorizar la oxidación de NADH a NAD⁺ hasta que la absorbancia llegó a un valor estático. El valor de actividad enzimática se calculó mediante la fórmula:

$$1 \text{ U actividad LDH} = 1 \mu\text{mol NADH consumido/min/mg proteína.}$$

La cantidad de NADH consumida se determinó a partir de su coeficiente de absorción ($\epsilon = 6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mediante la ecuación de la ley de Lambert Beer anteriormente descrita (apartado 3.10.3.6.).

3.11. SENSIBILIDAD FRENTE A ANTIBIÓTICOS

La determinación de la sensibilidad a antibióticos de las cepas de objeto de estudio se llevó a cabo por el método de difusión en agar de Kirby Bauer (Ferraro, 2000). Este método consiste en depositar en la superficie de una placa con medio sólido previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos a estudiar. Cuando el disco entra en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Tras la incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.

Se utilizaron discos comerciales (Bio-Rad, California, EE.UU.) de diámetro conteniendo los siguientes antibióticos: tetraciclina, ampicilina, kanamicina, neomicina, estreptomina, ácido nalidíxico, cloranfenicol y amoxicilina/ácido clavulánico. El protocolo seguido fue el siguiente:

Antibiograma disco-placa

1. Cultivo bacteriano en medio LB hasta turbidez de 0.5 en escala Macfarland
2. Siembra en césped en placa de LB agar de 100 μL del cultivo
3. Colocación de los discos de antibiótico sobre la placa
4. Incubación a 37°C durante 18 h
5. Lectura

La lectura e interpretación del ensayo se llevó a cabo mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición formados y la comparación de dichas medidas con criterios estandarizados de interpretación basados en el método de Kirby-Bauer, según normas del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS, EE.UU.).

Según el diámetro del halo de inhibición existen distintos valores de sensibilidad (resistente, intermedio, sensible) en función de cada antibiótico.

3.12. OBTENCIÓN DE 2,3-BDO

3.12.1. Ensayo de producción de 2,3-BDO mediante fermentación

Para la producción de 2,3-BDO, se realizó un pre-cultivo de cada cepa por triplicado en tubos con 5 mL de medio EA, que se incubaron a 37°C durante 24 h. Tras la incubación, los pre-cultivos se inocularon en matraces con 50 mL de medio EA, al que se añadió la fuente de carbono utilizada en cada caso (glucosa o sacarosa), y se incubaron en condiciones de microaerobiosis a 37 °C.

3.12.2. Recuperación de metabolitos resultantes de la fermentación

Los metabolitos producidos se recuperaron del medio de cultivo mediante la recogida de 5 mL de cada cultivo en distintos momentos durante la incubación y su posterior centrifugación durante 10 min a 7000 r.p.m. para extraer el sobrenadante, a partir del cual se cuantificó la producción de metabolitos.

3.13. OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

3.13.1. Pre-tratamiento de los residuos

Previamente a la extracción de los azúcares presentes en los residuos mediante procesos de hidrólisis, se llevó a cabo un pre-tratamiento mecánico de los mismos consistente en su trituración.

De esta forma se consigue la disminución del tamaño de las partículas y el grado de polimerización de los residuos, facilitando así el proceso de hidrólisis y reduciendo su duración (Delgenes *et al.*, 2003).

3.13.2. Hidrólisis ácida

La extracción de azúcares mediante hidrólisis ácida se llevó a cabo a partir de cantidades variables del residuo a hidrolizar previamente triturado, al que se añadió H₂SO₄ al 0.5% en una proporción 1:8. La mezcla se sometió a autoclave durante 15 min a 120°C y posteriormente se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 8 min, recuperando el sobrenadante y eliminando el pellet resultante.

Al sobrenadante obtenido se añadió una tercera parte de H_2SO_4 al 0.5% con respecto al añadido anteriormente, y volvió a autoclavarse durante 30 min a $120^\circ C$. Una vez autoclavado se neutralizó utilizando $Ca(OH)_2$ y se eliminó el precipitado resultante por centrifugación a 8000 r.p.m. durante 8 min.

3.13.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo empleando el complejo enzimático Biocelulasa W (Biocon, Barcelona, España), con actividad betaglucanasa, hemicelulasa y xilanasa.

El proceso se llevó a cabo a partir del triturado del residuo correspondiente, al que se añadió H_2O en proporción 1:6. El pH se ajustó a 4.6, valor de trabajo de la enzimas empleadas, y se incubó a $55^\circ C$ durante 2-3 h, agitando continuamente. Posteriormente se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 8 min y se recuperó el sobrenadante.

3.13.4. Autohidrólisis

El proceso de autohidrólisis se llevó a cabo, al igual que en los dos casos anteriores, a partir del residuo a tratar previamente triturado. A éste se le añadió H_2O en proporción 1:8 y se autoclavó la mezcla durante 5 min a $120^\circ C$. posteriormente se obtuvo el sobrenadante mediante centrifugación a 8000 r.p.m. durante 8 min.

3.13.5. Detoxificación de los hidrolizados

La detoxificación de los hidrolizados obtenidos se llevó a cabo mediante resina de adsorción, utilizando una columna con resina Amberlite® XAD4. El hidrolizado se hizo pasar por la columna y se recogió la fracción resultante.

Posteriormente se realizaron dos lavados de la columna con H_2O y la resina se lavó con acetona, permitiendo así su posterior reutilización.

3.14. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.14.1. Cuantificación de metabolitos resultantes de la fermentación

3.14.1.1. Cuantificación mediante cromatografía

La cuantificación de 2,3-BDO y ácido succínico se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Se empleó un sistema Agilent 7890A con columna HP-5MS acoplado a un detector de espectrometría de masas 5975C. Como gas portador se utilizó He, a un flujo constante de 0.8 mL/min. La temperatura del inyector fue de 320 °C y se utilizó un sistema split (100:1). El gradiente de temperatura fue de 40 a 280 °C (20°C/min). La temperatura de la línea de transferencia hacia el espectrómetro de masas se ajustó a 280 °C.

El análisis mediante cromatografía de gases se llevó a cabo en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química (Universidad de Sevilla) en algunos casos, y en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC) en otros. Las muestras a medir se procesaron de la siguiente forma:

Recta de calibrado. Se pesaron cantidades de 10, 20, 30 y 40 mg de 2,3-BDO y se depositaron en viales a los que se añadieron 1 mL del medio de cultivo utilizado para la producción de 2,3-BDO, 100 µL de isopentanol (patrón interno) preparado a 10 mg/mL y 1 mL de acetato de etilo al 100%. La mezcla se homogeneizó mediante vortex y se centrifugó a 4000 r.p.m durante 5 min, obteniéndose varias fases. Se recogió la fase de más arriba (fase orgánica), evitando la interfase y se introdujo en un vial para cromatografía que se inyectó en el cromatógrafo.

Preparación de las muestras. La extracción de 2,3-BDO de las muestras para su cuantificación se realizó de la misma forma que la curva de calibrado, sustituyendo en este caso 1 mL de medio de cultivo por 1 mL de nuestra muestra.

3.14.1.2. Cuantificación por método enzimático

La cuantificación de ácido láctico y etanol se llevó a cabo mediante kits comerciales (Nzytech, Lisboa, Portugal) basados en la medida de NADH consumido o producido por la acción de las enzimas que dan lugar a dichos metabolitos.

3.14.2. Cuantificación de sacarosa

3.14.2.1. Cuantificación por cromatografía

La cuantificación de la sacarosa restante de la producción de 2,3-BDO mediante cromatografía se llevó a cabo por el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El aparato utilizado fue el mismo que para cuantificar 2,3-BDO, también en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química (Universidad de Sevilla).

Previamente a la medición se procesaron las muestras a medir de la siguiente forma:

Recta de calibrado. Se tomaron cantidades de 10, 20, 30 y 40 μL de una solución de sacarosa preparada a 1 mg/mL y se depositaron en viales a los que se añadieron 10 μL de xilitol (patrón interno) a 1 mg/mL. La mezcla se homogeneizó mediante vortex y se introdujo en un vial para cromatografía que se inyectó en el cromatógrafo.

Preparación de las muestras. En primer lugar se hicieron diluciones 1:20 de las muestras en agua mili-Q. De la dilución se tomaron 25 μL que se añadieron a un vial con 10 μL de xilitol preparado a 1 mg/mL. Los viales se congelaron en nitrógeno líquido durante 1 min y se liofilizaron durante 1 h. A continuación se llevó a cabo un proceso de derivatización de los azúcares de las muestras para facilitar su análisis obteniendo un derivado más volátil, mediante dos reacciones:

Reacción 1 (oximación). En el mismo vial con la muestra liofilizada, se añadieron 30 μL de meox/piridina a 200 mg/mL preparada inmediatamente antes de su uso, y se incubó el vial a 40°C durante 1 h.

Reacción 2 (silylación). A la reacción 1 se añadieron 80 μL de BSTFA. La mezcla se homogeneizó mediante vortex y se incubó de nuevo a 40°C durante 1 h. Tras la incubación se traspasó la mezcla a un vial de cromatografía y se inyectó en el cromatógrafo.

3.14.2.2. Cuantificación por refractometría

Para la cuantificación de sacarosa por refractometría se utilizó un refractómetro digital (Atago, Tokyo, Japón), según indicaciones del fabricante.

3.14.2.3. Cuantificación de la concentración celular

El crecimiento celular se midió por densidad óptica, a través de la lectura de densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro modelo 4111 RS (Zuzi, China). La biomasa se calculó mediante la elaboración de una recta de calibrado que correlaciona la absorbancia con el peso seco de células.

3.15. ADHESIÓN A CÉLULAS EUCARIOTAS

La evaluación de la capacidad de adhesión de las bacterias de interés a células eucariotas se llevó a cabo utilizando células de levadura como modelo. Para ello se desarrolló un protocolo basándose en datos de la bibliografía (Hsu *et al.*, 1990; Grimaudo *et al.*, 1996; Biasoli y Margaró, 2003)

En primer lugar, se hicieron cultivos de las cepas a estudiar en tubos de ensayo con 5 mL de medio TSB, y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} cercana a 0.4, medida en espectrofotómetro. Alcanzado ese punto, se tomó 1 mL de cada cultivo, se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm en microcentrífuga. El pellet se lavó con PBS y se resuspendió en 1 mL del mismo tampón. De forma simultánea, se preparó una suspensión de células de levadura a partir de levadura comercial de panadería en PBS a una concentración de 5 mg/mL. En un tubo Eppendorf, se mezclaron 500 μ l de la suspensión de levaduras con 1 mL de suspensión bacteriana, y se incubó a 28°C durante 1 h. Tras la incubación, se tomó 1 mL del cultivo de células bacterianas junto con levaduras y se depositó sobre un portaobjetos para observar visualmente la posible formación de agregados de levadura producidos por la adhesión de bacterias (co-agregados).

Para evaluar la adhesión de forma microscópica, se realizó una extensión del cultivo en un portaobjetos y se fijó al aire. Posteriormente la extensión se tiñó con fucsina básica durante 1 minuto, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. La muestra se observó al microscopio óptico con objetivo de inmersión. La capacidad de adhesión de las células bacterianas a las levaduras se evaluó mediante el recuento del número de bacterias adheridas a 100 células de levadura.

4. RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS

Para el aislamiento de las diferentes cepas se utilizaron los medios de cultivo Mossel y MacConkey según lo descrito anteriormente (apartado 3.5. de material y métodos). A partir de la siembra en medio MacConkey y la posterior selección de las cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* en función de su pigmentación, se obtuvieron un total de 60 aislados. De ellos 46 fueron aislados de muestras de suelo rizosférico, 10 de muestras de raíces y 4 de parte aérea.

En cuanto a las zonas de muestreo, en la **tabla 8** se muestran las cepas aisladas de cada una de ellas.

Tabla 8. Cepas aisladas a partir de las diferentes zonas de muestreo.

ZONA DE MUESTREO	TABLA	CEPAS AISLADAS	TOTAL
La Compañía	1	11	26
	2	9	
	3	6	
Hato Ratón	1	5	15
	2	2	
	3	8	
Los Pobres	1	5	19
	2	10	
	3	4	

Tras su caracterización preliminar como enterobacterias, a las 60 cepas aisladas se les realizó la serie de pruebas bioquímicas IMViC (apartado 3.10.3.3. de material y métodos). De esta forma se confirmó que los microorganismos aislados pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae* y se diferenciaron las cepas que pertenecían al grupo formado por los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, descritos como productores de 2,3-BDO, con resultado (---++) para estas pruebas.

A partir de estos resultados se seleccionaron 25 de las 60 cepas aisladas, que fueron caracterizadas más detalladamente.

4.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

4.2.1. Identificación por secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S (ADNr 16S)

Las 25 cepas seleccionadas se identificaron mediante secuenciación del gen del ARNr 16S, *rrs* o también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S).

Mediante la técnica de PCR se amplificó el gen ADNr 16S de las cepas seleccionadas y se secuenció con los primers que se describen en la tabla 4 del apartado 3.7.4.3. de material y métodos. Una vez obtenidas las secuencias de dicho gen, de un tamaño aproximado de 1500 pb, se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank, con la ayuda del programa Blast del servidor del NCBI y de la aplicación EzTaxon-e (Kim *et al.*, 2012).

Se obtuvieron identificaciones a nivel de género y especie de cada una de las cepas, a partir de los datos de similitud con cepas descritas previamente (tabla 9). Se consideró que una cepa pertenecía a una especie depositada en la base de datos cuando el porcentaje de similitud fue igual o superior a un 97%, según lo establecido por Ludwig *et al.* (1998).

Tabla 9. Cepas seleccionadas y similitud con especies de la base de datos según secuenciación del ADNr 16S.

DESIGNACIÓN DE LA CEPA	ZONA DE MUESTREO	PARTE DE LA PLANTA	ESPECIE MÁS PRÓXIMA FILOGENÉTICAMENTE	SIMILITUD (%)
SC1	La Compañía	suelo rizosférico	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	99,71
SC2-a	La Compañía	suelo rizosférico	<i>Klebsiella singaporensis</i>	96,59
SC2-b	La Compañía	suelo rizosférico	<i>Klebsiella singaporensis</i>	98,27
SC4	La Compañía	suelo rizosférico	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,03
SC10	La Compañía	suelo rizosférico	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99,56
SC13	La Compañía	suelo rizosférico	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,15
SC17	La Compañía	suelo rizosférico	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	99,64
SHR6	Hato Ratón	suelo rizosférico	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,64
SHR7	Hato Ratón	suelo rizosférico	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	99,71
SHR8	Hato Ratón	suelo rizosférico	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98,8
SHR9	Hato Ratón	suelo rizosférico	<i>Citrobacter freundii</i>	98,87
SHR12	Hato Ratón	suelo rizosférico	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99,65
SA2	Los Pobres	suelo rizosférico	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99,36

Tabla 9. (Cont)

DESIGNACIÓN DE LA CEPA	ZONA DE MUESTREO	PARTE DE LA PLANTA	ESPECIE MÁS PRÓXIMA FILOGENÉTICAMENTE	SIMILITUD (%)
SA4	Los Pobres	suelo rizosférico	<i>Enterobacter asburiae</i>	98,42
SA6	Los Pobres	suelo rizosférico	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99,22
SA11	Los Pobres	suelo rizosférico	<i>Citrobacter freundii</i>	98,54
SA12	Los Pobres	suelo rizosférico	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	98,78
SA14	Los Pobres	suelo rizosférico	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99,15
RC1	La Compañía	raíces	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99,36
RC2	La Compañía	raíces	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99,86
RA1	Los Pobres	raíces	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99,92
RA2	Los Pobres	raíces	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99,43
RHR1	Hato Ratón	raíces	<i>Klebsiella variicola</i>	98,55
RHR2	Hato Ratón	raíces	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	98,27
RHR3	Hato Ratón	raíces	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	97,34

La mayor parte de las cepas seleccionadas se identificaron como pertenecientes al género *Enterobacter* (64%), seguidas del género *Klebsiella* (20%), y en menor proporción, los géneros *Citrobacter* y *Leclercia* (ambos con un 8%), como se muestra en la **figura 23**.

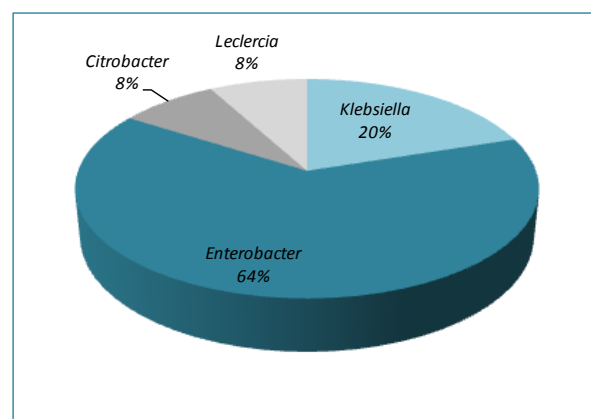


Figura 23. Distribución porcentual de las cepas aisladas agrupadas por género.

Se obtuvieron un total de 11 especies distintas, siendo *Enterobacter cancerogenus* la especie que se aisló con mayor frecuencia. Fue además la única especie presente en todas las zonas de muestreo. El resto de especies aisladas se encontraron en una única zona de muestreo, y en algunos casos en dos de ellas.

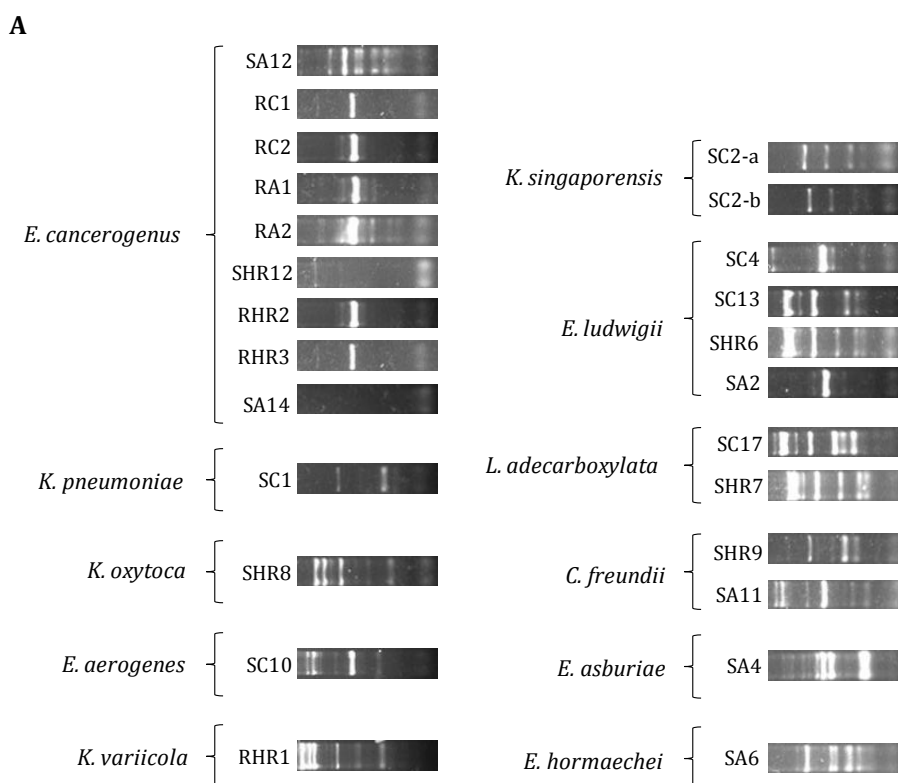
En cuanto a las distintas zonas de muestreo, Hato Ratón es la zona con mayor diversidad entre los aislados, ya que entre las 8 cepas provenientes de la misma se diferencian 7 especies distintas.

Con respecto a las distintas partes de la planta de arroz, en la [tabla 9](#) se puede observar que la mayoría de cepas se aislaron de muestras de suelo rizosférico, encontrándose en las raíces un 28% de los aislados, que pertenecen en su mayoría a la especie *Enterobacter cancerogenus*.

4.2.2. Identificación por PCR fingerprinting (huella genética)

Para determinar la existencia de distintas cepas entre las bacterias identificadas como de una misma especie según la anterior secuenciación del ADNr 16S, se llevó a cabo la amplificación de las secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC) mediante PCR-ERIC.

Como resultado se obtuvieron patrones de bandas de ADN específicos de cada especie y cepa, que fueron comparados visualmente y a continuación se trataron con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) ([figura 24](#)).



B

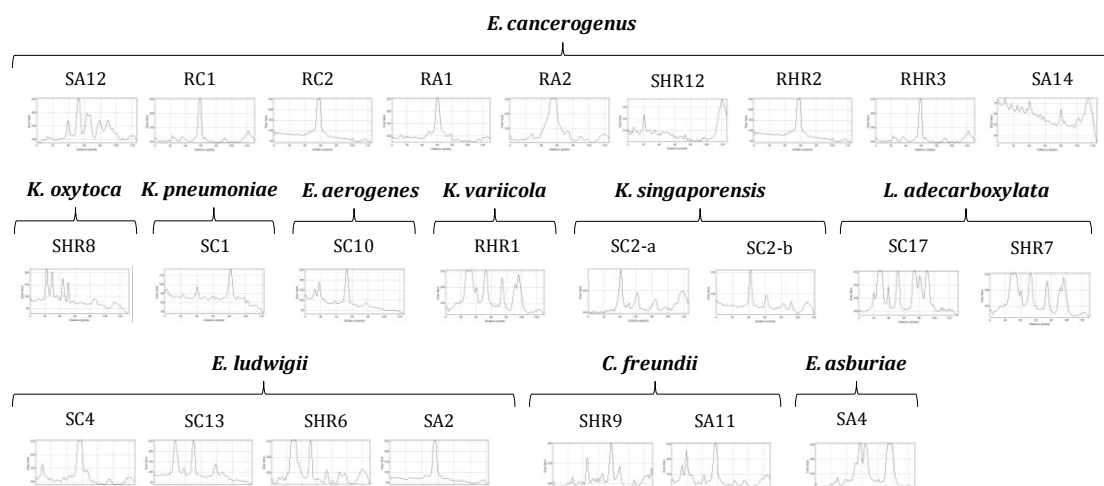


Figura 24. Perfiles obtenidos a partir de la PCR-ERIC, agrupados por aislados pertenecientes a la misma especie (A) y gráficas obtenidas a partir de los patrones de bandas mediante el programa ImageJ (B) (Abramoff *et al.*, 2004).

La comparación de los perfiles de bandas (huellas genéticas) resultantes de la electroforesis muestra que para algunas especies se aislaron cepas con patrones diferentes, tratándose por lo tanto de cepas distintas y no clones. Esta variación indica que dichas cepas han sufrido una serie de variaciones genómicas.

4.3. SELECCIÓN DE UNA CEPA PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO

4.3.1. Screening de producción de 2,3-BDO de las cepas seleccionadas

Para determinar la capacidad de producir 2,3-BDO por parte de las distintas cepas aisladas e identificadas, se llevó a cabo un ensayo de producción de este compuesto tal como se describe en el apartado 3.12.1. de material y métodos, utilizando glucosa como fuente de carbono a una concentración final de 60 g/L.

La cantidad de 2,3-BDO producido se cuantificó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), obteniendo los resultados que se muestran en la [tabla 10](#).

Tabla 10. Datos de producción de 2,3-BDO a las 24 h de cultivo de las especies aisladas.

ESPECIE	2,3-BDO 24 H (g/L)	
	<i>meso</i>	ópticamente activo
<i>K. pneumoniae</i>	nd	6.60 ± 0.3
<i>K. singaporensis</i>	nd	8.40 ± 0.3
<i>E. ludwigii</i>	nd	8.13 ± 0.3
<i>K. variicola</i>	nd	6.23 ± 0.3
<i>E. aerogenes</i>	nd	13.20 ± 0.3
<i>L. adecarboxylata</i>	nd	6.40 ± 0.3
<i>C. freundii</i>	nd	8.21 ± 0.3
<i>K. oxytoca</i>	nd	10.80 ± 0.3
<i>E. asburiae</i>	nd	6.60 ± 0.3
<i>E. hormaechei</i>	nd	8.30 ± 0.3
<i>E. cancerogenus</i>	nd	10.00 ± 0.3

nd= no detectado

Los datos muestran la producción media de 2,3-BDO entre las distintas cepas aisladas agrupadas por especies. Todas las especies aisladas fueron capaces de producir 2,3-BDO a partir de glucosa, aunque como se puede observar, ninguna bacteria produjo una cantidad detectable de 2,3-BDO en su forma *meso*-, predominando la forma ópticamente activa.

Como se muestra en la **tabla 10**, la especie que produjo una mayor cantidad de 2,3-BDO fue *Enterobacter aerogenes*.

4.3.2. Utilización de carbohidratos

Como se vió en la introducción, la ruta de síntesis de 2,3-BDO parte de moléculas de glucosa. Sin embargo, económicamente sería más rentable la adición de sacarosa al medio de cultivo para llevar a cabo la fermentación, en lugar de añadir glucosa pura. Además la sacarosa es una hexosa que forma parte de los residuos agroindustriales de material lignocelulósico, que podrían utilizarse como materia prima en la producción de 2,3-BDO, abaratando los costes de producción y valorizando estos residuos frente a otras materias primas más costosas o perjudiciales para el medio ambiente.

Por ello, para determinar la capacidad de las distintas cepas de utilizar sacarosa, descomponiéndola en glucosa y fructosa, y asimilar la glucosa para producir 2,3-BDO, se llevó a cabo un ensayo de fermentación de ambos azúcares en placas de medio con CaCO₃ (apartado 3.10.3.5. de material y métodos), basado en la formación de ácido como resultado de la fermentación. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 11**.

Tabla 11. Resultados de prueba de utilización de glucosa y sacarosa.

CEPA	IDENTIFICACIÓN	GLUCOSA	SACAROSA
SC1	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	++	++
SC2-a	<i>Klebsiella singaporensis</i>	+	+
SC2-b	<i>Klebsiella singaporensis</i>	+	+
SC4	<i>Enterobacter ludwigii</i>	+	-
SC10	<i>Enterobacter aerogenes</i>	++	++
SC13	<i>Enterobacter ludwigii</i>	++	++
SC17	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	+	++
SHR6	<i>Enterobacter ludwigii</i>	++	++
SHR7	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	+	++
SHR8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+
SHR9	<i>Citrobacter freundii</i>	++	++
SHR12	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	++	++
SA2	<i>Enterobacter ludwigii</i>	++	+
SA4	<i>Enterobacter asburiae</i>	++	++
SA6	<i>Enterobacter hormaechei</i>	+	++
SA11	<i>Citrobacter freundii</i>	+	++
SA12	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	+	-
SA14	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	++	++
RC1	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	+	+
RC2	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	++	++
RA1	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	+	+
RA2	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	+	+
RHR1	<i>Klebsiella variicola</i>	+	+
RHR2	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	+	-
RHR3	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	+	-

(+) = presencia de halo, (-) = ausencia de halo, (++) = presencia de halo de mayor tamaño

Como se puede observar todas las cepas estudiadas fueron capaces de fermentar glucosa, sin embargo, no todas tienen la capacidad de metabolizar sacarosa y disociarla en fructosa y glucosa para utilizar dichos monosacáridos.

Las diferencias de utilización de azúcares tuvieron lugar entre aislados de distintas especies así como entre diferentes cepas de la misma especie. En algunos casos también se observan diferencias dentro de la misma especie y cepa pero proveniente de diferentes puntos de muestreo (por ejemplo RC1 y RHR3).

En función de los resultados de producción de 2,3-BDO obtenidos, su capacidad para utilizar tanto glucosa como sacarosa, su fácil cultivo y los datos existentes en la bibliografía, se seleccionó la cepa *Enterobacter aerogenes* SC10 como cepa de trabajo.

Previamente a los distintos ensayos de producción realizados con la misma, se llevaron a cabo una serie de determinaciones en paralelo con una cepa tipo comercial de *E. aerogenes* obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), *E. aerogenes* CECT 684^T. De esta forma se podría confirmar la identificación preliminar de nuestra cepa, realizada anteriormente por pruebas IMViC y secuenciación del ADNr 16S.

4.3.3. Caracterización de la cepa *E. aerogenes* SC10

4.3.3.1. Caracterización fenotípica

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de caracterización macroscópica, observando las características de las colonias de la cepa *E. aerogenes* SC10 y la cepa de referencia *E. aerogenes* CECT 684^T, crecidas en placas de medio nutritivo TSA, así como en medio selectivo MacConkey (**figura 25**).

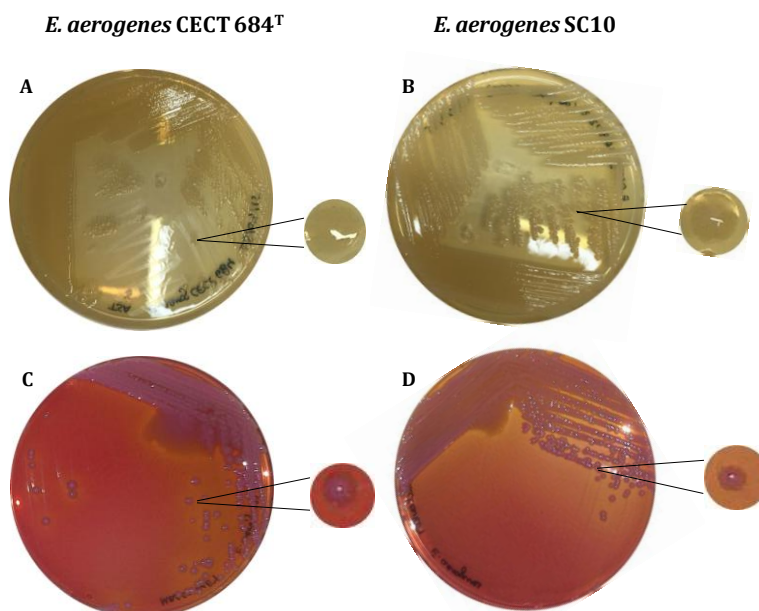


Figura 25. Aspecto de las colonias de de la cepa *E. aerogenes* SC10 y la cepa de referencia *E. aerogenes* CECT 684^T sembradas en medio TSA (imágenes **A** y **B**) y medio MacConkey (imágenes **C** y **D**).

La descripción de las colonias se detalla en la **tabla 12**.

Tabla 12. Características macroscópicas de la cepa *E. aerogenes* SC10 y la cepa de referencia *E. aerogenes* CECT 684^T.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	PIGMENTACIÓN
<i>E. aerogenes</i> SC10	TSA	circular	entero	convexa	lisa, brillante, cremosa	traslúcida, amarillo-grisácea
	MacConkey	circular	entero	convexa	lisa, brillante, cremosa	opaca, rosa oscuro
<i>E. aerogenes</i> CECT 684 ^T	TSA	circular	entero	convexa	lisa, brillante, cremosa	traslúcida, amarillo-grisácea
	MacConkey	circular	entero	convexa	lisa, brillante, cremosa	opaca, rosa oscuro

Posteriormente, se determinó la morfología de ambas cepas mediante tinción de Gram y tinción negativa.

Mediante la tinción de Gram se observó que tanto la cepa objeto de estudio como la cepa de referencia presentaban la siguiente morfología (**figura 26**): bacilos Gram-negativos, rectos, con un tamaño celular de 1-2 μm de longitud y 0.25-0.5 μm de ancho. La tinción negativa reveló la presencia de cápsula en las dos cepas.

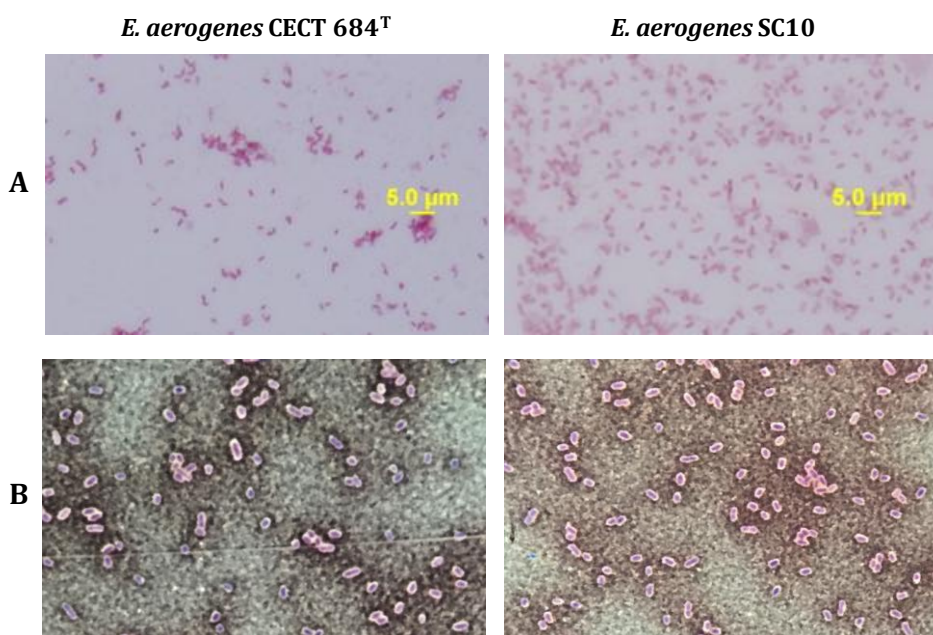


Figura 26. Microfotografía de las cepas *E. aerogenes* SC10 y *E. aerogenes* CECT 684^T teñidas mediante tinción Gram (A) y tinción negativa (B).

4.3.3.2. Pruebas bioquímicas

Al igual que para la caracterización fenotípica de la cepa *E. aerogenes* SC10, para su caracterización bioquímica se tomó como referencia la cepa *E. aerogenes* CECT 684^T.

Las dos cepas se sometieron a las pruebas de catalasa, oxidasa y la batería de pruebas API 20E. Los resultados para ambas fueron catalasa positiva y oxidasa negativa.

En cuanto a las 20 pruebas de la batería API 20E los resultados fueron también iguales para ambas cepas, determinándose que las dos cepas examinadas presentan las actividades lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, triptófano desaminasa y son capaces de fermentar glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa, perfil que corresponde con la especie *Enterobacter aerogenes*.

4.3.3.3. Sensibilidad frente a antibióticos

Mediante el método de antibiograma disco-placa se determinó la sensibilidad a diversos antibióticos de las dos cepas de *E. aerogenes* estudiadas (**tabla 13**).

Tabla 13. Sensibilidad a distintos antibióticos de las cepas *E. aerogenes* SC10 y *E. aerogenes* CECT 684^T.

ANTIBIÓTICO	CEPA	
	<i>E. aerogenes</i> SC10	<i>E. aerogenes</i> CECT 684
Tetraciclina	R	I
Ampicilina	R	R
Kanamicina	I	I
Neomicina	R	S
Estreptomina	S	S
Ácido nalidíxico	I	S
Cloranfenicol	S	S
Amox./clav.	R	R

R= resistente, S= sensible, I= intermedio

Se determinó que la cepa objeto de estudio presenta mayor resistencia a los antibióticos tetraciclina, neomicina y ácido nalidíxico que la cepa tipo.

4.3.3.4. Crecimiento

Se evaluó el crecimiento de las cepas *E. aerogenes* SC10 y *E. aerogenes* CECT 684^T mediante la elaboración de curvas de crecimiento (apartado 3.10.2.1. de material y métodos).

Se realizaron curvas en medio nutritivo (TSB) sin adición de carbohidratos, y en el medio utilizado para la producción de 2,3-BDO (medio EA), añadiendo sacarosa a una concentración final de 90 g/L (**figura 27**).

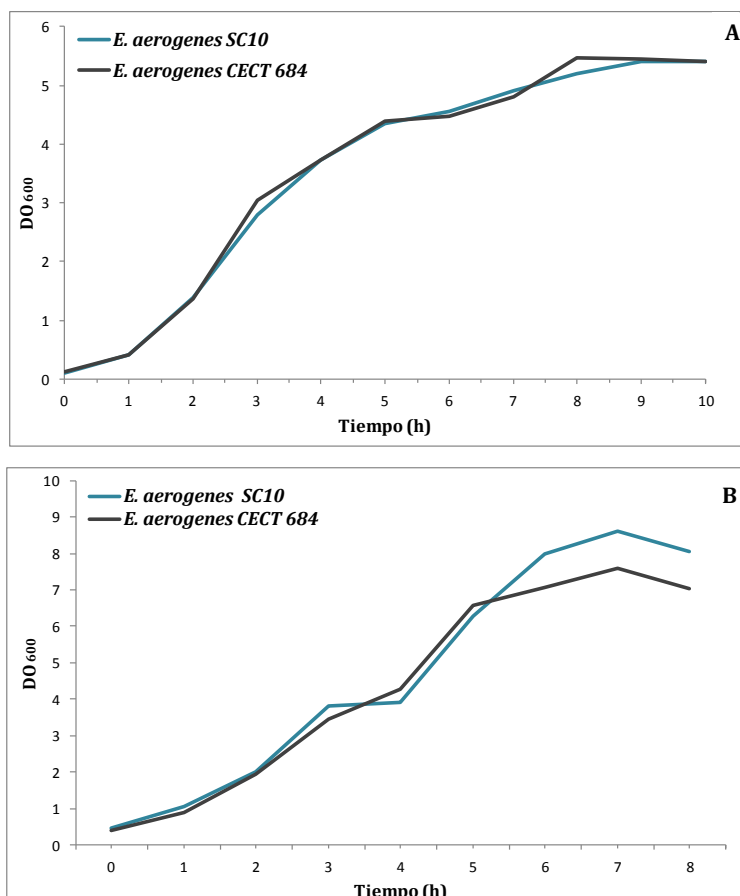


Figura 27. Curvas de crecimiento en medio TSB (A) y medio EA suplementado con sacarosa (B).

A partir de la pendiente de la curva en medio TSB, en la fase de crecimiento exponencial (1-8h), se calcularon las velocidades específicas de crecimiento de ambas cepas obteniendo como resultado una velocidad específica de 0.68 para la cepa *E. aerogenes* SC10 y de 0.69 para la cepa de referencia.

En medio de cultivo suplementado con sacarosa, se observó un tipo de crecimiento diáuxico, con dos fases exponenciales separadas por una fase estacionaria corta. Este crecimiento se debe a la utilización de dos fuentes de carbono distintas (en este caso glucosa y fructosa obtenidas a partir de la sacarosa del medio). Las bacterias crecieron primero utilizando glucosa como fuente de carbono preferente, hasta su agotamiento, y posteriormente utilizaron la fructosa.

Se calculó la velocidad específica de crecimiento para ambas cepas en la primera y segunda fase exponencial, obteniendo así datos de 1.38 y 2 para *E. aerogenes* SC10 y 1.27 y 1.4 para la cepa de referencia.

Por lo tanto, se puede afirmar que la cepa *E. aerogenes* SC10 presenta un crecimiento idéntico al de la cepa tipo *E. aerogenes* CECT 684^T en cultivos con medio sin carbohidratos añadidos pero presenta una mayor velocidad de crecimiento cuando el medio de cultivo es suplementado con carbohidratos.

4.3.3.5. Producción de 2,3-BDO

Se ensayó la producción de 2,3-BDO de la cepa *E. aerogenes* SC10 junto con la cepa de referencia, mediante cultivos en medio EA suplementados con 90 g/L de sacarosa.

Los datos de producción a las 24 h de cultivo (**figura 28**) muestran que la cepa *E. aerogenes* SC10 produjo un 5.81 % más de este compuesto que la cepa tipo *E. aerogenes* CECT 684^T.

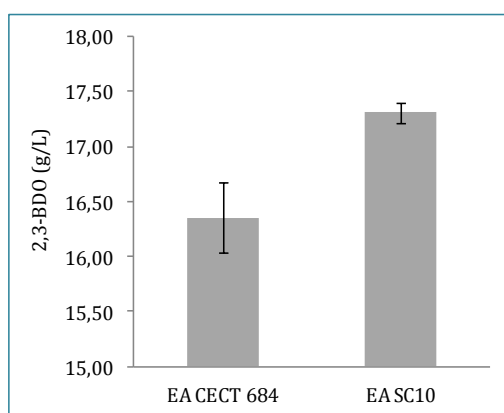


Figura 28. Producción de 2,3-BDO a las 24 h de la cepa de estudio *E. aerogenes* SC10 y la cepa de referencia *E. aerogenes* CECT 684^T en cultivo con medio EA y 90 g/L de sacarosa.

Teniendo en cuenta los datos comparativos con la cepa de referencia obtenidos en la caracterización fenotípica y bioquímica, las pruebas de sensibilidad a antibióticos, y los estudios de crecimiento y producción de 2,3-BDO, se confirmó que la cepa *E. aerogenes* SC10 aislada en este trabajo efectivamente podía identificarse como tal especie y que presentaba ciertas ventajas en cuanto a velocidad de crecimiento y producción de 2,3-BDO con respecto a la cepa tipo *E. aerogenes* CECT 684^T, por lo que se eligió continuar trabajando con la primera.

4.4. MODIFICACIÓN METABÓLICA DE LA CEPA *E. aerogenes* SC10 PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO

4.4.1. Sobreproducción de 2,3-BDO mediante modificación de vías implicadas en la producción de metabolitos en la ruta metabólica de síntesis de este compuesto

La formación de 2,3-BDO a partir de glucosa en *E. aerogenes*, como ya se vió en la introducción, tiene lugar a través de una ruta metabólica en la que se producen numerosas reacciones que dan lugar a este y otros compuestos (figura 29).

En el proceso de fermentación que da lugar a la producción de 2,3-BDO, se oxidan fuentes de carbono como la glucosa y se produce agente reductor en forma de NADH. Para mantener el equilibrio redox en la célula, el NADH es utilizado para reducir compuestos intermediarios y formar hidrógeno, lactato, etanol, succinato o 2,3-BDO (Berríos-Rivera *et al.*, 2002).

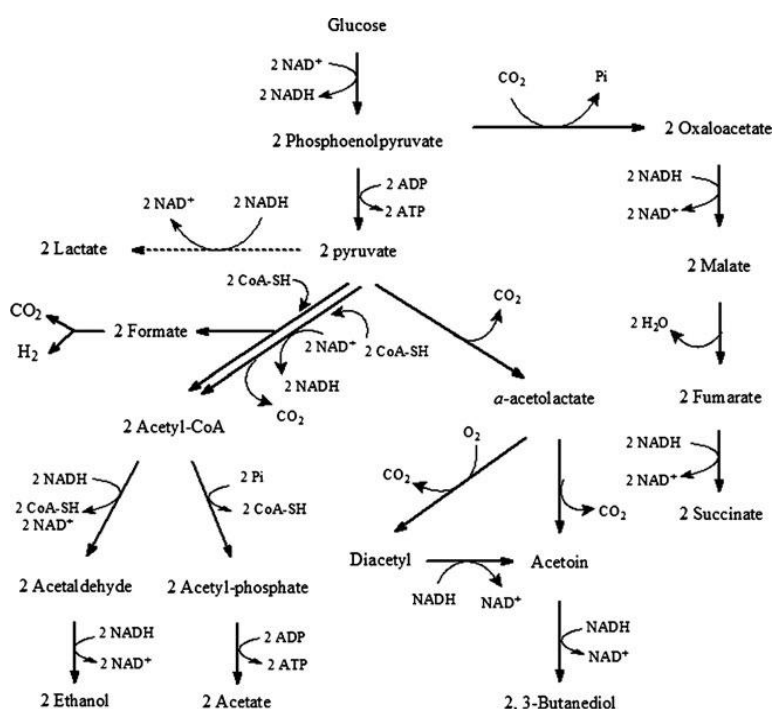


Figura 29. Ruta metabólica de síntesis de 2,3-BDO en *E. aerogenes* (Jung *et al.*, 2012).

Una vez comprobada la capacidad de producción de 2,3-BDO por *E. aerogenes*, se realizó un estudio sobre el efecto de la producción de otros metabolitos en la formación, productividad y rendimiento de este compuesto.

4.4.1.1 Modificación de la vía metabólica de síntesis de lactato

4.4.1.1.1 Efecto de la síntesis de lactato en la producción de 2,3-BDO en *E. aerogenes*

La ruta de producción de lactato (**figura 30**) se define como la mayor consumidora de NADH entre las rutas dependientes de NADH del metabolismo intracelular en *E. aerogenes* (Zhang *et al.*, 2009, Zhao *et al.*, 2009), por lo tanto, supone una competencia para la síntesis de 2,3-BDO. Debido a esto, la inactivación de la ruta que da lugar a ácido láctico afectaría al metabolismo del carbono y supondría una redistribución de NADH entre las rutas dependientes de este compuesto, entre ellas la que da lugar a la producción de 2,3-BDO.

Nos propusimos como uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral incrementar la producción de 2,3-BDO y mejorar la productividad de los cultivos de la cepa del estudio mediante la interrupción del gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), responsable de la formación de lactato a partir de piruvato.

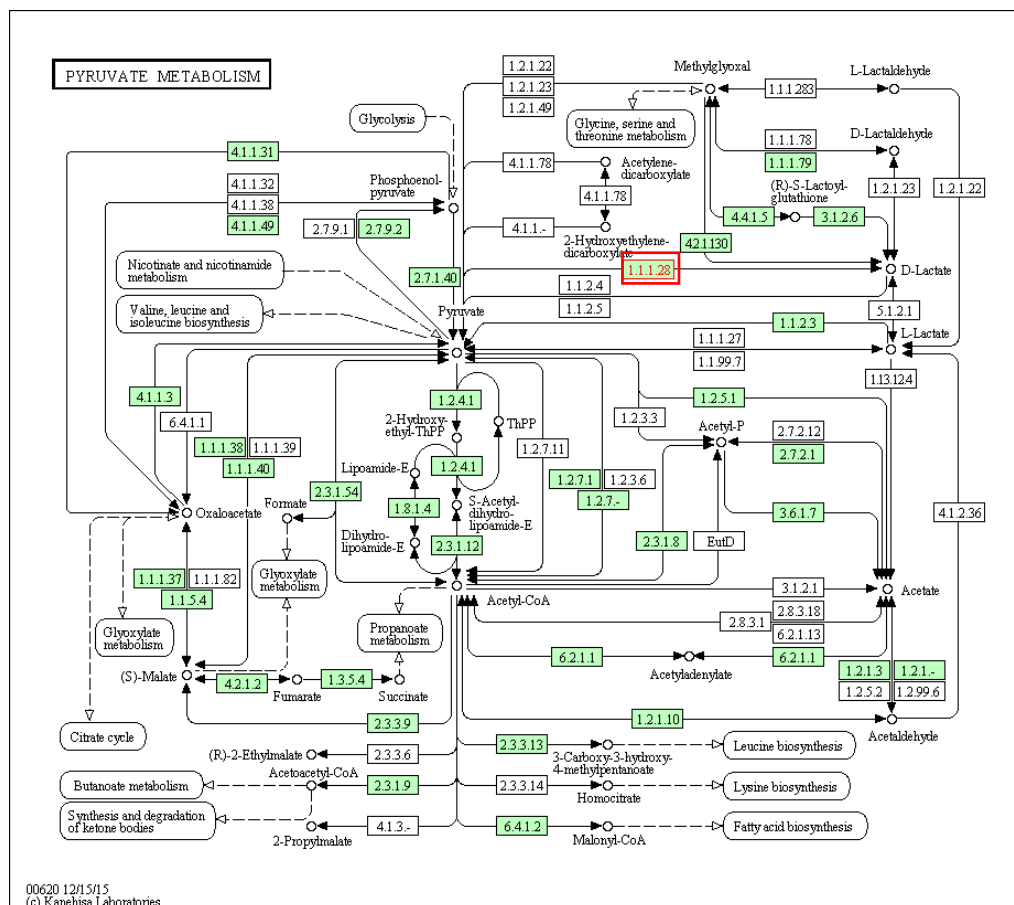


Figura 30. Esquema del metabolismo del piruvato en *E. aerogenes*. En rojo, señalada enzima lactato deshidrogenasa (código EC:1.1.1.28 según nomenclatura IUBMB), responsable de la conversión de piruvato a D-lactato.

Fuente: KEGG (Kanehisa y Goto, 2000).

4.4.1.1.2. Estudio *in silico* del gen codificante de la enzima lactato deshidrogenasa (*ldhA*)

La enzima lactato deshidrogenasa en *E. aerogenes* (EC:1.1.1.28) es codificada por el gen *ldhA*. Para estudiar este gen, en primer lugar se localizó la región del genoma en la que se encontraba (EAE 20575) y se realizó un análisis de su entorno genómico (**figura 31**) mediante la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011).

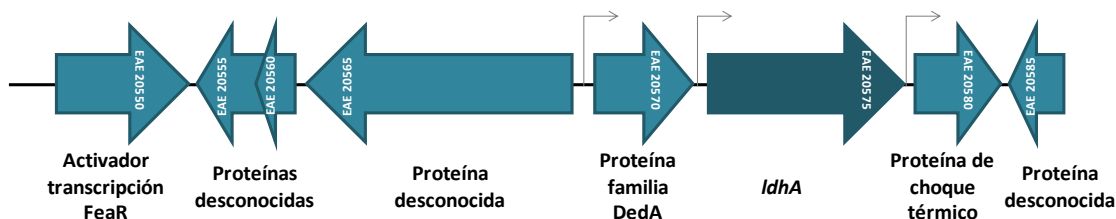


Figura 31. Contexto genómico del gen *ldhA* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011). Las regiones promotoras se indican con flechas grises.

Para determinar si el gen *ldhA* formaba una única unidad transcripcional, se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de promotores (**figura 31**), mediante la herramienta web BDGP (Reese *et al.*, 1996). Como resultado de esta búsqueda se encontraron promotores corriente arriba y corriente abajo del gen *ldhA*, por lo que se confirmó que el gen *ldhA* es una unidad transcripcional independiente y se pudo diseñar una estrategia de mutagénesis mediante inserción de cassette.

4.4.1.1.3. Obtención de una cepa con interrupción del gen *ldhA*

Para la interrupción del gen *ldhA* se llevó a cabo la inserción en el mismo de un cassette de resistencia a kanamicina. Así, utilizando ADN genómico de la cepa silvestre de *E. aerogenes* SC10 como molde, se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 2050 pb que contenía el gen *ldhA*, utilizando la enzima ADN polimerasa BioTaq™ (Bioline, Londres, Reino Unido) con las condiciones descritas en el apartado 3.7.4.1. de material y métodos.

Tras la comprobación del fragmento obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa, éste fue clonado en el vector de clonación PGEM®-T, dando lugar al plásmido pME-LDH. Con este plásmido se transformaron por electroporación células competentes de *E. coli* DH5α previamente preparadas, y se seleccionaron en placas de medio LB con ampicilina, IPTG y X-gal.

Las colonias correctamente transformadas se identificaron por su pigmentación blanca, descartando las colonias azules, en las que no se produjo inserción del fragmento genómico en el vector de clonación y por lo tanto mantuvieron intacto el gen *lacZ*, pudiendo producir la enzima β -galactosidasa, responsable de la hidrólisis de X-gal y la consiguiente formación de un compuesto azul. La correcta construcción del plásmido pME-LDH se confirmó por secuenciación.

Posteriormente, se llevó a cabo la digestión del plásmido pME-LDH con la enzima de restricción *Bam*HI, que digiere el gen *ldhA*. Paralelamente, se digirió con la misma enzima el plásmido pUC4-KIXX, liberando de esta forma el cassette de resistencia a kanamicina que contiene dicho plásmido. El cassette, con extremos *Bam*HI, fue ligado al pME-LDH previamente digerido, y con dicha ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación.

Los transformantes se seleccionaron en placas de LB con ampicilina y kanamicina y se recuperó el plásmido, que se denominó pME1-kLDH y se secuenció para confirmar que la construcción se había realizado de manera correcta.

Para recombinar el gen mutado en el cromosoma de *E. aerogenes*, se ligó un fragmento del plásmido pME1-kLDH digerido con las enzimas de restricción *Not*I y *Spe*I, que liberan la construcción formada por el fragmento genómico del gen *ldhA* y el cassette de resistencia a kanamicina, en el vector suicida PJQ200-SK, previamente digerido con las mismas enzimas, dando lugar al plásmido pME2-kLDH (**figura 32**).

Para transferir el plásmido pME2-kLDH a las células de *E. aerogenes*, se llevó a cabo un proceso de conjugación triparental, utilizando el plásmido pRK600 como plásmido “helper” (Kessler *et al.*, 1992). Las cepas mutantes resultantes obtenidas mediante doble recombinación homóloga se seleccionaron en placas de LB con kanamicina y un 10% de sacarosa, identificándose como aquellas colonias con fenotipo Km^RGm^SSac^R. Posteriormente, la mutación en el gen *ldhA* se confirmó por PCR y posterior secuenciación. La cepa mutante obtenida se denominó EALD.

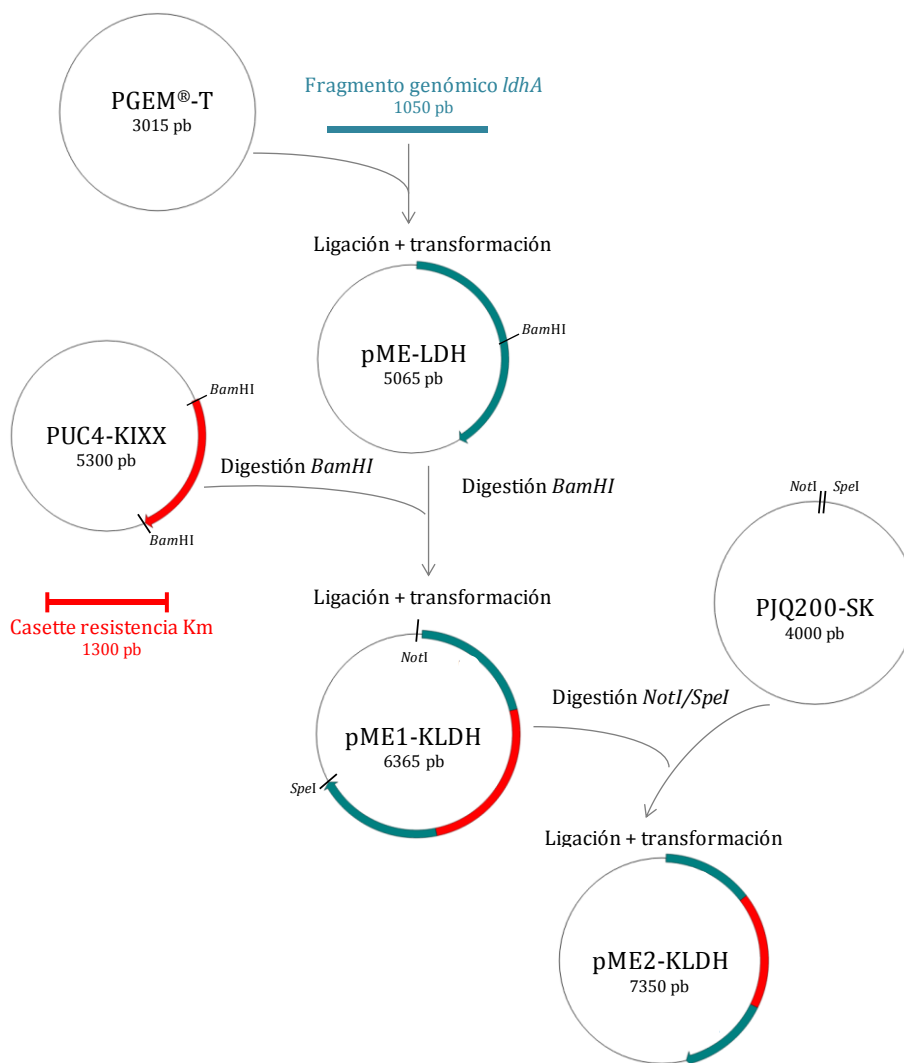


Figura 32. Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con interrupción del gen *ldhA*.

4.4.1.2. Modificación de la vía metabólica de oxidación de gliceraldehído-3-fosfato

4.4.1.2.1. Efecto de la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato en la producción de 2,3-BDO en *E. aerogenes*

Como se ha visto anteriormente, la producción de 2,3-BDO parte del piruvato originado a partir de glucosa. La formación de piruvato a partir de glucosa implica una serie de reacciones mediante la cual la glucosa se oxida a gliceraldehído-3-fosfato (G3P), que a su vez es oxidado a 1,3-bifosfoglicerato (1,3-PG), y este último a piruvato por medio de otra serie de reacciones. La reacción oxidación de G3P hacia 1,3-PG es dependiente de NAD^+ , que se reduce a NADH , y es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (figura 33).

La enzima GAPDH por lo tanto, afecta a la producción de 2,3-BDO, ya que interviene en la formación del sustrato necesario para su formación (piruvato) y además genera NADH necesario para las rutas dependientes de este poder reductor, entre ellas la de síntesis de 2,3-BDO a partir de acetoína. Por ello en este trabajo se decidió incrementar la producción de 2,3-BDO y mejorar la productividad de los cultivos de la cepa del estudio llevando a cabo la sobreexpresión del gen que codifica la enzima GAPDH.

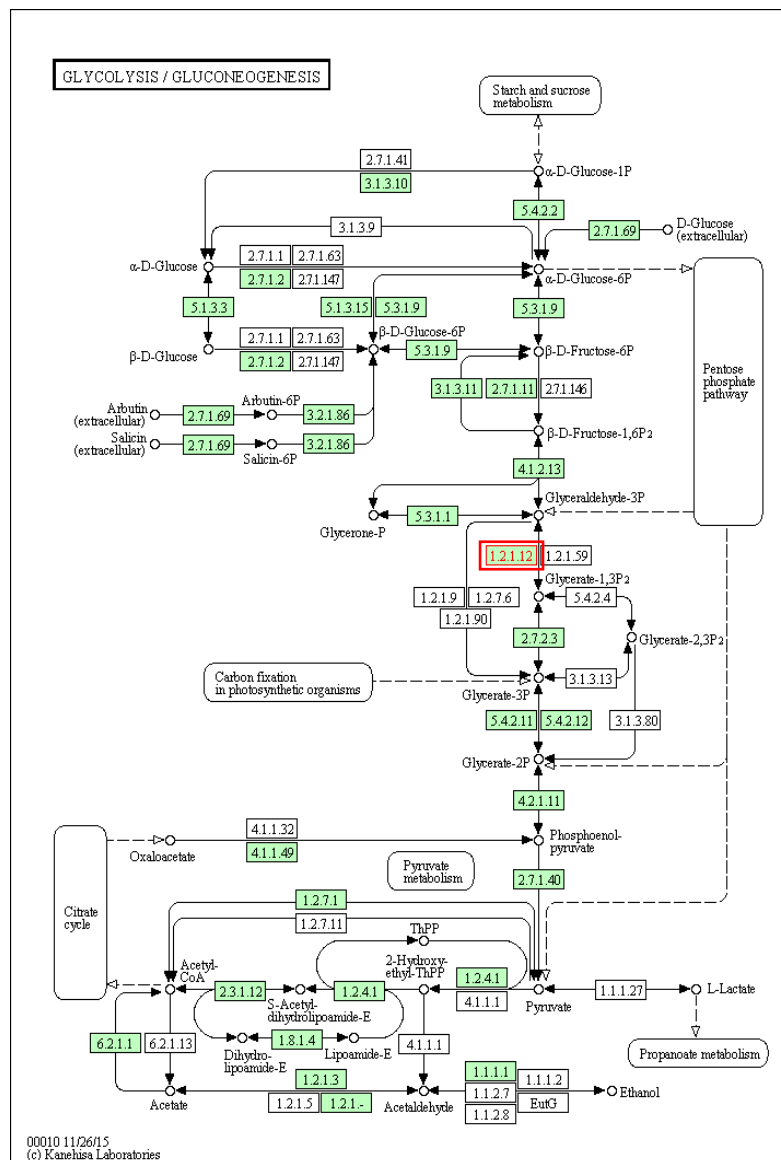


Figura 33. Esquema del metabolismo de la glucosa en *E. aerogenes*. En rojo, señalada enzimagliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (código EC:1.2.1.12 según nomenclatura IUBMB), responsable de la conversión de G3P a 1,3-PG. Fuente: KEGG (Kanehisa y Goto, 2000).

4.4.1.2.2. Estudio *in silico* del gen codificante de la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*gapA*)

La enzima GAPDH en *E. aerogenes* (EC:1.2.1.12) es codificada por el gen *gapA*. Para estudiar este gen, en primer lugar se localizó la región del genoma en la que se encontraba (EAE 21720) y se realizó un análisis de su entorno genómico (**figura 34**) mediante la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011).

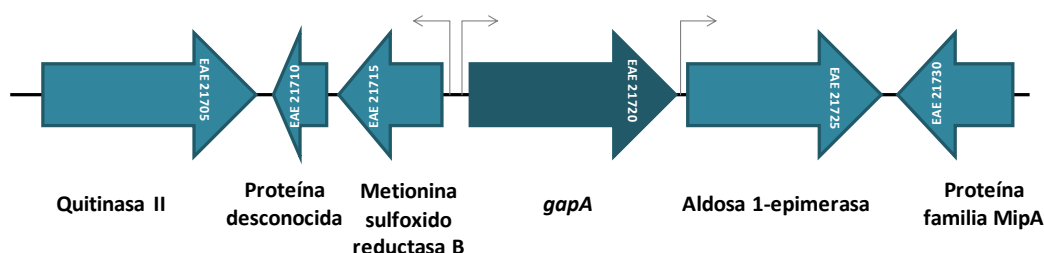


Figura 34. Contexto genómico del gen *gapA* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011). Las regiones promotoras se indican con flechas grises.

Para determinar si el gen *gapA* formaba una única unidad transcripcional, se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de promotores (**figura 34**), mediante la herramienta web BDGP (Reese *et al.*, 1996).

4.4.1.2.3. Obtención de una cepa con sobreexpresión del gen *gapA*

Para la sobreexpresión del gen *gapA*, en primer lugar se amplificó un fragmento de ADN de 1060 pb que contenía dicho gen, utilizando ADN genómico de la cepa silvestre de *E. aerogenes* SC10 como molde.

Para la reacción de PCR se diseñaron los cebadores *gapA_F* y *gapA_R* (apartado 3.7.4.3. de material y métodos), a los que se añadieron en sus extremos puntos de corte de las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII* para facilitar su posterior clonaje. En este caso la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando una enzima ADN polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity PCR System, Roche) y las condiciones descritas en el apartado 3.7.4.1. de material y métodos.

El producto de PCR obtenido fue comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa, digerido con las enzimas de restricción *Xho*I y *Hind*III, y ligado al vector PBBR1-MCS5, digerido previamente con las mismas enzimas. De esta forma se obtuvo el plásmido pME-GP (figura 35), con el que se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Los transformantes se seleccionaron en placas de medio LB con gentamicina, IPTG y X-gal, conservando las colonias blancas y descartando las azules.

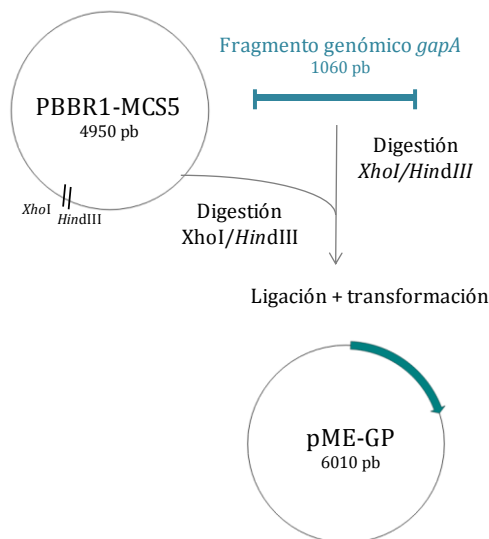


Figura 35. Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con sobreexpresión del gen *ldhA*.

La correcta inserción del fragmento genómico en el plásmido se confirmó por PCR y secuenciación.

La transferencia del plásmido pME-GP a las células de *E. aerogenes* se realizó mediante transformación por electroporación de células competentes previamente preparadas. La cepa mutante obtenida se denominó EAG.

4.4.1.3. Modificación de la vía metabólica de reducción de acetoína

4.4.1.3.1. Efecto de la reducción de acetoína en la producción de 2,3-BDO en *E. aerogenes*

La acetoína es reducida a 2,3-BDO mediante una reacción dependiente de NADH. Esta reacción es catalizada por la enzima acetoína reductasa/butanodiol deshidrogenasa (BDH). La enzima BDH por lo tanto, afecta directamente a la producción de 2,3-BDO, ya que interviene en la última reacción necesaria para su síntesis (figura 36).

Además contribuye a regenerar el NAD⁺ necesario para las rutas dependientes de este compuesto.

Con estos antecedentes, se propuso como objetivo incrementar la producción de 2,3-BDO y mejorar la productividad de los cultivos de la cepa del estudio mediante la sobreexpresión del gen que codifica la enzima BDH.

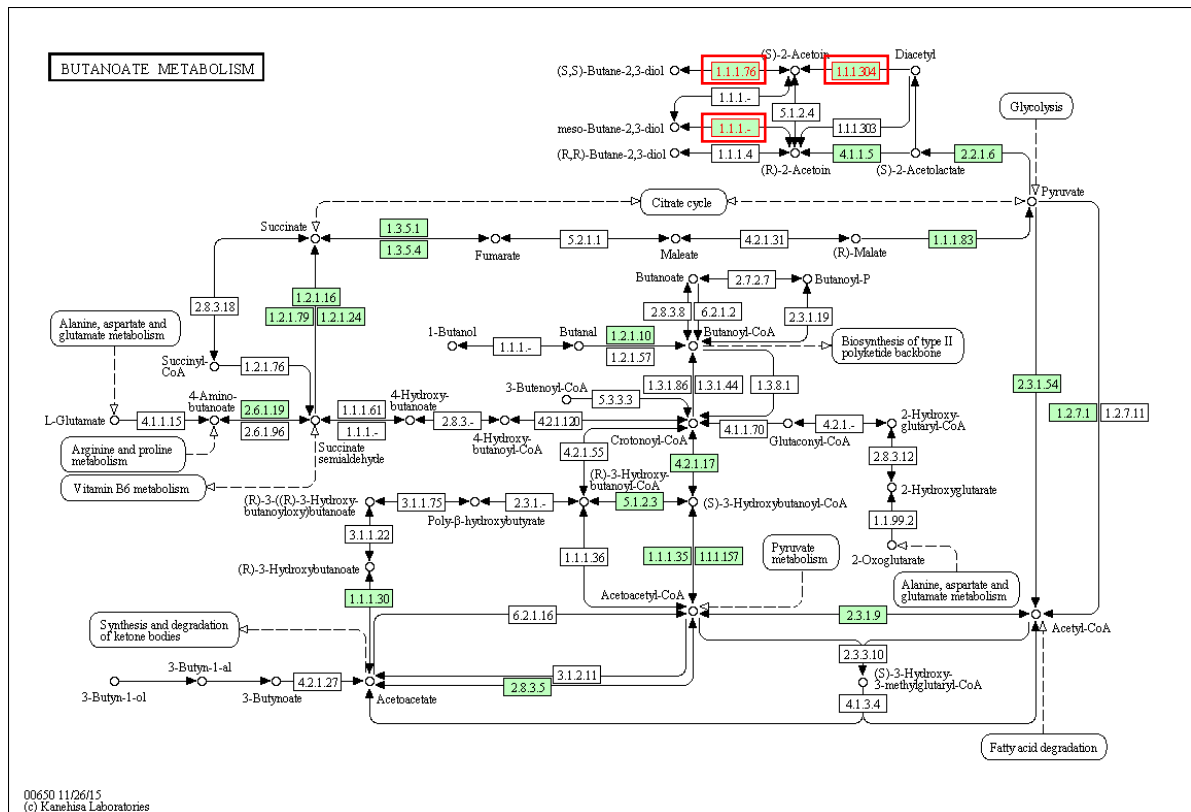


Figura 36. Esquema del metabolismo del butanoato en *E. aerogenes*. En rojo, señalada enzima acetoína reductasa (código EC:1.1.1.76, 1.1.1.304 y 1.1.1.- según nomenclatura IUBMB), responsable de la conversión de acetoína a 2,3-BDO. Fuente: KEGG (Kanehisa y Goto, 2000).

4.4.1.3.2. Estudio *in silico* del gen codificante de la enzima acetoína reductasa/butanodiol deshidrogenasa (*bdh*)

La enzima BDH en *E. aerogenes* (EC: 1.1.1.76, 1.1.1.304, 1.1.1.-) es codificada por el gen *bdh*. Para estudiar este gen, en primer lugar se localizó la región del genoma en la que se encontraba (EAE 17490) y se realizó un análisis de su entorno genómico (figura 37) mediante la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011).

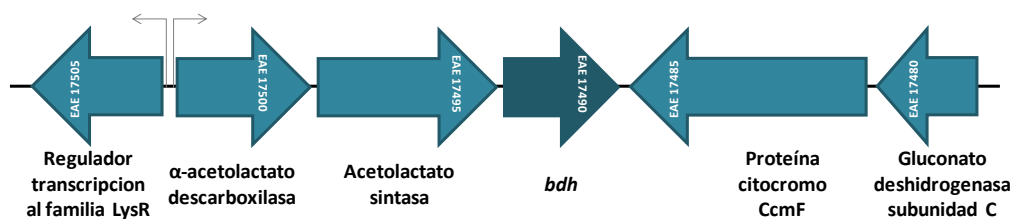


Figura 37. Contexto genómico del gen *bdh* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011). Las regiones promotoras se indican con flechas grises.

Para determinar si el gen *bdh* formaba una única unidad transcripcional, se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de promotores (**figura 37**), mediante la herramienta web BDGP (Reese *et al.*, 1996).

4.4.1.3.3. Obtención de una cepa con sobreexpresión del gen *bdh*

Para la sobreexpresión del gen *bdh*, en primer lugar se amplificó un fragmento de ADN de 850 pb que contenía dicho gen, utilizando ADN genómico de la cepa silvestre de *E. aerogenes* SC10 como molde.

Para la reacción de PCR se diseñaron los cebadores *bdh_F* y *bdh_R*, añadiendo en sus extremos puntos de corte de las enzimas de restricción *HindIII* y *SacI* para facilitar su posterior clonaje. La reacción se llevó a cabo utilizando una enzima ADN polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity PCR System, Roche) con las condiciones descritas en el apartado 3.7.4.1. de material y métodos. Tras la reacción se llevó a cabo la comprobación de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

Posteriormente el producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *SacI* y ligado al vector PBBR1-MCS2, digerido previamente con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pME-BD (**figura 38**). Con este plásmido se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Los transformantes se seleccionaron en placas de medio LB con kanamicina, IPTG y X-gal, escogiendo las colonias blancas y descartando las azules. La correcta inserción del fragmento genómico en el plásmido se confirmó por PCR y secuenciación.

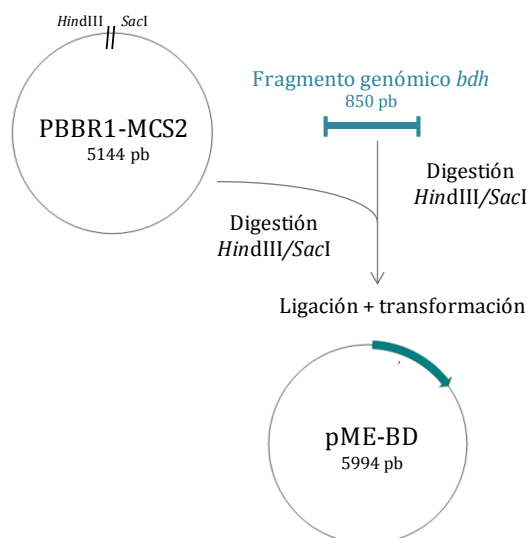


Figura 38. Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con sobreexpresión del gen *bdh*.

La transferencia del plásmido pME-BD a las células competentes de *E. aerogenes* previamente preparadas se realizó mediante transformación por electroporación. La cepa mutante obtenida se denominó EAB.

4.4.1.4. Obtención de cepas con modificación de varios genes

4.4.1.4.1. Doble sobreexpresión de los genes *bdh* y *gapA*

Para la sobreexpresión de los genes *bdh* y *gapA* utilizando un único vector, en primer lugar se digirió el plásmido pME-GP utilizando las enzimas de restricción *HindIII* y *SacI*, de forma paralela a la digestión con las mismas enzimas del producto de PCR del gen *bdh* obtenido anteriormente. Posteriormente, se llevó a cabo la ligación del plásmido abierto con el producto de PCR digerido, obteniéndose el plásmido pME-GB (**figura 39**). Con este plásmido se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación, y los transformantes fueron seleccionados en placas de LB con gentamicina. La correcta inserción del fragmento genómico en el plásmido se confirmó por PCR y secuenciación.

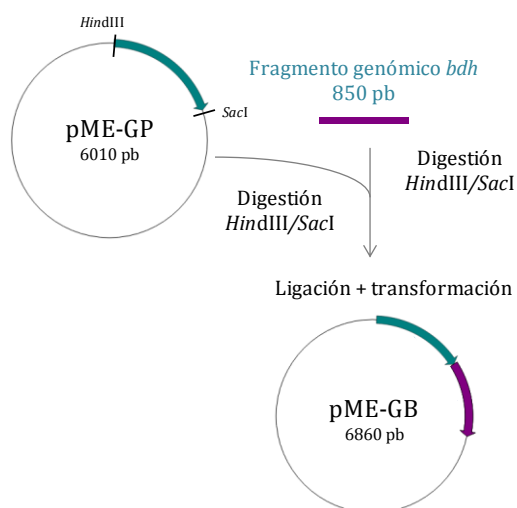


Figura 39. Estrategia utilizada para la obtención de la cepa con sobreexpresión de los genes *bdh* y *gapA*.

El plásmido pME-GB se transfirió a células de *E. aerogenes* SC10 (cepa silvestre) y *E. aerogenes* ΔdhA (EALD) mediante transformación por electroporación de células competentes previamente preparadas de ambas cepas. Las cepas mutantes se denominaron EAGB y EALD-GB, respectivamente.

4.4.1.5. Caracterización de las cepas mutantes obtenidas

4.4.1.5.1. Estudio de crecimiento

Para evaluar el crecimiento de las distintas cepas mutantes obtenidas, se realizaron curvas de crecimiento (apartado 3.10.2.1. de material y métodos) en medio EA suplementado con sacarosa, puesto que en el caso de existir alguna diferencia de crecimiento en las cepas mutantes, debería evaluarse en las condiciones en las que se utilizarían para la producción de 2,3-BDO. Las curvas de crecimiento obtenidas están representadas en la **figura 40**.

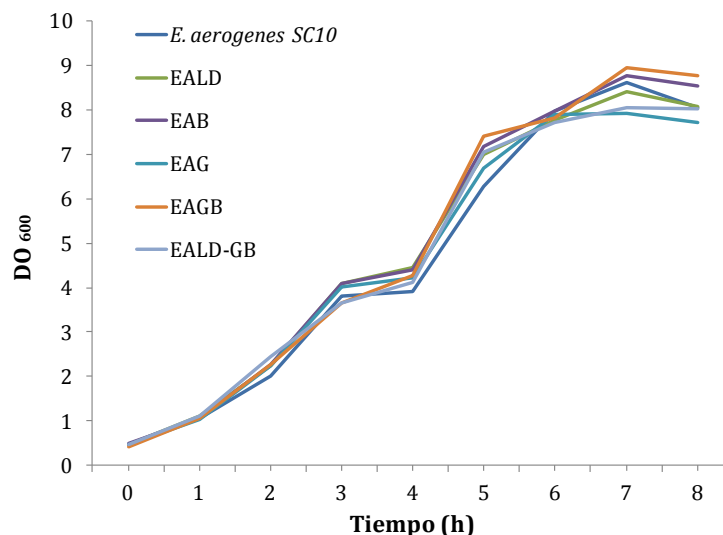


Figura 40. Curvas de crecimiento obtenidas para las distintas cepas en medio EA suplementado con sacarosa.

Se observó un tipo de crecimiento diáuxico para las cepas mutantes, al igual que para la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10. A partir de las curvas se calculó la velocidad específica de crecimiento para las distintas cepas en la primera y segunda fase exponencial, obteniendo así los datos que se muestran en la [figura 41](#). No se detectaron diferencias significativas en el crecimiento de ninguna de las cepas mutantes con respecto a la silvestre, aunque en todos los casos se alcanzaron valores de D.O. más altos al final de la curva.

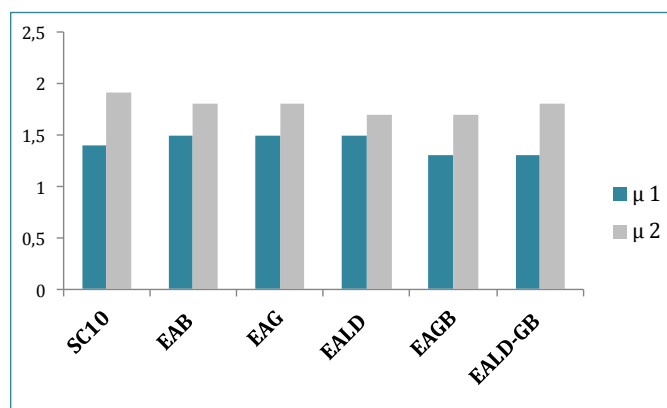


Figura 41. Velocidades específicas en la primera y segunda fase exponencial ($\mu 1$ y $\mu 2$) de la curva de crecimiento diáuxico de las diferentes cepas de estudio.

Estos resultados sugieren que la sobreproducción de las enzimas GAPDH y BDH y la supresión de la enzima LDH no afectaron al crecimiento de *E. aerogenes*.

4.4.1.5.2. Estudio de utilización de carbohidratos

La capacidad de producción de ácido y gas a partir de carbohidratos por parte de las diferentes cepas mutantes se evaluó mediante la prueba de rojo fenol (apartado 3.10.3.5. de material y métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 14**.

Tabla 14. Resultados de utilización de diversos carbohidratos por parte de la cepa silvestre y mutantes de *E. aerogenes* SC10.

CEPA	GLUCOSA		FRUCTOSA		LACTOSA		SACAROSA	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
SC10	++	++	+	+	-	±	+	+
EAB	++	++	+	+	±	+	+	+
EAG	++	++	+	+	-	-	+	+
EALD	++	++	+	+	+	+	+	+
EAGB	++	++	+	+	-	-	+	+
EALD-GB	++	++	+	+	-	±	+	+

+, producción de ácido; ++, producción fuerte de ácido; ±, producción de ácido intermedia; -, resultado negativo.

A partir de los resultados se puede determinar que todas las cepas produjeron ácidos a partir de glucosa, fructosa y sacarosa. En el caso de la utilización de lactosa como fuente de carbono, la producción de ácido se vió más limitada. Las cepas EAG y EAGB no produjeron ácido a partir de dicho carbohidrato.

4.4.1.5.3. Estudio de tolerancia a distintos factores

- Tolerancia a temperatura:

Con el objetivo de determinar posibles alteraciones en la tolerancia a temperatura de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre, se llevó a cabo un estudio de crecimiento a distintas temperaturas.

Además, el uso de microorganismos tolerantes a un rango de temperatura más amplio para la producción de 2,3-BDO permite abaratar el proceso, ya que se evita el uso de sistemas de enfriamiento, que son muy costosos y evita paradas debidas a sobrecalentamientos, además de reducir la posibilidad de contaminación de los medios (Laluce, 1991). Por ello, se determinó si existían cepas entre las estudiadas con una mayor capacidad de crecimiento a alta temperatura.

Se monitorizó el crecimiento de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes derivadas de ella a distintas temperaturas de incubación: 28°C, 37°C y 45°C (figura 42), según el protocolo descrito en el apartado 3.10.2.2. de material y métodos.

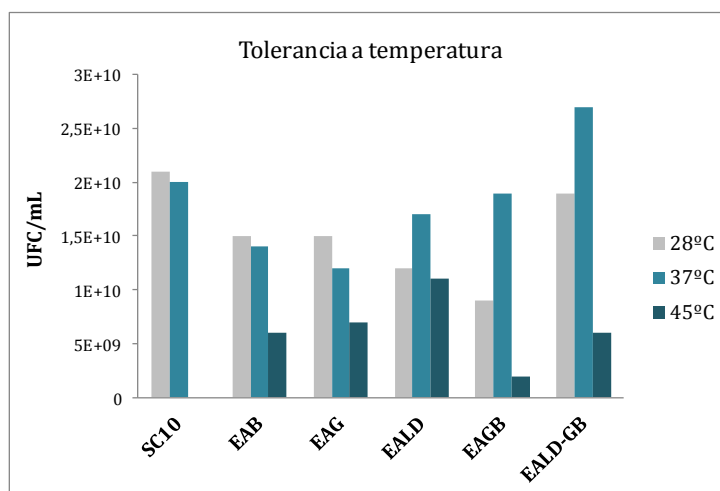


Figura 42. Tolerancia a distintas temperaturas de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.

En condiciones de crecimiento a 28°C, la cepa silvestre presentó un mejor crecimiento con respecto a las cepas mutantes. La incubación a 37°C, sin embargo, supuso una mejora en el crecimiento para la mayoría de los mutantes.

A 45°C, se produjo una disminución en el crecimiento de todas las cepas mutantes, y una inhibición completa del crecimiento en la cepa silvestre. Los valores de reducción del crecimiento a 45°C con respecto a 37°C fueron de 57%, 42%, 35%, 89% y 78% para las cepas EAB, EAG, EALD, EAGB y EALD-GB respectivamente. Por lo tanto, se puede afirmar que la cepa que presenta mayor resistencia a valores altos de temperatura es la cepa EALD.

- Tolerancia a sacarosa:

Se evaluó la capacidad de las distintas cepas objeto de estudio de tolerar concentraciones crecientes de sacarosa, sin verse afectadas en su crecimiento y viabilidad, determinando si existían alteraciones por parte de las cepas mutantes en cuanto al metabolismo de este carbohidrato.

Por otra parte, la tolerancia de determinada cepa a concentraciones altas de esta fuente de carbono añadidas al medio para el proceso de obtención de 2,3-BDO sin perjuicio para su crecimiento representaría una ventaja para uso como cepa productora en la industria.

El ensayo se realizó conforme a lo descrito en el apartado 3.10.2.2. de material y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 43**.

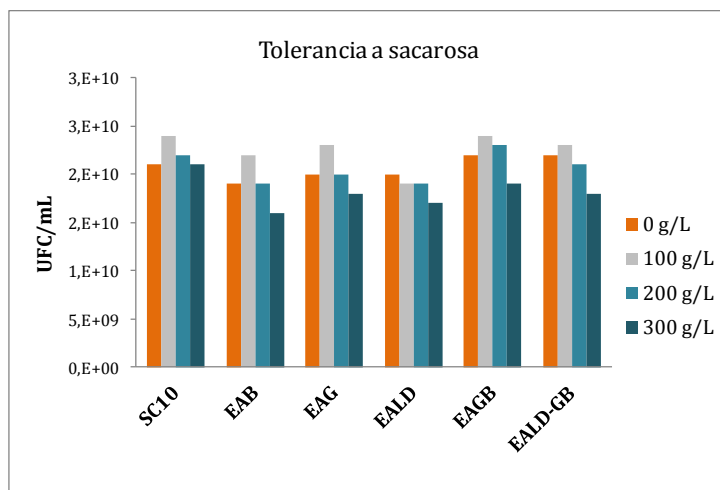


Figura 43. Tolerancia a distintas concentraciones de sacarosa de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.

El crecimiento de todas las cepas se vió incrementado en medio con 100 g/L de sacarosa con respecto al medio al que no se añadió este carbohidrato. A partir de una concentración de 200 g/L, el crecimiento de algunas cepas comenzó a disminuir, aunque fue 300 g/L la concentración a la cual un exceso de sacarosa ralentizó el crecimiento en todas las cepas. En vista de estos resultados se determinó que la cantidad de sacarosa a utilizar para la producción de 2,3-BDO por las cepas del estudio no debía superar los 100 g/L.

No se observaron diferencias importantes en la tolerancia a las distintas concentraciones de sacarosa entre las cepas mutantes y la silvestre, por lo que las modificaciones genéticas realizadas no afectaron a este parámetro en *E. aerogenes* SC10.

- Tolerancia a 2,3-BDO:

Se evaluó la capacidad de las cepas mutantes de soportar concentraciones crecientes de 2,3-BDO, sin verse afectadas en su crecimiento y viabilidad, y se compararon con la cepa silvestre, comprobando de este modo si las alteraciones genéticas de las primeras influyeron en la tolerancia a este producto de la fermentación.

La capacidad por parte de una cepa bacteriana utilizada para la producción de 2,3-BDO de soportar cantidades altas de este compuesto, sin que se retarde o inhiba su crecimiento, resulta una ventaja importante para su uso industrial.

Con el fin de determinar la concentración de 2,3-BDO acumulado en el medio de cultivo a partir de la cual se inhibía el crecimiento de las distintas cepas, se llevó a cabo un ensayo de tolerancia a diferentes concentraciones según el protocolo descrito en el apartado 3.10.2.2. de material y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la [figura 44](#).

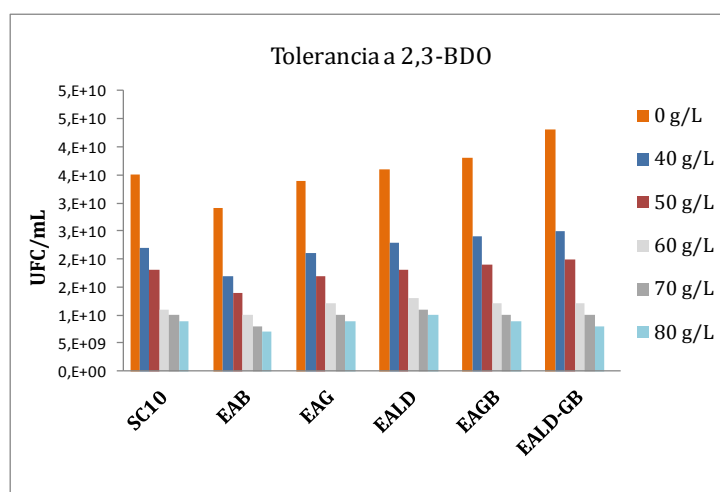


Figura 44. Tolerancia a distintas concentraciones de 2,3-BDO de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.

El crecimiento de todas las cepas fue disminuyendo a medida que aumentaba la concentración de 2,3-BDO en el medio de cultivo. El mayor declive se produjo cuando se añadió una concentración de 60 g/L de 2,3-BDO al medio, produciéndose un descenso medio del crecimiento de un 33% con respecto a la concentración anterior (50 g/L). Por lo tanto, se puede considerar que una concentración a partir de 50 g/L de 2,3-BDO tiene un importante efecto tóxico en el crecimiento de las cepas del estudio. Con una concentración de 100 g/L el crecimiento se inhibió completamente para todas las cepas.

La cepa que experimentó un mayor crecimiento a concentraciones moderadas de 2,3-BDO (de 0 a 50 g/L) fue la cepa EALD-GB. A mayores concentraciones (de 60 a 80 g/L), creció mejor la cepa EALD.

La cepa que experimentó un menor crecimiento a concentraciones moderadas de 2,3-BDO (de 0 a 50 g/L) fue la cepa silvestre, *E. aerogenes* SC10. A mayores concentraciones (de 60 a 80 g/L), la cepa con menor crecimiento fue la cepa EAB.

- Tolerancia a pH:

Debido a que en el proceso de fermentación que da lugar a 2,3-BDO, como se ha descrito anteriormente, se producen otra serie de metabolitos que modifican el valor de pH del medio, se evaluó la capacidad de las cepas de estudio a adaptarse a distintos valores de pH. Los datos obtenidos se muestran en la [figura 45](#).

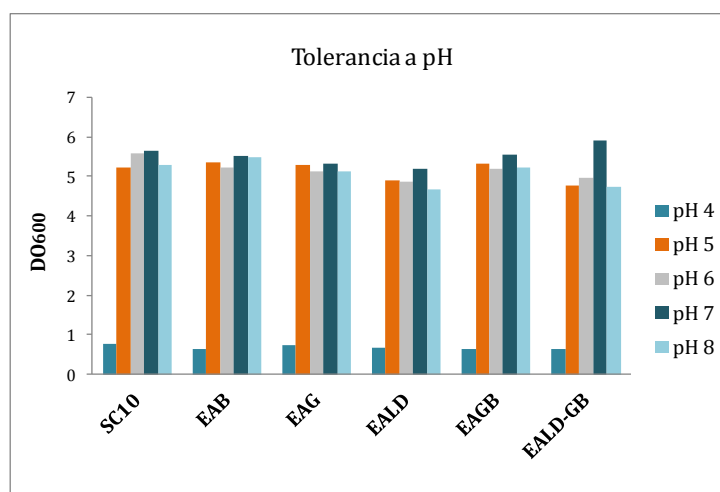


Figura 45. Tolerancia a distintos valores de pH de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10 y las cepas mutantes.

A la vista de los resultados, se puede afirmar que todas las cepas crecieron a valores de pH entre 5 y 8 sin variaciones importantes, siendo el óptimo un pH 7. A valores de pH 4 se produjo un descenso considerable del crecimiento en todas las cepas, aunque no se vió inhibido por completo.

4.4.1.5.4. Estudio de actividades enzimáticas

- Actividad enzimática butanodiol deshidrogenasa (BDH):

Para comprobar que las cepas EAB, EAGB y EALD-GB sobreexpresaban el gen *bdh* se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática BDH (**figura 46**) tal y como se describe en el apartado 3.10.3.6. de material y métodos.

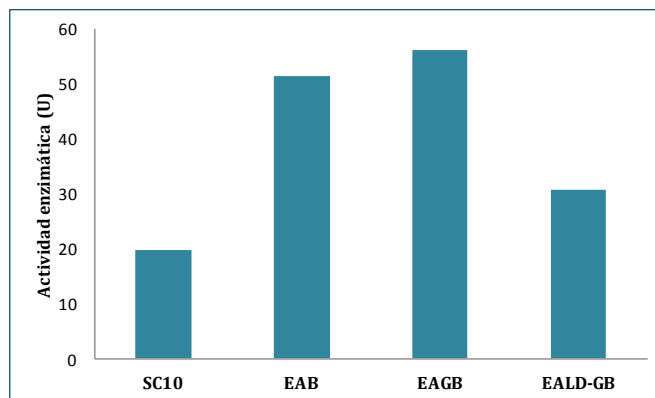


Figura 46. Actividad enzimática BDH en las cepas con sobreexpresión del gen *bdh*.

La actividad enzimática BDH se vió incrementada en las cepas que sobreexpresaban el gen *bdh* con respecto a la cepa silvestre, con incrementos del 159%, 184 % y 55% para las cepas EAB, EAGB y EALD-GB respectivamente. Estos resultados indican que la sobreexpresión del gen *bdh* tuvo como consecuencia directa la sobreproducción de la enzima BDH y el aumento de su actividad enzimática.

- Actividad enzimática gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH):

Para comprobar que las cepas EAG, EAGB y EALD-GB sobreexpresaban el gen *gapA* se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática GAPDH (**figura 47**) tal y como se describe en el apartado 3.10.3.6. de material y métodos.

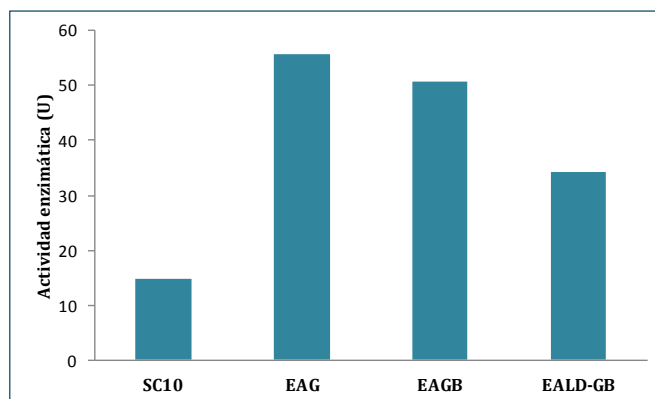


Figura 47. Actividad enzimática GAPDH en las cepas con sobreexpresión del gen *gapA*.

La actividad enzimática GAPDH se vio incrementada en las cepas que sobreexpresaban el gen *gapA* con respecto a la cepa silvestre, con incrementos del 280%, 245 % y 34% para las cepas EAG, EAGB y EALD-GB respectivamente.

- Actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH)

Para comprobar el efecto en las cepas EALD y EALD-GB de la interrupción del gen *ldhA*, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática LDH (figura 48) tal y como se describe en el apartado 3.10.3.6. de material y métodos.

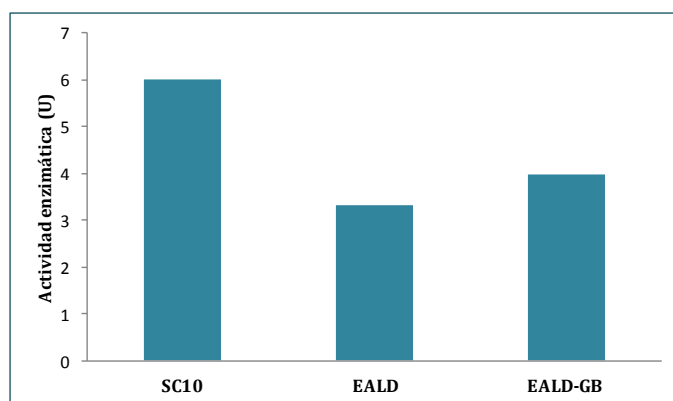


Figura 48. Actividad enzimática LDH para las cepas con interrupción del gen *ldhA*.

En las cepas en las que se delecionó el gen *ldhA*, se observó un descenso en la actividad enzimática LDH con respecto a la cepa silvestre, con una disminución del 44% y 33% para las cepas EALD y EALD-GB respectivamente. Por ello se puede afirmar que la síntesis y por lo tanto la actividad de la enzima LDH se vio truncada por la interrupción del gen *ldhA*.

4.4.1.6. Estudio de producción de 2,3-BDO por las cepas mutantes

4.4.1.6.1. Optimización de las condiciones de producción de 2,3-BDO en *E. aerogenes*

La determinación de las condiciones óptimas para la obtención de un alto rendimiento en la producción de 2,3-BDO se llevó a cabo utilizando la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10, ya que luego estas condiciones podrían adaptarse a la producción por parte del resto de cepas. Para ello se tuvieron en cuenta también datos aportados por los ensayos anteriormente realizados de tolerancia a distintos factores (apartado 4.4.1.5.3.).

- Condiciones de aireación:

La disponibilidad de oxígeno en el proceso de fermentación butanodiólica determina la predominancia de formación de unos metabolitos respecto a otros (Perego *et al.*, 2000). Por ello, para determinar la condición óptima en la que se produce 2,3-BDO por encima de otros metabolitos, se ensayó la producción de 2,3-BDO en condiciones de microaerobiosis y anaerobiosis.

En condiciones de anaerobiosis no se detectó producción de 2,3-BDO, formándose otros productos como ácido succínico, ácido láctico y 1,3-propanodiol. En condiciones de microaerobiosis sí se obtuvo 2,3-BDO, en cantidades variables en función del resto de condiciones del cultivo.

- Medio de cultivo utilizado (nutrientes):

Para la producción de 2,3-BDO se ensayaron 3 medios distintos de cultivo: TSB, SRT y EA, cuya composición se describe en el apartado 3.2. de material y métodos, suplementados con sacarosa a una concentración final de 90 g/L.

Los resultados de crecimiento y producción de 2,3-BDO a las 24 h de cultivo en los tres medios ensayados se encuentran representados en la **figura 49**.

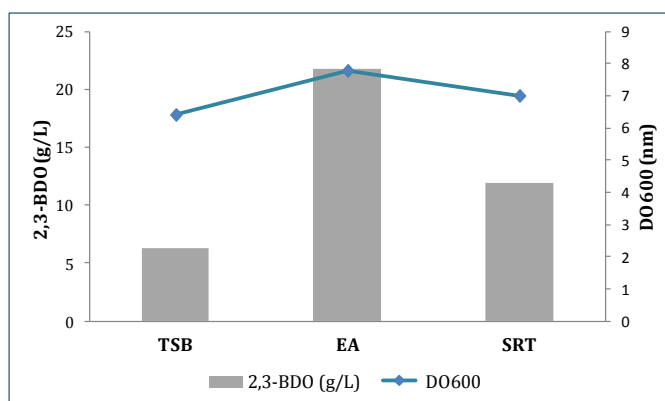


Figura 49. Crecimiento y producción de 2,3-BDO en los medios de cultivo TSB, EA y SRT.

Se observó un mayor crecimiento en el medio EA, debido posiblemente a la mayor cantidad de sustancias nutritivas respecto a los otros medios de cultivo, que se verían limitados a las 24 h de cultivo.

Además, en este medio se produjo un 245% más de 2,3-BDO que en medio TSB y un 83% más que en medio SRT.

A partir de estos datos, se eligió el medio EA como medio de cultivo para los ensayos de producción de 2,3-BDO con las cepas de *E. aerogenes*.

Con el objetivo de optimizar la producción en los cultivos en medio EA, y obtener valores mayores de crecimiento y producción de 2,3-BDO, se estudió la adición de una fuente nutritiva (extracto de levadura) al medio de cultivo a las 24 h. De esta forma se evitaría una posible limitación en el crecimiento por el agotamiento de nutrientes y las bacterias podrían seguir produciendo 2,3-BDO a partir de las 24 h de cultivo.

Para ello se realizaron cultivos en paralelo en medio EA con 90 g/L, con un suplemento de extracto de levadura a las 24 h de cultivo a una concentración de 2,5 g/L (50% de la cantidad inicial), y medio EA con 90 g/L de sacarosa sin dicho suplemento (figura 50).

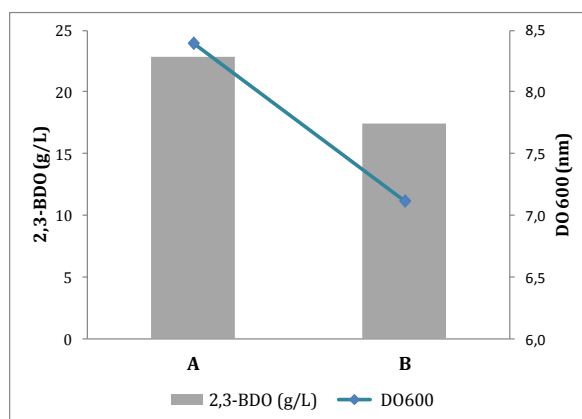


Figura 50. Crecimiento y producción de 2,3-BDO en medio de cultivo con y sin extracto de levadura (A y B respectivamente) a las 24 h.

A partir de los datos obtenidos se pudo concluir que la adición de extracto de levadura al cultivo tras 24 h provoca un aumento del crecimiento entre las 24-48 h mayor que cuando el medio no es suplementado, así como una mayor producción de 2,3-BDO. El crecimiento es de un 18% mayor la producción de 2,3-BDO se incrementa en un 24%.

- Azúcares

Se estudiaron las posibles diferencias de producción de 2,3-BDO utilizando glucosa pura como fuente de carbono, que sería directamente utilizada por la bacteria para iniciar la ruta de producción de 2,3-BDO, y sacarosa, que tendría que ser descompuesta en sus dos monosacáridos (fructosa y glucosa) antes de ser utilizada para sintetizar 2,3-BDO.

Se prepararon medios de cultivo con medio EA como base al que se añadió glucosa (60 g/L) o sacarosa (90 g/L).

No se observaron diferencias en el crecimiento de la cepa de estudio a las 24 h de cultivo, por lo que se puede afirmar que éste no se vió afectado en función de la fuente de carbono utilizada (glucosa o sacarosa).

En cuanto a la producción de 2,3-BDO, con la utilización de sacarosa se obtuvo una mayor cantidad de este compuesto con respecto al producido a partir de glucosa. Así, se obtuvo que la cepa *E. aerogenes* SC10 produce un 31% más de 2,3-BDO utilizando sacarosa como azúcar en lugar de glucosa pura.

- Cantidad de células:

Se estudió el efecto de la cantidad inicial de células en el cultivo en la producción de biomasa y 2,3-BDO. Para ello se compararon datos de biomasa en cultivos de 24 h con los datos de producción de 2,3-BDO en ese mismo momento (**figura 51**).

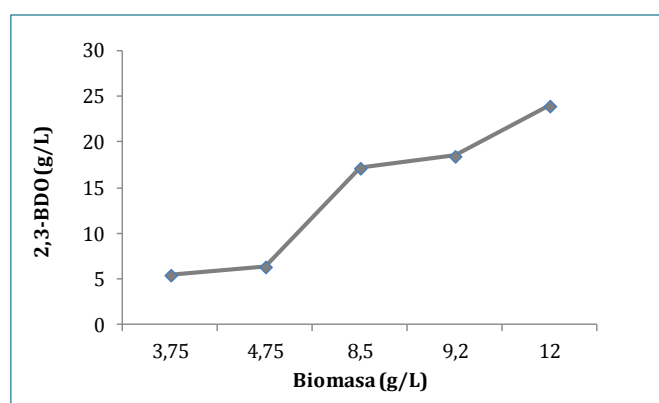


Figura 51. Relación biomasa/2,3-BDO en cultivos de 24 h de *E. aerogenes*.

El mejor resultado de producción de 2,3-BDO se obtuvo cuando se alcanzó una biomasa de 12 g/L en el cultivo. Este valor de biomasa se obtuvo al inocular un pre-cultivo de la bacteria con una DO_{600} de 6 en el medio de cultivo de producción a una concentración final de un 4%. Por lo tanto se determinó que estas deberían ser las condiciones iniciales del cultivo para obtener cantidades considerables de 2,3-BDO.

- Tiempo de fermentación

Se determinó el momento óptimo para recoger las muestras y recuperar el 2,3-BDO producido del medio de cultivo. Para ello se comparó la concentración de este compuesto en el medio a diferentes horas a lo largo del cultivo (**figura 52**).

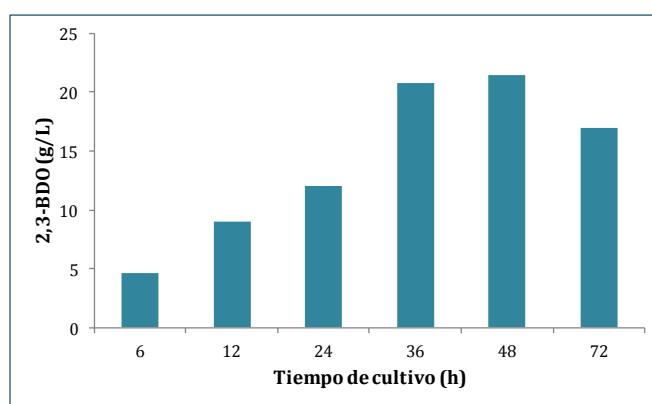


Figura 52. Evolución de la concentración de 2,3-BDO por *E. aerogenes* a diferentes horas de cultivo.

En vista de los resultados obtenidos, el período seleccionado para la toma de muestras en los posteriores ensayos fue de las 24 h a las 48 h de cultivo, donde se observó un mayor crecimiento en la concentración de 2,3-BDO. A partir de las 48 h de cultivo la concentración comenzó a descender.

4.4.1.6.2. Ensayo de producción de 2,3-BDO por las cepas mutantes

El ensayo de producción de 2,3-BDO por parte de las distintas cepas se llevó a cabo con las condiciones optimizadas a partir de la cepa *E. aerogenes* SC10 y según el protocolo descrito en el apartado 3.12.1. de material y métodos.

Se estudiaron los efectos de las sobreexpresiones de los genes *bdh* y *gapA* y la interrupción del gen *ldhA* en la producción de biomasa, 2,3-BDO, ácido láctico, ácido succínico y etanol, así como en el consumo de sacarosa.

El consumo de sacarosa (**figura 53a**) se vió incrementado en la cepa con sobreexpresión del gen *gapA* (EAG), a la vez que la velocidad de consumo, siendo esta un 28% mayor que en la cepa silvestre. Como se esperaba, la tasa de consumo de sacarosa (y por tanto glucosa) fue mejorada por la sobreproducción de la enzima GAPDH, y por consiguiente el ratio de glucólisis y la formación de piruvato como sustrato para la síntesis de 2,3-BDO.

En las cepas EALD y EALD-GB, con interrupción del gen *ldhA*, también aumentó el consumo de sacarosa, siendo de un 23% y 24% mayor que en la cepa silvestre respectivamente, a la vez que la producción de 2,3-BDO fue mayor que en la cepa silvestre.

En las cepas con sobreexpresión del gen *bdh* se produjo una ligera reducción en la tasa de consumo de sacarosa, aunque esto no afectó a la producción de 2,3-BDO, que aumentó al igual que en todas las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre, de la misma forma que la velocidad de producción de este compuesto (**figura 53b**).

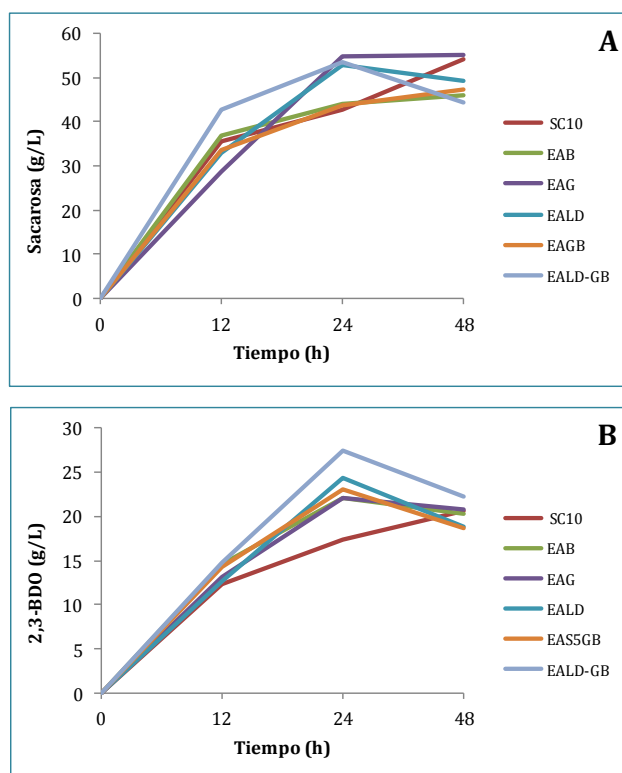


Figura 53. Evolución del consumo de sacarosa (**A**) y producción de 2,3-BDO (**B**) por las cepas de estudio a lo largo del cultivo.

Para analizar la redistribución de los flujos metabólicos en la ruta de síntesis del 2,3-BDO como consecuencia de las modificaciones genéticas realizadas, se determinaron las concentraciones obtenidas de los principales metabolitos en todas las cepas a las 24 h de cultivo (**figura 54**).

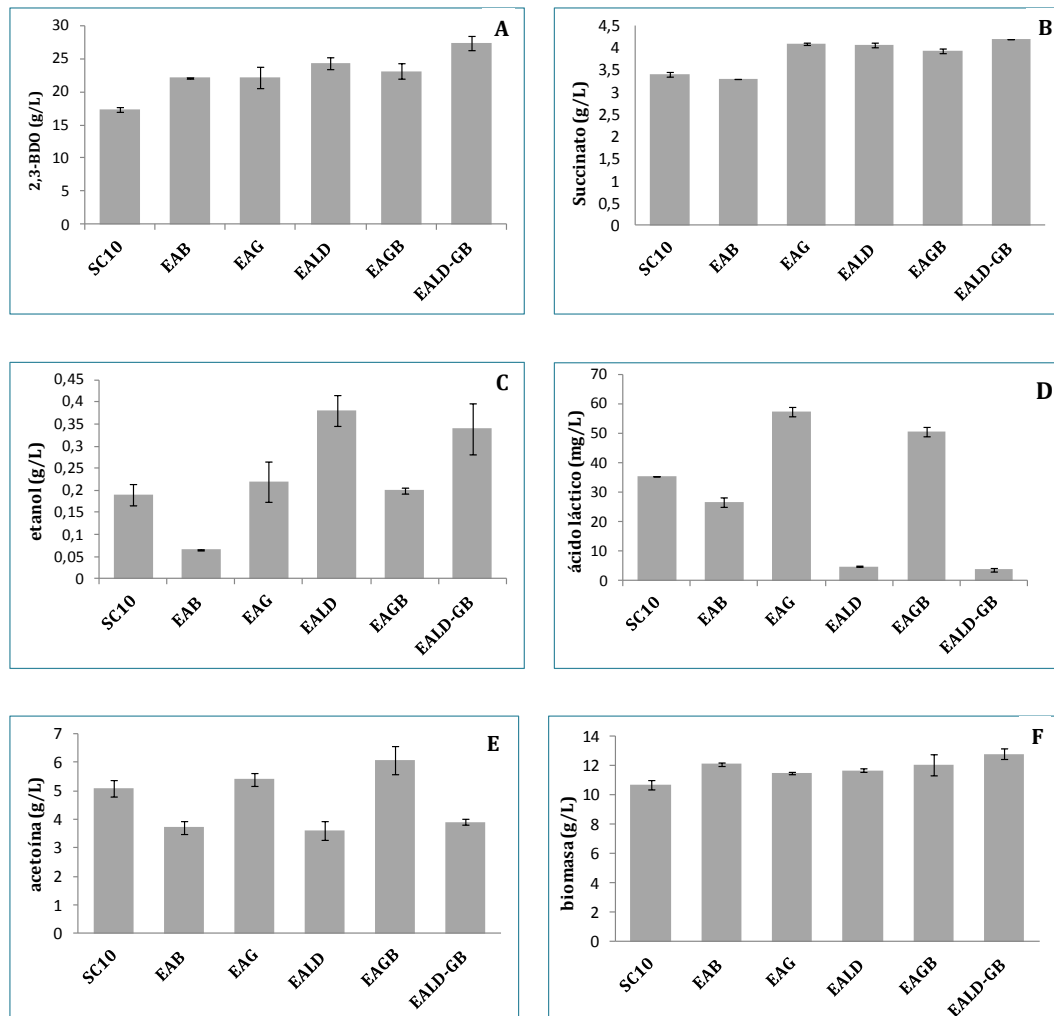


Figura 54. Concentraciones obtenidas para los principales metabolitos producidos en la ruta de síntesis de 2,3-BDO por la cepa silvestre y mutantes.

La producción de ácido láctico experimentó un descenso importante en las cepas con interrupción del gen *ldhA*, siendo esta reducción de un 86% y un 89% con respecto a la cepa silvestre en las cepas EALD y EALD-GB, respectivamente, confirmando la correcta interrupción de dicho gen.

Sin embargo, la formación de este metabolito se vió incrementada en las cepas EAG y EAGB, con sobreexpresión del gen *gapA*. Esto podría explicarse por la mayor disponibilidad de NADH y piruvato, necesarios para la producción de ácido láctico, debido a la mayor actividad de la enzima GAPDH.

La cepa EAG también incrementó la producción con respecto a la cepa silvestre de otros metabolitos dependientes de NADH y piruvato producidos en la ruta (acetoína, succinato y etanol). En cambio, en la cepa EAB, con sobreproducción de la enzima BDH, disminuyó la producción de esos metabolitos en favor de la producción de 2,3-BDO.

El 2,3-BDO fue el metabolito producido en mayor cantidad en todas las cepas del estudio.

En cuanto a la producción de biomasa, como se muestra en la [figura 54f](#), no se vió afectada en ninguna de las cepas mutantes. Por ello, se puede confirmar que las modificaciones genéticas realizadas no tienen efectos en el crecimiento, como se observó también en el apartado 4.4.1.5.1.

El rendimiento de producción de 2,3-BDO ([figura 55](#)) fue mayor en casi la totalidad de las cepas mutantes en comparación con los valores de la cepa silvestre, exceptuando la cepa EAG, que no presentó diferencias significativas con respecto a la silvestre. El mayor aumento se observó en las cepas con sobreexpresión del gen *bdh*.

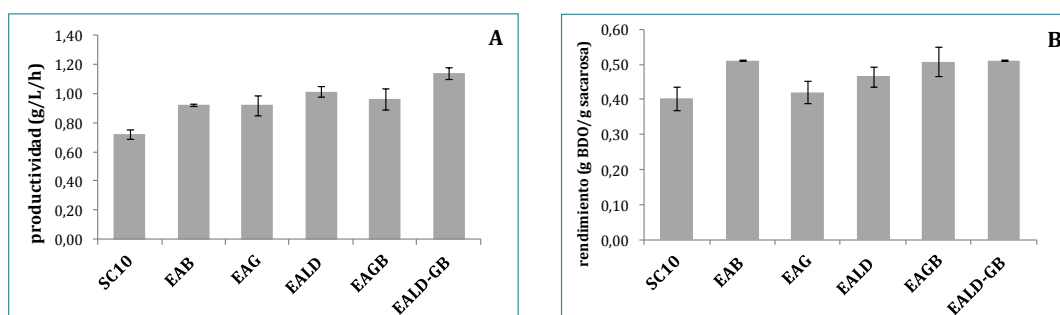


Figura 55. Productividad (A) y rendimiento (B) de la producción de 2,3-BDO obtenidos para las distintas cepas del estudio.

La productividad se vió incrementada en todas las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre llegando a ser incluso un 58% mayor para la cepa EALD-GB.

4.5. UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO

4.5.1. Caracterización de residuos agroindustriales

Se determinó la composición en cuanto a azúcares de residuos de naranja, piña y remolacha, para conocer de esta forma si podían ser utilizados para la producción de 2,3-BDO.

En primer lugar se determinó el tipo de azúcares presentes en los residuos mediante cromatografía en capa fina (TLC). El análisis mediante TLC se llevó a cabo en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química (Universidad de Sevilla). Como resultado se obtuvo que el residuo de piña contenía monosacáridos y disacáridos y los residuos de naranja y remolacha contenían además restos de polisacáridos (**figura 56**).

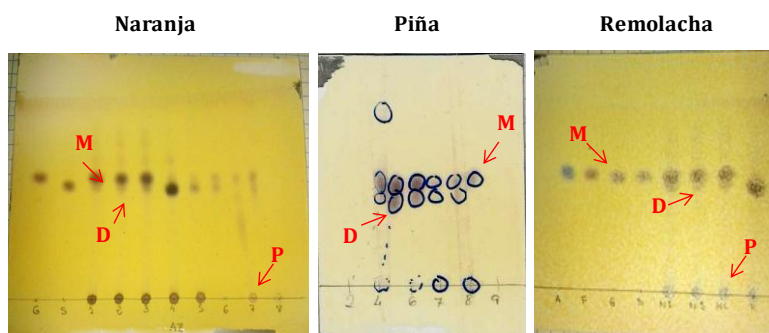


Figura 56. Placas de TLC en las que se aprecian disacáridos (D), monosacáridos (M) y polisacáridos (P) provenientes de residuos de naranja, piña y remolacha.

4.5.2. Obtención de azúcares fermentables a partir de los residuos agroindustriales

En primer lugar, los distintos residuos fueron sometidos a un pre-tratamiento mecánico que consistió en su trituración, con el objetivo de disminuir el tamaño de las partículas del residuo en cuestión y facilitar así los procesos posteriores. A continuación se llevó a cabo un proceso de hidrólisis (autohidrólisis, hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida), según los procedimientos descritos en el apartado 3.13. de material y métodos para liberar los azúcares presentes en los mismos y hacerlos disponibles para los microorganismos productores de 2,3-BDO.

Posteriormente se determinó la concentración de los azúcares obtenidos para cada tipo de residuo y cada tratamiento realizado (**tabla 15**) mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Tabla 15. Azúcares obtenidos mediante tratamientos de hidrólisis de los distintos residuos.

RESIDUO DE PIÑA				
Tratamiento	Arabinosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)
Autohidrólisis	trazas	15.3	12.7	8.4
Hidrólisis ácida	0.4	9.4	12	0.77
Hidrólisis enzimática	trazas	14.3	12.8	7.97
RESIDUO DE REMOLACHA				
Tratamiento	Arabinosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)
Autohidrólisis	trazas	0.1	0.9	6.8
Hidrólisis ácida	2.77	0.42	0.48	trazas
Hidrólisis enzimática	0.54	0.31	0.28	1.14
RESIDUO DE NARANJA				
Tratamiento	Arabinosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)
Autohidrólisis	nd	15.4	11.9	7.3
Hidrólisis ácida	nd	8.1	7.5	6.8
Hidrólisis enzimática	nd	13.9	10.2	12.1

nd= no detectado.

A partir del residuo de piña se obtuvo como azúcar predominante la fructosa, seguido de glucosa y sacarosa. Las cantidades de arabinosa obtenidas fueron prácticamente despreciables. En cuanto a la concentración de azúcares totales, la autohidrólisis fue el proceso con el que mayor valor se alcanzó (36.4 g/L), seguido de la hidrólisis enzimática (35.07 g/L) y la hidrólisis ácida (22.57 g/L). Con respecto a los azúcares de utilidad para la síntesis de 2,3-BDO (sacarosa y glucosa), se obtuvo mayor cantidad mediante el proceso de autohidrólisis (21.1 g/L).

Los tratamientos de hidrólisis de residuo de remolacha dieron lugar a cantidades reducidas de azúcares, predominando la sacarosa en los procesos de autohidrólisis e hidrólisis enzimática y la arabinosa en el proceso de hidrólisis ácida. La mayor concentración de azúcares totales (7.8 g/L) se obtuvo mediante autohidrólisis, que fue también el tratamiento mediante el que se logró mayor concentración de azúcares utilizables para la producción de 2,3-BDO (sacarosa y glucosa), con un valor de 7.7 g/L.

El residuo de naranja liberó mayoritariamente fructosa tras los distintos tratamientos de hidrólisis, seguida de glucosa y sacarosa. La concentración de arabinosa obtenida a partir de este residuo también fue despreciable. La concentración de azúcares totales fue superior en el tratamiento por hidrólisis enzimática (36.2 g/L), seguida de la autohidrólisis (34.6 g/L) y la hidrólisis ácida (22.4 g/L). Los azúcares utilizables para la

síntesis de 2,3-BDO (sacarosa y glucosa) predominaron en el residuo tratado por hidrólisis enzimática, obteniendo una concentración de 22.3 g/L.

Entre los tres tipos de residuo tratados, los de piña y naranja liberaron cantidades de azúcares similares mediante los tres procesos de hidrólisis, aunque fue el residuo de naranja el que liberó mayor cantidad de azúcares aprovechables para la producción de 2,3-BDO, tanto glucosa que podría entrar directamente en la vía de formación de piruvato como sacarosa, que podría hidrolizarse para así obtener la glucosa contenida en la misma.

Tras determinar la cantidad de azúcares obtenida de los residuos, se calcularon los rendimientos de cada proceso en función de la cantidad de residuo utilizado para preparar los hidrolizados y la cantidad de azúcares obtenidos a partir de éste, medidos en gramos totales de azúcares obtenidos por gramo de material empleado (figura 57).

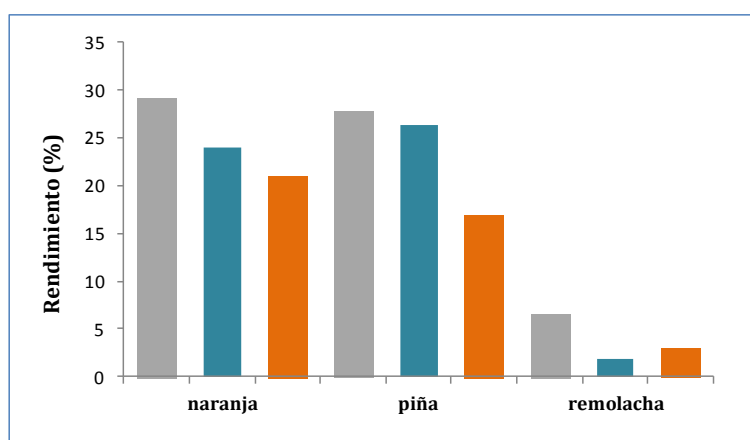


Figura 57. Rendimientos en % obtenidos para la autohidrólisis (gris), hidrólisis enzimática (verde) e hidrólisis ácida (naranja) de los distintos residuos tratados.

Los rendimientos obtenidos en los distintos tratamientos del residuo de naranja fueron del 29.2 % para la autohidrólisis, 24 % para la hidrólisis enzimática y 21% para la hidrólisis ácida. Valores similares se obtuvieron a partir del procesamiento del residuo de piña: 27.7% (autohidrólisis), 26.3% (hidrólisis enzimática) y 17% (hidrólisis ácida). Sin embargo, en el caso del residuo de remolacha los valores de rendimiento alcanzados disminuyeron significativamente, siendo del 6.5%, 1.8% y 3% respectivamente.

Estos resultados indican que el proceso con mayor rendimiento en todos los casos y que por lo tanto resultaría más rentable es la autohidrólisis, así como la hidrólisis ácida sería la menos provechosa.

Los reducidos valores de rendimiento obtenidos a partir de los residuos de remolacha llevaron a descartar este residuo para su utilización en la producción de 2,3-BDO.

4.5.3. Detoxificación de los residuos

En el proceso de cuantificación de los azúcares obtenidos a partir de residuo de naranja por medio de los tratamientos de hidrólisis se observó la presencia de furfural e hidroximetil furfural (HMF), subproductos provenientes de la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en los residuos formados por material lignocelulósico. El furfural es resultado de la degradación de pentosas, mientras que el HMF proviene de la degradación de hexosas (Oliva, 2003). Estos compuestos resultan tóxicos ya que inhiben el metabolismo microbiano (Rodrigues *et al.*, 2001). Además, se observó la presencia de limoneno, presente de forma natural en los cítricos y con acción antimicrobiana.

Con el objetivo de reducir la toxicidad del autohidrolizado de naranja debido a la presencia de furfural y limoneno, se llevó a cabo un proceso de detoxificación mediante resina de adsorción, utilizando una columna con resina Amberlite XAD4®, tal como se describe en el apartado 3.13.5. de material y métodos.

Se cuantificó el contenido en azúcares del autohidrolizado de naranja antes y después de su paso por la columna (**tabla 16**).

Tabla 16. Cuantificación de azúcares de autohidrolizado de naranja antes y después de su detoxificación.

Hidrolizado	Arabinosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)
AN sin detoxificar	nd	15.4	11.9	7.3
AN detoxificado	nd	14.3	11	7.2

AN= autohidrolizado de naranja.

La detoxificación supuso una disminución del 7.1% en contenido de fructosa, 7.6% en contenido de glucosa y 1.3% en contenido de sacarosa con respecto a la muestra sin detoxificar, debido a la retención de parte de los azúcares en la columna utilizada para la eliminación de los compuestos tóxicos del hidrolizado.

4.5.4. Ensayos de crecimiento

Con el objetivo de conocer qué residuos podrían ser utilizados para la producción de 2,3-BDO por parte de la cepa productora seleccionada en este trabajo, se prepararon medios de cultivo a partir de los autohidrolizados de residuos de piña (P1 y P2) y naranja (N1 y N2), cuya composición se describe en el apartado 3.2. de material y métodos.

Se probó si existía o no crecimiento de la cepa productora de 2,3-BDO *E. aerogenes* SC10 en cultivos de 24 h utilizando los distintos medios (**tabla 17**).

Tabla 17. Crecimiento de la cepa *E. aerogenes* SC10 medios de cultivo preparados a partir de residuos.

Medio de cultivo	Crecimiento
P1	-
P2	+
N1	+
N2	+

Como indican los resultados, la cepa de estudio fue capaz de crecer en todos los medios a excepción del medio P1. Por lo tanto, se confirma la posibilidad de aprovechar residuos de piña y naranja para la preparación de medios de cultivo con contenido en azúcares fermentables para la síntesis de 2,3-BDO.

4.5.5. Producción de 2,3-BDO a partir de los residuos

Para probar la producción de 2,3-BDO a partir de residuo de piña se escogió el medio de cultivo P2, puesto que fue el medio preparado a partir de este residuo en el que se observó crecimiento. La producción de 2,3-BDO a partir de residuo de naranja se ensayó utilizando el medio de cultivo N2 debido a que en este medio el crecimiento fue mayor que en el medio N1.

La obtención de 2,3-BDO se llevó a cabo en matraces con los distintos medios de cultivo inoculados con la bacteria *E. aerogenes* SC10, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.12.1. de material y métodos.

Se obtuvo 2,3-BDO a partir de ambos residuos, aunque la producción fue mayor cuando se utilizó residuo de naranja (**figura 58**).

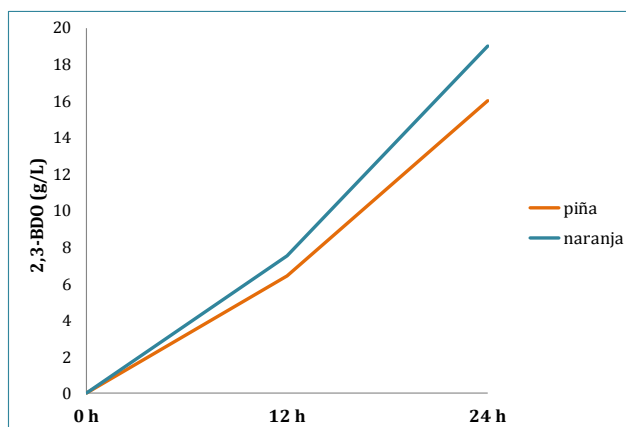


Figura 58. Producción de 2,3-BDO a partir de residuos de naranja y piña.

A las 12 horas incubación, la producción de 2,3-BDO fue un 17,2% mayor en el cultivo preparado a partir de naranja, al igual que a las 24 horas de incubación, cuando se alcanzó una producción de 2,3-BDO un 18,75% mayor que la conseguida a partir de residuo de piña.

En cuanto a los rendimientos, utilizando residuos de naranja, se obtuvieron 0.15 g 2,3-BDO/g de cáscara de naranja. Utilizando residuos de piña se obtuvieron 0.05 g 2,3-BDO/g de pulpa de piña.

A partir de los datos obtenidos en los diferentes ensayos realizados sobre los residuos se puede determinar que el residuo de naranja sería el más idóneo para su utilización en la producción de 2,3-BDO.

4.6. OBTENCIÓN DE CEPAS SEGURAS PARA LA PRODUCCIÓN DE 2,3-BDO

Como se vió en la introducción, *E. aerogenes* se incluye dentro del grupo de microorganismos de riesgo 2, según la legislación española en cuanto a agentes biológicos, pudiendo causar enfermedad en el hombre y suponer un peligro para los trabajadores.

Por ello, nos propusimos obtener cepas de *E. aerogenes* más seguras mediante mutación de uno de los principales factores de patogenicidad, las fimbrias de tipo I.

4.6.1. Estudio *in silico* de los genes de síntesis de fimbrias

Para determinar la subunidad de las fimbrias a mutar (codificadas por el cluster *fim*) y evitar así su síntesis en *E. aerogenes*, se llevó a cabo un estudio *in silico* de la región del genoma en la que se encuentra el cluster *fim* (EAE 02395-EAE 02440) y se realizó un análisis de su entorno genómico mediante la herramienta web Absynte (Despalins *et al.*, 2011), como se muestra en la **figura 59**.

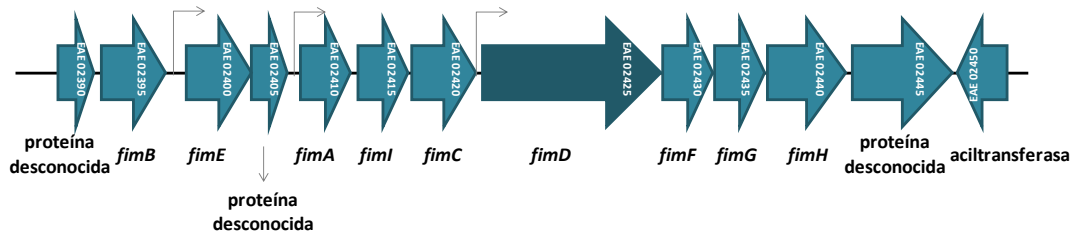


Figura 59. Contexto genómico del cluster *fim* en *E. aerogenes*. Esquema construido a partir de datos obtenidos de la herramienta web Absynte. Las regiones promotoras se indican con flechas grises.

Para determinar las distintas unidades transcripcionales dentro del cluster *fim*, se llevó a cabo una búsqueda *in silico* de promotores (**figura 59**), mediante la herramienta web BDGP (Reese *et al.*, 1996). Se encontraron promotores corriente arriba *fimD*, y se seleccionó este gen por su importancia en el ensamblaje de todas las unidades estructurales de la fimbria.

Se diseñó una estrategia de mutagénesis mediante inserción de cassette en dicho gen, que a la vez afectaría a los genes *fimF*, *fimG* y *fimH*, que forman parte de la misma unidad transcripcional y también tienen funciones importantes en la formación y adhesión de la fimbria.

4.6.2. Obtención de una cepa con interrupción del gen *fimD*

Para la interrupción del gen *fimD* se llevó a cabo la inserción en el mismo de un cassette de resistencia a kanamicina. En primer lugar se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 2500 pb que contenía el gen *fimD*. Como molde se utilizó ADN genómico de la cepa silvestre *E. aerogenes* SC10.

Para la reacción de PCR se diseñaron los cebadores FimD_F y FimD_R y se llevó a cabo utilizando la enzima ADN polimerasa BioTaq™ (Bioline) con las condiciones descritas en el apartado 3.7.4.1. de material y métodos. Tras la reacción se llevó a cabo la comprobación de que los productos de PCR eran correctos mediante electroforesis en gel de agarosa. Una vez comprobada la obtención del tamaño deseado, el fragmento de ADN fue clonado en el vector de clonación PGEM®-T, dando lugar al plásmido pME-F.

Posteriormente, se introdujo en este plásmido un sitio de restricción *XhoI* dentro del gen *fimD* mediante mutagénesis dirigida por PCR de la siguiente forma: sobre el plásmido pME-F se realizó una PCR con primers diseñados en base a la secuencia del gen *fimD* insertado en dicho plásmido, dirigidos hacia afuera de la secuencia y con la secuencia de reconocimiento de la enzima *XhoI* en sus extremos: primer XhoFim_1 y XhoFim_2. La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando una enzima ADN polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity PCR System, Roche) con las condiciones descritas en el apartado 3.7.4.1. de material y métodos.

El producto de PCR resultante fue digerido con la enzima *XhoI* para obtener un fragmento con la secuencia de reconocimiento de dicha enzima en sus extremos. Tras la digestión se llevó a cabo una recircularización del producto digerido, mediante ligación con la enzima ADN T4 ligasa (ThermoScientific), y se trató la ligación con la enzima *DpnI*, eliminando así el ADN parental. Posteriormente, con la ligación, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α , y se seleccionaron las colonias correctamente transformadas en placas de LB con ampicilina. La comprobación de la obtención de un plásmido pME-F con un sitio de restricción *XhoI* se llevó a cabo mediante PCR y digestión, y este plásmido se denominó pME-FX (**figura 60**).

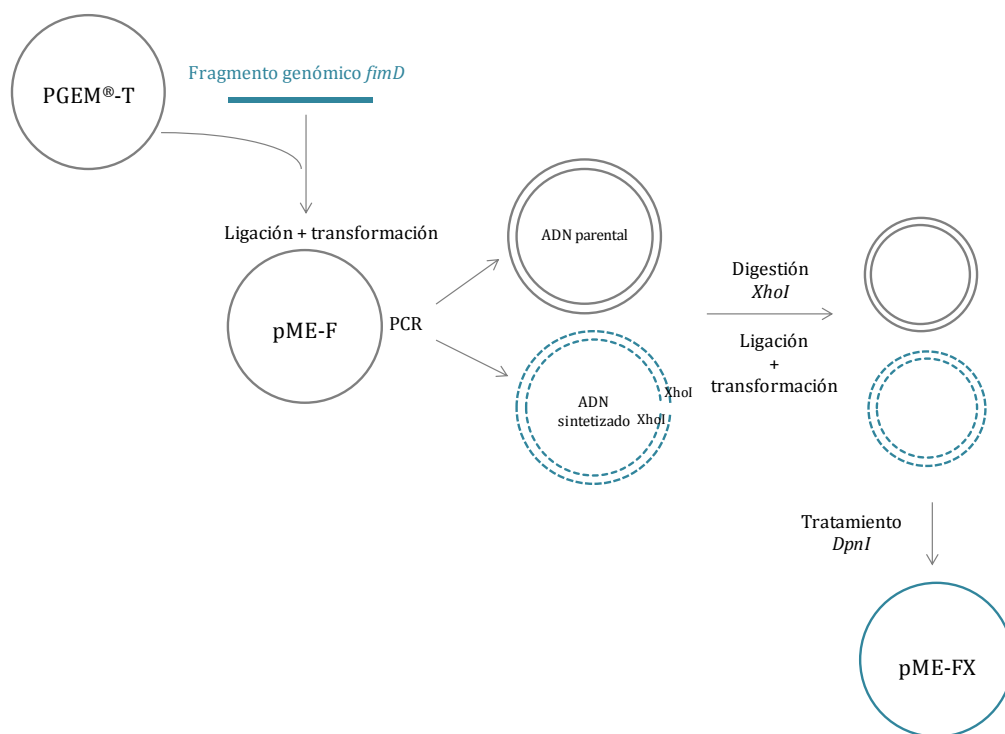


Figura 60. Estrategia utilizada para inserción del sitio de restricción *XhoI* mediante mutagénesis dirigida por PCR.

Para insertar un cassette de kanamicina dentro del gen *fimD* en el plásmido pME-FX, se llevó a cabo la digestión del mismo con la enzima *XhoI*. De forma paralela se digirió con la misma enzima el plásmido PUC4-KIXX (km^{R}) y se purificó el fragmento correspondiente al cassette de resistencia a Km a partir de gel de agarosa mediante kit comercial (MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit).

El plásmido digerido y el cassette se ligaron con la enzima ADN ligasa T4 (ThermoScientific) y con dicha ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación, seleccionando las colonias correctamente transformadas en placas de LB con kanamicina. La comprobación de la obtención de un plásmido con el cassette de resistencia a kanamicina insertado en el gen *fimD* se llevó a cabo mediante PCR y digestión, y este plásmido se denominó pME-FXK.

La construcción del plásmido pME-FXK se extrajo mediante digestión con las enzimas *NotI* y *SpeI*, y se ligó al vector suicida PJQSK200 (Gm^{R}) previamente digerido con las mismas enzimas. Con dicha ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB con gentamicina y kanamicina. El plásmido obtenido se denominó pME2-FXK (figura 61) y fue confirmado por secuenciación.

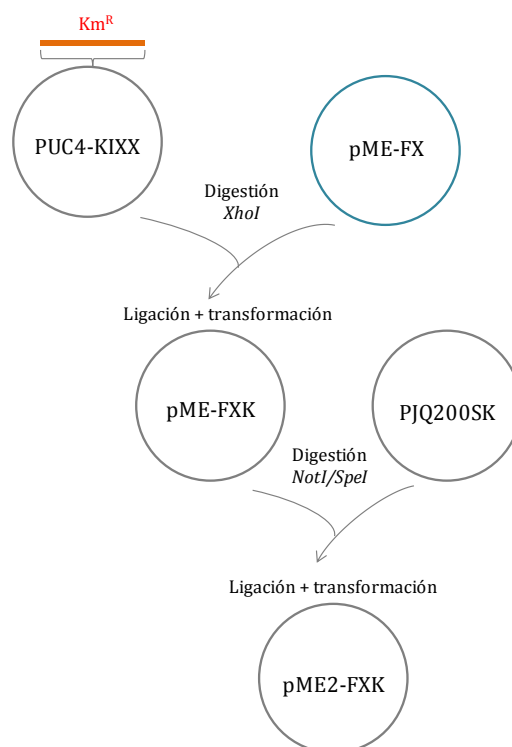


Figura 61. Estrategia utilizada para la interrupción del gen *fimD*.

La transferencia del plásmido pME2-FXK a las células de *E. aerogenes* se llevó a cabo mediante transformación por electroporación. Las cepas mutantes resultantes que formaron un evento de recombinación homóloga se seleccionaron en placas de LB con kanamicina y un 10% de sacarosa, identificándose como aquellas colonias con fenotipo $Km^R Gm^S Sac^R$. Posteriormente, el mutante se comprobó por PCR y posterior secuenciación. La cepa mutante obtenida se denominó EA-SF.

4.6.3. Caracterización de las fimbrias en las cepas con interrupción del gen *fimD*

4.6.3.1. Caracterización fenotípica de las cepas con delección de las fimbrias

Morfología de colonias. Se sembraron placas de TSA con la cepa *E. aerogenes* silvestre y las cepas con delección del gen *fimD*, mediante siembra por agotamiento, para observar posibles diferencias en la forma de las colonias debido a la ausencia de fimbrias.

Observación mediante microscopía electrónica. Para observar la superficie celular y la existencia de cambios estructurales o desaparición de las fimbrias, se llevó a cabo la observación de las cepas con delección del gen *fimD* junto con la cepa silvestre, como control.

4.6.3.2. Ensayo de adhesión a células eucariotas

Para evaluar la capacidad de adhesión de las bacterias con la síntesis de fimbrias afectada, se llevó a cabo un ensayo de adhesión a células de levadura, como modelo de célula eucariota. Se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.15. de material y métodos.

4.6.3.3. Estudio de efectos en el crecimiento

Para determinar si la interrupción del gen *fimD* y la consiguiente alteración en la síntesis de fimbrias dio lugar a cambios en el crecimiento de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio de cultivo TSB que se encuentran representadas en la **figura 62**.

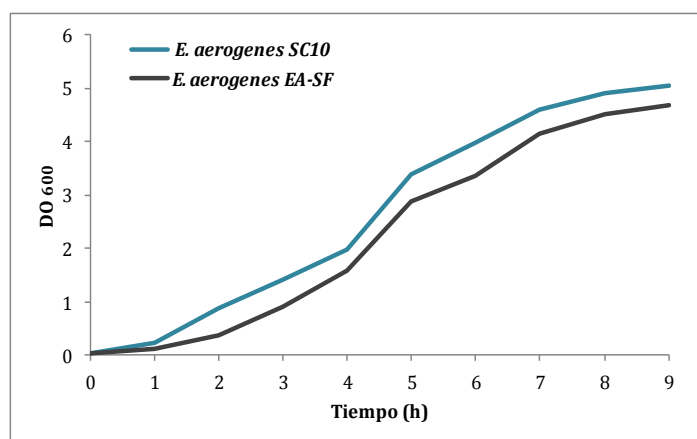


Figura 62. Curvas de crecimiento en medio de cultivo TSB.

El crecimiento de la cepa EA-SF se vió afectado por la interrupción del gen *fimD*, observándose valores más bajos de DO₆₀₀ con respecto a la cepa silvestre SC10 en todos los puntos de la curva de crecimiento. A partir de la pendiente de la curva en la fase de crecimiento exponencial, se calcularon las velocidades específicas de crecimiento de ambas cepas obteniendo como resultado una velocidad específica de 0.67 para la cepa *E. aerogenes* SC10 y de 0.63 para la cepa *E. aerogenes* EA-SF.

4.6.3.4. Estudio de efectos en la producción de 2,3-BDO

Para determinar si la alteración en la síntesis de fimbrias afectó a la producción de 2,3-BDO por parte de las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre, se llevó a cabo un ensayo de producción de 2,3-BDO a partir de sacarosa como el descrito en el apartado 3.12. de material y métodos.

5. DISCUSIÓN

Existen numerosos estudios encaminados a la búsqueda de microorganismos asociados a plantas de arroz y al estudio de sus propiedades de promoción del crecimiento vegetal (PGP), que pueden tener aplicaciones para la agricultura (Cottyn *et al.*, 2000; Mano, 2008; Hardoim, 2011).

En nuestro laboratorio se realizaron diversos estudios de dichos microorganismos asociados a plantas de arroz provenientes de los arrozales de las Marismas del Guadalquivir, en su parte sevillana, mediante los que se determinó que en esta zona existe una gran diversidad bacteriana, siendo las enterobacterias las más predominantes, probablemente debido a su capacidad de adaptación a amplios rangos de condiciones físico-químicas y nutricionales, y sus mecanismos de colonización.

A partir de dichos estudios se estimó interesante realizar un trabajo en mayor profundidad de las enterobacterias de los arrozales, así como de su posible aplicación para la industria de los bioplásticos. Como se ha indicado anteriormente, existe una nutrida relación de trabajos sobre actividades PGP de bacterias asociadas a plantas de arroz, pero no se ha prestado mucha atención a su utilidad en la fabricación de bioplásticos. Sin embargo, la alta diversidad de bacterias aisladas de arroz sugiere la existencia de un ambiente complejo en el que pueden encontrarse bacterias con numerosas aplicaciones, como resultado de su adaptación a dicho ambiente.

Con este propósito se aislaron un total de 60 cepas de enterobacterias de plantas de arroz, de distintas zonas, obteniéndose un mayor número de aislados de la zona denominada La Compañía, zona con menor contenido salino y con riego directo del río.

Es conocido que en el agroecosistema del arroz, la población microbiana refleja las condiciones del agua de riego (Pelczar *et al.*, 1996), que se ve influenciada por otras prácticas agrícolas, así como industriales y domésticas. Por lo tanto, el mayor contenido en enterobacterias aisladas de esta zona puede explicarse por las descargas de aguas residuales y efluentes de diferentes industrias y explotaciones ganaderas vertidos al río Guadalquivir, que favorecen la presencia de estas bacterias en el agua del río, y por lo tanto en las tierras regadas con este agua.

Posteriormente, los aislados se diferenciaron en función de su capacidad de producir 2,3-BDO mediante las pruebas IMVIC, seleccionando así 25 de los aislados como posibles productores de este compuesto. Estos últimos fueron identificados mediante amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S, y tras realizar el correspondiente análisis comparativo de la secuencia obtenida con las secuencias depositadas en la base de datos, se obtuvo la identificación de cada uno de ellos.

Se obtuvo que los géneros bacterianos más abundantes entre los aislados son *Enterobacter* y *Klebsiella*, que coinciden junto con el género *Pantoea* en ser los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* más comúnmente encontrados en plantas de arroz (Cottyn *et al.*, 2001).

En cuanto a los distintos puntos de muestreo, en las zonas de Hato Ratón y La Compañía se obtuvieron aislados de distintos géneros en proporciones similares en ambas: 25-33% *Klebsiella*, 50-55 % *Enterobacter*, 11-12.5% *Leclercia*. En la zona de Los Pobres sin embargo, excepto uno de los aislados todos pertenecen al género *Enterobacter*, lo que supone un 87.5% del total de aislados de esa zona.

El agua de riego en esta zona arrocerá se ve sometida a una mayor recirculación entre distintas parcelas agrícolas y canales de desagüe, pues no cuenta con una toma directa del río. El mayor número de bacterias del género *Enterobacter* podría indicar una mejor adaptación de estas bacterias a la alteración en la composición de nutrientes y sales del agua de riego al someterse a recircularización.

En el estudio de *fingerprinting* llevado a cabo mediante PCR-ERIC se observó que entre los aislados identificados como pertenecientes a la misma especie por secuenciación del gen ADNr 16S, existían cepas distintas.

En el caso de los aislados identificados como *E. cancerogenus*, se hallaron dos cepas del grupo diferentes al resto. Estas dos cepas fueron aisladas de suelo rizosférico, en lugar de raíces, de donde provienen las demás. Esto puede explicar el hecho de que se trate de cepas distintas, puesto que las cepas aisladas de raíces poseen carácter endofítico que podría determinar diferencias a nivel de genotipo.

Entre los aislados de *E. ludwigii* y *C. freundii* también se observó la existencia de distintas cepas. En estos dos casos todas las cepas provienen de suelo rizosférico, aunque de distintas zonas de muestreo, lo que probablemente sea causa de la diversidad entre ellas debido a la adaptación a distintas condiciones ambientales.

En cuanto a la producción de 2,3-BDO, los resultados obtenidos en este trabajo del screening de las diferentes enterobacterias aisladas (**tabla 10**) están de acuerdo con trabajos publicados anteriormente en cuanto a la capacidad de producción por parte de estos microorganismos, donde se señala que las bacterias que producen 2,3-BDO de forma efectiva pertenecen principalmente a la familia *Enterobacteriaceae*, destacando las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter aerogenes* (Sabra *et al.*, 2015). Además, en esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto la capacidad de producción de 2,3-BDO por parte de otras especies menos estudiadas como son *K. singaporensis*, *E. ludwigii*, *K. variicola* y *Leclercia adecarboxylata*.

Es importante destacar que en nuestro trabajo las cepas productoras sintetizaron únicamente 2,3-BDO en su forma ópticamente activa, sin detectarse la mezcla de dos esteroisómeros de 2,3-BDO (*meso*) como sí se obtuvo en otros trabajos (Celinska y Grajek, 2009). Esto puede suponer una ventaja para la industria, puesto que se trata de una forma más pura, con gran valor para la síntesis de diversas moléculas.

Una vez determinada la capacidad de las cepas seleccionadas para producir 2,3-BDO a partir de glucosa pura, se estudió la posibilidad de sustituir este carbohidrato por sacarosa como fuente de carbono, ya que esto supondría un menor coste en la síntesis de 2,3-BDO y además pondría de manifiesto qué cepas serían capaces de asimilar la sacarosa presente en los residuos agroindustriales a la hora de utilizar estos como materia prima.

Del total de aislados, tan solo un 16% utilizaron la glucosa produciendo ácido como resultado pero no fueron aptas para la utilización de sacarosa. El resto sin embargo pudieron utilizar ambos carbohidratos, por lo que contamos con 21 cepas que potencialmente podrían producir 2,3-BDO a partir de residuos agroindustriales con contenido en sacarosa.

En la mayoría de trabajos sobre producción de 2,3-BDO mediante bacterias se ha utilizado glucosa como materia prima, por lo que consideramos interesantes los resultados obtenidos, suponiendo una ventaja frente a éstos al economizar el proceso de producción.

Por otra parte, a partir de los resultados se observa que existen diferencias en cuanto al metabolismo de los carbohidratos entre distintas cepas de la misma especie, así como entre aislados de la misma cepa pero provenientes de diferentes zonas de muestreo.

Esto pone de manifiesto la gran diversidad bacteriana presente en los arrozales de las Marismas del Guadalquivir, existiendo bacterias de diferentes géneros y especies, distintas cepas y distintas capacidades metabólicas dentro de una misma cepa, que de nuevo podría explicarse por la elevada variedad de condiciones ambientales en los arrozales debido al manejo del suelo y el agua de riego.

La cepa con la que se obtuvo mayor producción de 2,3-BDO corresponde a la especie *E. aerogenes*. La bacteria *E. aerogenes* posee un gran potencial biotecnológico, ya que se le atribuyen numerosas aplicaciones de interés industrial. Así, se ha descrito su uso para biorremediación en zonas contaminadas con plomo y mercurio (Piñón-Castillo *et al.*, 2010; Mehta y Vaidya, 2010), biodegradación de compuestos orgánicos como la acrilamida (Buranasilp y Charoenpanich, 2011), producción de biocombustibles (Han *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012), producción de enzimas (Geckil y Gencer, 2004), tratamiento de aguas residuales mediante la producción de biofloculante (Lu *et al.*, 2005) y agente de control biológico en cultivo de cítricos (Meca *et al.*, 2009).

También el género *Enterobacter*, y concretamente *E. aerogenes*, se ha considerado un microorganismo interesante para la síntesis de 2,3-BDO en diversos trabajos (Olson *et al.*, 1948, Barret *et al.*, 1983, Perego *et al.*, 2000).

Llegados a este punto decidimos centrar nuestro trabajo en la producción de 2,3-BDO por la cepa *E. aerogenes* SC10. Para ello en primer lugar se procedió a su caracterización fenotípica y bioquímica, de forma paralela a la cepa de colección *E. aerogenes* CECT 684^T, con el objetivo de determinar si existían diferencias con respecto a esta.

Como resultado se obtuvo que las cepas *E. aerogenes* SC10 y *E. aerogenes* CECT 684^T son idénticas en cuanto a su caracterización fenotípica. Los resultados de las pruebas bioquímicas también fueron idénticos para ambas cepas, y se corresponden con los resultados esperados para la especie *E. aerogenes*.

Aunque las cepas *E. aerogenes* SC10 y *E. aerogenes* CECT 684^T como se ha visto poseen una elevada semejanza, algunas pruebas difirieron entre ellas, como son la sensibilidad a antibióticos y el crecimiento en medio con carbohidratos.

En cuanto a la sensibilidad frente a antibióticos, la cepa *E. aerogenes* SC10 presentó mayor resistencia a algunos de los antibióticos ensayados (**tabla 13**) que la cepa de colección. Una posible explicación de ello sería la adquisición de resistencia a antibióticos de las enterobacterias que se liberan al medio ambiente desde las plantas de tratamiento de aguas residuales, y que a través del agua de riego proveniente del río llegan a los cultivos, en este caso, al cultivo de arroz. Estas enterobacterias provenientes de restos fecales poseerían dicha resistencia a antibióticos debido al excesivo uso por parte de la población de estos medicamentos, y una vez liberadas al ambiente no sólo mantienen la resistencia sino que la dispersan entre las comunidades bacterianas del medio a través de procesos de intercambio genético.

También se probó el crecimiento de ambas cepas en medio de cultivo simple y con una fuente de carbohidratos (sacarosa). En medio sin carbohidratos el crecimiento fue igual para ambas, mientras que en medio con sacarosa la cepa *E. aerogenes* SC10 experimentó un mayor crecimiento. Esta diferencia puede deberse a que la cepa proveniente de colección ha sido cultivada en medios específicamente diseñados para cubrir sus necesidades nutricionales, mientras que la cepa aislada del medio natural se ha visto obligada a desarrollar mecanismos para obtener del ambiente los nutrientes necesarios, que normalmente no se encuentran disueltos sino que se han de obtener de fuentes más complejas.

Por ello la cepa *E. aerogenes* SC10 es capaz de asimilar con mayor velocidad la sacarosa (y de forma más eficiente) y obtener a partir de ésta la glucosa para su crecimiento.

Este hecho se consideró muy interesante ya que supondría una ventaja de la cepa aislada del arrozal frente a la cepa de colección a la hora de utilizar residuos como materia prima para la obtención de 2,3-BDO.

Por último se probó la capacidad de producción de 2,3-BDO de las dos cepas, obteniéndose un 58,1% más de producción en la cepa *E. aerogenes* SC10 que en la cepa tipo *E. aerogenes* CECT 684^T.

La ventaja en la producción podría deberse a la adaptación de la cepa *E. aerogenes* SC10 a su hábitat y a la frecuente activación de su mecanismo fermentativo debido a la existencia de condiciones anaeróbicas o con poca disponibilidad de oxígeno en el suelo de los arrozales. Además, se ha estudiado que la producción de 2,3-BDO supone un mecanismo de asociación a plantas, pudiendo actuar este compuesto como promotor del crecimiento vegetal (Lugtenberg y Kamilova, 2009), y a la vez que es sintetizado la bacteria toma nutrientes de los exudados radicales de la planta.

Teniendo en cuenta estos resultados se determinó que la cepa *E. aerogenes* SC10 aislada de los arrozales presenta ciertas ventajas que la hacen más competitiva para la producción de 2,3-BDO frente a la cepa tipo, por lo que se escogió como cepa de trabajo.

Los procesos convencionales de obtención de 2,3-BDO no resultan económicamente competitivos, ya que como se mencionó en el apartado 4.4.1. de resultados, de forma simultánea a la producción de este compuesto, se originan otra serie de metabolitos como etanol, acetoina, ácido láctico o ácido succínico, lo que da lugar a un menor rendimiento en la producción de 2,3-BDO así como a un incremento en los costes de recuperación y purificación de éste (Fond *et al.*, 1985).

Por este motivo, se han llevado a cabo diversos trabajos con el fin de lograr una producción de 2,3-BDO más eficiente y económica mediante la mejora de las cepas productoras.

Así, se ha llevado a cabo la mejora genética de cepas bacterianas como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens* para alcanzar un mayor rendimiento y productividad en la producción de 2,3-BDO, y reducir a la vez la producción de otros metabolitos de la misma vía metabólica (Xu *et al.*, 2014).

También varios autores han estudiado el metabolismo de la glucosa en *Enterobacter aerogenes* y han realizado trabajos de mejora para la producción de 2,3-BDO por parte de esta bacteria.

Así, se ha introducido en *E. aerogenes* el gen *vgb* que codifica la hemoglobina en la bacteria *Vitreoscella* (Geckil *et al.*, 2004) y se ha delecionado el gen *ldhA* que codifica la enzima lactato deshidrogenasa, responsable de la formación de ácido láctico a partir de piruvato en *E. aerogenes* (Jung *et al.*, 2012).

La reciente secuenciación del genoma completo de *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190 (Shin *et al.*, 2012), ha permitido conocer las principales vías de producción de metabolitos como etanol, ácido láctico, ácido succínico y 2,3-BDO. Este hecho nos ha permitido en la presente Tesis Doctoral seguir trabajando en la mejora de producción de 2,3-BDO por parte de *Enterobacter aerogenes* mediante la modificación de genes implicados en las rutas metabólicas que dan lugar a este compuesto.

Con el fin de lograr una sobreproducción de 2,3-BDO por parte de la cepa productora *E. aerogenes* SC10, se modificaron las vías metabólicas conducentes a la formación de los metabolitos ácido láctico y piruvato. Además se modificó la vía de obtención de 2,3-BDO directamente a partir de acetoina.

En *E. aerogenes* se ha estudiado la eliminación o reducción de metabolitos que compiten por la fuente de carbono en la síntesis de productos de interés como succinato (Tajima *et al.*, 2015), hidrógeno (Rachman, 1997; Zhang *et al.*, 2011) o etanol (Nwachukwu *et al.*, 2012). Sin embargo, solamente encontramos un trabajo publicado que se ha centrado en la eliminación de la síntesis de compuestos que compiten con la producción de 2,3-BDO, el publicado por Jung *et al.* (2012).

En nuestro trabajo en primer lugar se estudió la inactivación de la síntesis de ácido láctico, con la que, como se indicó en el apartado 4.1.1. de resultados, se pretendía aumentar la producción de 2,3-BDO, cuya formación compite con la del primero. De esta forma se obtuvo la cepa mutante EALD, con interrupción del gen *ldhA*.

En la cepa EALD no se apreciaron diferencias significativas en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre, por lo que se puede afirmar que la deleción de la vía de síntesis de ácido láctico no afecta a éste.

En cuanto a los efectos de diferentes condiciones ambientales sobre esta cepa, se observó que presentaba una tolerancia mayor que la cepa silvestre a valores altos de temperatura (45°C), lo que supone otra ventaja para el uso de esta cepa en la síntesis industrial de 2,3-BDO.

La mayor tolerancia a una alta temperatura podría indicar que la energía destinada a la producción de lactato ahora estaría disponible para otros procesos como los mecanismos de tolerancia a condiciones de estrés.

La actividad enzimática LDH se vio reducida en un 44% en la cepa EALD con respecto a la cepa silvestre, confirmando que la interrupción del gen *ldhA* supone la eliminación de la principal vía de formación de ácido láctico en *E. aerogenes*.

La producción de metabolitos resultantes de la ruta de formación de 2,3-BDO se incrementó para el 2,3-BDO, succinato y etanol en la cepa EALD, mientras que la producción de ácido láctico decayó un 86% con respecto a la cepa silvestre.

Los valores de rendimiento y productividad obtenidos con la cepa EALD fueron respectivamente de un 15% y un 40% mayores que los obtenidos con la cepa silvestre, incrementos que superaron los valores obtenidos en otros trabajos (Jung *et al.*, 2012).

En segundo lugar, se modificó la vía de síntesis de piruvato, sobreexpresando la enzima que actúa en la oxidación de G3P a 1,3-PG, el cual da lugar a piruvato mediante otra serie de reacciones. La sobreexpresión de dicha enzima, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, dio lugar a la cepa mutante EAG.

Esta cepa al igual que la anterior cepa mutante, no vio afectado su crecimiento con respecto a la cepa silvestre. Así mismo el efecto de diversos factores ambientales como la temperatura, pH y concentración de sacarosa y 2,3-BDO en el medio fue el mismo que para la cepa silvestre.

La actividad enzimática GAPDH, tal y como se esperaba se vio incrementada en la cepa EAG, siendo el incremento de un 280%.

A partir de la fermentación para obtener 2,3-BDO se obtuvieron cantidades mayores de todos los metabolitos (2,3-BDO, succinato, etanol, ácido láctico y acetoína) en esta cepa con respecto a la silvestre.

El consumo de sacarosa se vio incrementado en esta cepa un 28% con respecto a la cepa silvestre, obteniéndose un rendimiento en g 2,3-BDO/g sacarosa de un 0.42, que supone un rendimiento un 4% mayor que en la cepa silvestre.

Teniendo en cuenta que la cepa EAG produjo mayor cantidad de todos los demás metabolitos que la cepa silvestre, esto podría explicar el mayor consumo de sacarosa, que no solo se utilizó para la síntesis de 2,3-BDO sino también de los demás productos.

La productividad y el rendimiento de la cepa EAG aumentaron en un 27,8% y un 4% con respecto a la silvestre.

Finalmente, se modificó la vía de reducción de acetoína hacia 2,3-BDO, sobreexpresando la enzima responsable de dicha reacción (acetoína reductasa/butanodiol deshidrogenasa), obteniéndose la cepa mutante EAB.

Esta mutación tampoco afectó al crecimiento de la bacteria, sin embargo, al igual que en las otras cepas mutantes se observó una mayor tolerancia a valores altos de temperatura (45°C) en comparación con la cepa silvestre.

La actividad enzimática BDH se vio incrementada en esta cepa en un 159% con respecto a la cepa silvestre.

En cuanto a la producción de 2,3-BDO a partir de sacarosa, en esta cepa se observó un incremento de un 27.7% con respecto a la silvestre, al contrario que el resto de metabolitos (succinato, etanol, ácido láctico y acetoína), que vieron reducida su síntesis, por lo que podemos confirmar que la sobreexpresión de la enzima BDH tuvo un efecto directo en la sobreproducción de 2,3-BDO a partir de acetoína.

La tasa de consumo de sacarosa de la cepa EAB fue solamente un 2.83% más que la cepa silvestre, lo que da lugar a una mayor diferencia con respecto al rendimiento de ambas cepas, que es de un 26,6% mayor en EAB.

En nuestro trabajo se ha demostrado que la sobreexpresión de las enzimas BDH y GAPDH da lugar a una mejora en la producción de 2,3-BDO, al igual que en trabajos previos sobre *Bacillus* (Desmukh *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2013).

En enterobacterias, concretamente en *Klebsiella*, también se ha estudiado previamente el efecto de la sobreexpresión de la enzima BDH (Cho *et al.*, 2015). En el trabajo de Cho *et al.* se consigue un aumento del 2.5% y el 0.9% de rendimiento y productividad respectivamente en la cepa con sobreexpresión de BDH con respecto a la cepa silvestre.

Los efectos en el rendimiento y la productividad son prácticamente inapreciables en comparación con los obtenidos en nuestro trabajo para la cepa de *E. aerogenes* con sobreexpresión de la enzima BDH, que como se ha indicado anteriormente son del 26.6% y 27.7%.

Por otra parte, no se han publicado trabajos sobre enterobacterias en los que se lleven a cabo de forma simultánea en la misma cepa diversas modificaciones para la mejora de la producción de 2,3-BDO.

En esta Tesis Doctoral, con el objetivo de obtener los máximos valores de rendimiento y productividad posibles en la producción de 2,3-BDO con nuestra cepa *E. aerogenes* SC10, se construyeron cepas que incluyeran en una misma cepa las distintas modificaciones metabólicas realizadas anteriormente, pudiendo así sumar los efectos positivos de cada una de ellas en la producción de 2,3-BDO.

Así se obtuvieron las cepas EAGB y EALD-GB. En la cepa EAGB, con sobreexpresión de las enzimas GAPDH y BDH, se vió incrementada la producción de 2,3-BDO con respecto a la cepa silvestre, siendo este incremento mayor que en las cepas que presentan cada una de las sobreexpresiones por separado (EAG y EAB), al igual que el rendimiento y la productividad.

La mejora más remarcable se obtuvo con la cepa EALD-GB. Esta cepa fue la que experimentó un mayor aumento de producción de 2,3-BDO con respecto a la silvestre, siendo este de un 58%, al igual que la productividad.

En cuanto a la utilización de distintos azúcares por parte de la cepa silvestre y las cepas mutantes obtenidas en este trabajo, se observaron resultados iguales para la glucosa, fructosa y sacarosa.

El potencial de la bacteria *E. aerogenes* para la producción de 2,3-BDO es un hecho demostrado, pero presenta el inconveniente de la formación paralela de metabolitos indeseables que provocaban la disminución del rendimiento en la producción de 2,3-BDO.

Como se ha visto anteriormente, la reducción de la síntesis de dichos metabolitos beneficia la producción de 2,3-BDO, ya que de esta forma no compiten por el piruvato como metabolito intermedio. Además, la formación de 2,3-BDO a partir de glucosa se trata de un proceso con multitud de reacciones de oxidación-reducción, por lo que la disponibilidad de los cofactores NAD y NADH suponen una limitación para el proceso.

Tanto es así que se estima que una de las funciones biológicas de la producción de 2,3-BDO es la compensación del exceso de poder reductor asociado con la glucólisis (Celinska y Grajek, 2009), regulando el ratio NADH/NAD intracelular.

De esta forma, la sobreexpresión de la enzima GAPDH (dependiente de NAD y generadora de NADH) daría lugar a la mayor disponibilidad de NADH para la reacción de reducción de acetoína a 2,3-BDO. De la misma forma la delección de la enzima LDH (dependiente de NADH), reduciría el consumo de dicho cofactor que por lo tanto quedaría también disponible para la reducción de acetoína a 2,3-BDO, a la vez que dejaría de generar el cofactor NAD. El bloqueo en la producción de ácido láctico da lugar a la necesidad de la célula de consumir NADH a través de otras vías. Por lo tanto la reacción de formación de 2,3-BDO a partir de acetoína se vería estimulada para regenerar el cofactor NAD, lo cual es doblemente favorecido por la sobreexpresión de la enzima BDH.

Para mejorar la producción de 2,3-BDO en y reducir los productos no deseados, existen ya estrategias llevadas a cabo para inactivar genes responsables de dichos metabolitos. Es el caso del trabajo publicado por Ji *et al.* (2010), en el que se obtiene una cepa de *Klebsiella oxytoca* con mayor producción de 2,3-BDO que la cepa silvestre mediante la delección de la enzima acetaldehído deshidrogenasa, responsable de la formación de etanol.

En el caso de *E. aerogenes* encontramos el trabajo de Jung *et al.* (2012), en el que se lleva a cabo la reducción de la síntesis de lactato mediante la delección de la enzima lactato deshidrogenasa.

Nuestro trabajo se diferencia en que además de inactivar dicho gen se han sobreexpresado otros dos genes implicados en la síntesis de 2,3-BDO, logrando con esto mayor producción, rendimiento y productividad.

En esta Tesis Doctoral se ha logrado la obtención de cepas a partir de la bacteria *E. aerogenes* con la redistribución del flujo de carbono hacia la producción de 2,3-BDO mediante la ingeniería de vías metabólicas, mitigando el problema de la co-formación de metabolitos no deseados a la vez que se forma 2,3-BDO.

Además, las modificaciones introducidas mejoraron el rendimiento y productividad en la obtención de 2,3-BDO, sin afectar el crecimiento de la bacteria. Por lo tanto se puede considerar que este trabajo ha resultado exitoso en la construcción de cepas de *E. aerogenes* mejoradas para la sobreproducción de 2,3-BDO.

Entre las cepas mutantes obtenidas, el valor más alto de producción de 2,3-BDO fue de 27.36 g/L en cultivo de 24 h en modo *batch*, alcanzado por la cepa EALD-GB. El rendimiento expresado en g de 2,3-BDO/ g de sacarosa consumida en esta cepa fue de 0.51. No constituye el mayor rendimiento obtenido entre las cepas de estudio puesto que este valor fue alcanzado también por las cepas EAB y EAGB. Sin embargo, no es esta la característica más importante para la aplicación industrial de las cepas, sino una alta productividad, que permite ahorrar tiempo y recursos (Ji *et al.*, 2011). La mayor productividad sí fue alcanzada por la cepa EALD-GB, con un valor de 1.14 g/L/h.

Esta no es la cepa que mejor tolera altas temperaturas de entre las estudiadas, sin embargo la cepa EALD-GB al contrario que la cepa silvestre, fue capaz de crecer a 45°C. Por ello, aunque no es muy frecuente, debido a que las condiciones de producción industrial están altamente controladas, esta cepa podría soportar posibles sobrecalentamientos producidos en la industria.

Estos resultados nos llevan a considerar que la cepa seleccionada entre los distintos mutantes obtenidos para su aplicación industrial sería la cepa EALD-GB.

En nuestro trabajo también planteamos la posibilidad de utilizar residuos como fuente de carbono para la producción de 2,3-BDO, esencial para llevar a cabo procesos económicamente favorables.

Existen numerosos estudios sobre la utilización de residuos agroindustriales para producción de etanol, sin embargo los estudios encaminados a la producción de 2,3-BDO a partir de residuos son muy escasos.

Diferentes residuos han sido empleados para la producción de 2,3-BDO: maíz (Wang *et al.*, 2010), alcachofa (Sun *et al.*, 2009), mandioca (Wang *et al.*, 2012), jatrofa (Jiang *et al.*, 2012).

En este trabajo se estudiaron residuos de remolacha, piña y naranja para la producción de 2,3-BDO. En un análisis preliminar mediante cromatografía en capa fina se determinó que los tres tipos de residuo contenían azúcares susceptibles de ser utilizados por las bacterias para producir 2,3-BDO.

Mediante los procesos de hidrólisis llevados a cabo sobre los residuos se liberaron los azúcares presentes en los mismos, siendo el proceso de autohidrólisis el más efectivo por liberar mayor cantidad de azúcares, seguido de la hidrólisis enzimática y la hidrólisis ácida.

Del residuo de remolacha se obtuvieron cantidades de azúcar entre los 0.1 y 7 g/L, que no se consideraron suficientes para su utilización en la síntesis de 2,3-BDO, por lo que se descartó la utilización del mismo. A partir de los residuos de naranja y piña sí se obtuvieron cantidades de azúcar que consideramos suficientes para la producción de 2,3-BDO.

Como se describe en el apartado 4.5.3. de resultados, el residuo de naranja fue detoxificado para eliminar el compuesto furfural, inhibidor del crecimiento microbiano, que fue detectado en el análisis de azúcares realizado por cromatografía en capa fina, así como el limoneno, presente de forma natural en los cítricos.

La detoxificación supuso una pérdida mínima de azúcares (7% de glucosa y fructosa y 1.3% de sacarosa), asumible puesto que la presencia de compuestos tóxicos que inhibiesen el crecimiento bacteriano supondría una merma mayor en la producción de 2,3-BDO.

En cuanto al crecimiento bacteriano, éste se logró en ambos tipos de residuos utilizados, naranja y piña, al igual que la producción de 2,3-BDO. La producción de este compuesto a partir de piña y naranja alcanzada a las 24 h de cultivo fue del orden de la obtenida partir de los ensayos realizados con sacarosa comercial por la bacteria *E. aerogenes*.

Utilizando residuos de naranja, se obtuvieron 0.15 g de 2,3-BDO por 1 g de cáscara de naranja. Utilizando residuos de piña se obtuvieron 0.05 g de 2,3-BDO por 1 g de pulpa de piña.

La mayoría de los trabajos sobre producción biológica de 2,3-BDO se han centrado en el uso de sustratos puros (glucosa, sacarosa). Los costes de producción de 2,3-BDO dependen en gran medida de la materia prima empleada, por lo que la obtención de este compuesto a partir de materias primas de bajo coste como son los residuos de piña y naranja supone una gran ventaja económica para la industria.

En comparación con la producción de 2,3-BDO a partir de sacarosa comercial, el rendimiento de producción de 2,3-BDO a partir de residuos de piña y naranja que hemos obtenido es bajo. Sin embargo, teniendo en cuenta que se trata de residuos poco aprovechados y con un alto volumen de producción en los sectores de industria y hostelería, a gran escala puede considerarse una alternativa de interés.

La cáscara de naranja puede considerarse especialmente interesante debido a su composición química, disponibilidad y bajo coste. Normalmente este residuo se ha utilizado para la producción de pienso animal. En este trabajo se ha puesto de manifiesto la posibilidad de su uso para la producción de 2,3-BDO por medio de bacterias, en nuestro caso *E. aerogenes*, adquiriendo este material un valor añadido.

En vista de los resultados obtenidos a partir de los diferentes ensayos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se podría afirmar que se ha logrado obtener una producción de 2,3-BDO de bajo coste para la industria, puesto que se han obtenido cepas bacterianas que sintetizan este compuesto en un corto período de tiempo, mejorando su rendimiento y productividad con respecto a la cepa silvestre, y además se ha puesto a punto la utilización de residuos como materia prima, lo que minimiza el coste de los sustratos.

6. CONCLUSIONES

I. El estudio realizado en las Marismas del Guadalquivir ha puesto de manifiesto que existe una amplia diversidad de enterobacterias en las mismas, debido a la variedad de condiciones ambientales que se dan en el agroecosistema del arroz. Así, se aislaron enterobacterias de 4 géneros distintos y 11 especies, y se determinaron varias cepas entre los aislados pertenecientes a una misma especie.

II. Gran cantidad de las enterobacterias aisladas fueron capaces de sintetizar 2,3-BDO, seleccionando entre ellas la cepa SC10 para un estudio más detallado. En base a sus características fenotípicas y genotípicas se identificó como *Enterobacter aerogenes*, constituyendo la cepa *E. aerogenes* SC10.

III. El estudio comparativo entre la cepa *E. aerogenes* SC10 y la cepa de colección *E. aerogenes* CECT 684^T nos ha permitido comprobar que las condiciones cambiantes del arrozal dan lugar a la existencia de cepas con una mayor capacidad de adaptación de su metabolismo que las cepas de colección, lo que supone una ventaja de las primeras para su utilización en la síntesis de compuestos precursores de polímeros como el 2,3-BDO, convirtiéndolas en microorganismos atractivos a nivel industrial.

IV. Mediante la aplicación de la ingeniería de vías metabólicas conseguimos mejorar la producción de 2,3-BDO en *E. aerogenes* SC10, incrementando los valores de rendimiento y productividad, a la vez que se disminuyó la producción de metabolitos no deseados resultantes de la fermentación y se incrementó la producción de otros que podrían ser interesantes para otro tipo de aplicaciones industriales.

El mayor incremento de producción de 2,3-BDO fue alcanzado por la cepa triple mutante EALD-GB, con una productividad un 58% mayor que la alcanzada por la cepa silvestre.

V. La evaluación llevada a cabo en este trabajo de diversos residuos agroindustriales como sustrato en la síntesis de 2,3-BDO ha permitido establecer su uso como alternativa a los azúcares puros, contribuyendo de esta forma a la viabilidad económica de los procesos de obtención de 2,3-BDO por vía biotecnológica. A la misma vez se han revalorizado dichos residuos y se ha contribuido a la disminución del impacto ambiental que genera la eliminación de los mismos.

VI. En vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se puede afirmar que se ha logrado obtener 2,3-BDO mediante el uso de procesos biotecnológicos. De esta forma se logra rebajar la dependencia del petróleo y los procesos químicos en la fabricación de polímeros como el poliuretano y otros productos derivados del 2,3-BDO.

7. BIBLIOGRAFÍA

- **Abdullah A., Hanafi M. (2008).** Characterisation of solid and liquid pineapple waste. *Reaktor* 12, 48-52.
- **Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., Ram, S. J. (2004).** Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36-42.
- **Adegbite, O., Oni, O., Adeoye, I. (2014).** Competitiveness of pineapple production in Osun State, Nigeria. *Journal of Economics and Sustainable Development* 5(2), 205-214.
- **Adegbola, R. A., Old, D. C. (1985).** Fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Medical Microbiology* 19, 35-43.
- **Adris, P., Chung, K. T. (2006).** Metabolic activation of bladder procarcinogens, 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by *Pseudomonas aeruginosa* and other human endogenous bacteria. *Toxicology in Vitro* 20, 367-374.
- **Aguilar, M. (2010).** Producción integrada del arroz en el sur de España. Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación, Fundación Caja Rural del Sur.
- **Aguilar, P., Quesada-Solís, K., Sibaja-Ballester, R., Vega-Baudrit, J. (2005).** Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas comusus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 6, 4.
- **Andrady, A. L. (2003).** Plastics and the environment. En: Andrady, A.L. (Ed.), *Plastics in the Environment*. John Wiley & Sons, New Jersey, p. 762.
- **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1987).** *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York.
- **Ayala J. R., Montero, G., Pérez, L., Coronado, M., García, C., Cerezo, J. (2013).** Simulación y diseño de experimentos en la hidrodestilación de cáscara residual de naranja para obtener aceite esencial. Memorias del XXXIV Encuentro Nacional y III Congreso Internacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ). Mazatlán, Sinaloa, México.

- **Bailey, J. E. (1991).** Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252, 1668-1675.
- **Banik, S., Nag, D., Debnath, S. (2011).** Utilization of pineapple leaf agro-waste for extraction of fibre and the residual biomass for vermicomposting. *Indian Journal of Fibre & Textile Research* 36(2), 172-177
- **Bannerman, D. D., Paape, M. J., Hare, W. R., Sohn, E. J. (2003).** Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *Journal of Dairy Science* 86, 3128-3137.
- **Barjol, J. L., Chavanes, H., Krick, A. (2003).** Environmental report. Beet growing and sugar production in Europe. CIBE (International Confederation of European Beet growers) y CEFS (European Committee of Sugar Manufacturers).
- **Barka, E. A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., Audran, J. C. (2000).** Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiology Letters* 186, 91-95.
- **Barragán, B., Téllez, Y., Laguna, T. (2008).** Utilización de residuos agroindustriales. *Sistemas Ambientales* 2, 44-50.
- **Bayer, O. (1947).** Das Di-Isocyanat-Polyadditionsverfahren (Polyurethane). *Angewandte Chemie* 71, 26.
- **Bellido, C., Infante, C., Coca, M., González-Benito, G., Lucas, S., García-Cubero, M. T. (2015).** Efficient acetone-butanol-ethanol production by *Clostridium beijerinckii* from sugar beet pulp. *Bioresource Technology* 190, 332-338.
- **Benítez, L., Tovar, C., Ortiz, Á., Dunoyer, A., Alvear, M., Castillo, C., Madariaga, N. (2010).** Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería* 5, 120-125.
- **Berłowska, J., Pielech-Przybylska, K., Balcerek, M., Dziekońska-Kubczak, U., Patelski, P., Dziugan, P., Kregiel, D. (2016).** Simultaneous saccharification and fermentation of sugar beet pulp for efficient bioethanol production. *BioMed Research International*, vol. 2016.

- **Berríos-Rivera, S. J., Bennett, G. N., San, K. Y. (2002).** Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD1-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic Engineering* 4, 217–229.
- **Biasoli, M. S., Magaró, H. M. (2003).** Efecto in vitro de hidratos de carbono y bacterias entéricas en la adherencia de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología* 20, 160-163.
- **Brune, A., Frenzel, P., Cypionka H. (2000).** Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Letters* 24, 691–710.
- **Bullen, J. J., Rogers, H. J., Spalding, P. B., Ward, C. G. (2005).** Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43, 325-330.
- **Buranasilp, K., Charoenpanich, J. (2011).** Biodegradation of acrylamide by *Enterobacter aerogenes* isolated from wastewater in Thailand. *Journal of Environmental Sciences* 23, 396-403.
- **Calsamiglia, S., Ferret, A., Bach, A. (2004).** Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- **Celinska, E., Grajek, W. (2009).** Biotechnological production of 2,3-butanediol. Current state and prospects. *Biotechnology Advances* 27, 715-725.
- **Chauhan, A. K., Varma, A. (2009).** A textbook of molecular biotechnology. IK International Publishing house. India.
- **Cho, S., Kim, T., Woo, H. M., Lee, J., Kim, Y., Um, Y. (2015).** Enhanced 2,3-butanediol production by optimizing fermentation conditions and engineering *Klebsiella oxytoca* M1 through overexpression of acetoin reductase. *PloS One*, 10, e0138109.
- **Cinta, M., Álvarez, S., Zaragoza, J., (2006).** Principales polímeros comerciales. Universidad Politécnica de Valencia.
- **Clarke, S. K. R. (1953).** A simplified plate method for detecting gelatin-liquefying bacteria. *Journal of Clinical Pathology* 6, 246–248.

- **Cottyn, B., Regalado, E., Lanoot, B., De Cleene, M. (2001).** Bacterial populations associated with the rice seed in the tropical environment. *Phytopathology* 91, 282–292.
- **Cowan, S. T., Steel, K. J. (1982).** Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. CECSA. México.
- **De Bruijn, F. (1992).** Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2180–2187.
- **De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130-135.
- **Delgenes, J. P., Penaud, V., Moletta, R. (2003).** Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. *ChemInform* 34.
- **Del Moral, L. (1996).** El impacto medioambiental del cultivo del arroz sevillano. Cultivo de arroz en clima mediterráneo. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.
- **Deshmukh, A. N., Nipanikar-Gokhale, P., Jain, R. (2016).** Engineering of *Bacillus subtilis* for the production of 2,3-butanediol from sugarcane molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1-11.
- **Despalins, A., Marsit, S., Oberto, J. (2011).** Absynte: a web tool to analyze the evolution of orthologous archaeal and bacterial gene clusters. *Bioinformatics* 27, 2905-2906.
- **Domenech, X. (1994).** Química ambiental. El impacto ambiental de los residuos. 2ª edición. Ediciones Miraguano. Madrid, España, p. 254.
- **Ecónomos, C., Clay, W.D. (1998).** Nutritional and health benefits of citrus fruits. *Food, Nutrition & Agriculture* 24, 11-18.
- **El Asli, A., Boles, E., Hollenberg, C. P., Errami, M. (2002).** Conversion of xylose to ethanol by a novel phenol-tolerant strain of *Enterobacteriaceae* isolated from olive mill wastewater. *Biotechnology letters* 24, 1101-1105.

- **Elías, X. (2000).** Reciclaje de residuos industriales. Aplicación a la fabricación de materiales para la construcción. Díaz de Santos, Madrid, España.
- **European Bioplastics.** <http://www.european-bioplastics.org>
- **FAO (2009).** Food Outlook. Global Market Analysis. Global Information and Early Warning System 2, 1-103.
- **FEDIT (2008).** Observatorio Industrial del Sector Químico. Tendencias en el uso de la biotecnología en el sector químico.
- **Ferdinand, W. (1964).** The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Biochemical Journal* 92, 578.
- **Ferraro, M. J. (2000).** Performance standards for antimicrobial disks susceptibility tests. National Committee for Clinical Laboratory Standards 20, M2-A7.
- **García, S. (2009).** Referencias históricas y evolución de los plásticos. *Revista Iberoamericana de polímeros* 10, 71-80.
- **Geckil, H., Gencer, S. (2004).** Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 691–697.
- **Glick, B. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
- **Gorinstein S., Martin-Belloso O., Park Y. S., Haruenkit R., Lojek, A., Ciz, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S. (2001).** Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruit. *Food Chemistry* 74, 309-315.
- **Grimaudo, N. J., Nesbitt, W. E., Clark, W. B. (1996).** Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. *Oral Microbiology and Immunology* 11, 59-61.
- **Grimont, F., Grimont, P. A. (2006).** The genus *Enterobacter*. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E. (Eds.), *The prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiological community electronic release*. Springer, New York, p. 314.

- **Grohmann, K., Cameron, R. G., Buslig, B. S. (1996).** Fermentation of orange peel hydrolysates by ethanologenic *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57, 383-388.
- **Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, N., Reddy, P. M., Reinhold-Jurek, B., Ladha, J. (2001).** Endophytic colonization of rice by diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 183, 2634-2645.
- **Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 895-914.
- **Han, J., Lee, D., Cho, J., Lee, J., Kim, S. (2012).** Hydrogen production from biodiesel byproduct by immobilized *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 151-157.
- **Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.
- **Hardoim, P. R. (2011).** Bacterial endophytes of rice: their diversity, characteristics and perspectives. University of Groningen. Groningen.
- **Haveren, J. V., Scott, E. L., Sanders, J. (2008).** Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinin* 2, 41-57.
- **Hebbar, H., Sumana, B., Raghavarao, K. (2008).** Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource Technology* 99, 4896-4902.
- **Hormaeche, E., Edwards, P. R. (1960).** A proposed genus *Enterobacter*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 10, 71-74.
- **Hornick, D. B., Allen, B. L., Horn, M. A., Clegg, S. (1991).** Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 1795-1800.
- **Hossain, A., Fazliny, A. R. (2010).** Creation of alternative energy by bio-ethanol production from pineapple waste and the usage of its properties for engine. *African Journal of Microbiology Research* 4, 813-819.

- **Hsu, L. Y., Minah, G. E., Peterson, D. E., Wingard, J. R., Merz, W. G., Altomonte, V., Tylenda, C. A. (1990).** Coaggregation of oral *Candida* isolates with bacteria from bone marrow transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 2621-2626.
- **IEA (2008).** World Energy Outlook 2008.
- **Ingraham, J., Ingraham, C., (1998).** Introducción a la microbiología II. Reverté, Barcelona, España. p. 709-710.
- **Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., Saraf, M. (2011).** *Enterobacter*: role in plant growth promotion. En: Maheshwari, D. K. (Ed.), *Bacteria in agrobiolology: Plant growth responses*. Springer, Heidelberg, Alemania. p. 159-182.
- **Ji, X. J., Huang, H., Ouyang, P. K. (2011).** Microbial 2,3-butanediol production: a state-of-the-art review. *Biotechnology Advances* 29, 351-364.
- **Jiang, L. Q., Fang, Z., Guo, F., Yang, L. B. (2012).** Production of 2, 3-butanediol from acid hydrolysates of *Jatropha* hulls with *Klebsiella oxytoca*. *Bioresource Technology* 107, 405-410.
- **Johansen, L., Bryn, K., Störmer, F. C. (1975).** Physiological and biochemical role of the butanediol pathway in *Aerobacter (Enterobacter) aerogenes*. *Journal of Bacteriology* 123, 1124-1130.
- **Jung, M., Ng, C., Song, H., Lee, J. (2012).** Deletion of lactate deshydrogenase in *Enterobacter aerogenes* to enhance 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95, 461-469.
- **Jurtshuk, P. (1996).** Bacterial metabolism. En: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas, Galveston, EE. UU. p. 65-84.
- **Kanehisa, M., Goto, S. (2000).** KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research* 28, 27-30.
- **Kareem, S. O., Akpan, I., Alebiowu, O. O. (2010).** Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malaysian Journal of Microbiology* 6, 161-165.

- **Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1992).** A general system to integrate *lacZ* fusion into the chromosome of Gram negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molecular and General Genetics* 233, 293-301.
- **Kim, K. Y., Hwangbo, H., Kim, Y. W., Kim, H. J., Park, K. H., Kim, Y. C., Seoung, K. Y. (2002).** Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* 60-2G. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 35, 59-67.
- **Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012).** Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 716-721.
- **Klemm, P., Jorgensen, B. J., van Die, I., de Ree, H., Bergmans, H. (1985).** The *fim* genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*: cloning and genetic organization. *Molecular Genetics and Genomics* 199, 410-414.
- **Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175-176.
- **Kovacs, N. (1956).** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178, 703.
- **Krogfelt, K. A., Klemm, P. (1988).** Investigation of minor components of *Escherichia coli* Type I fimbriae: protein chemical and immunological aspects. *Microbial Pathogenesis* 4, 231-238.
- **Kuhlke, T., Walsh, T. (2002).** World Plastics Market Review. (<http://www.polymerplace.com/articles/World%20Plastics%20Review.pdf>)
- **Laluce, C. (1991).** Leveduras termotolerantes. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos* 9, 40-44.
- **Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido, p. 115-175.

- **Lee, S. J., Kim, S. B., Kang, S. W., Han, S. O., Park, C., Kim, S. W. (2012).** Effect of crude glycerol-derived inhibitors on ethanol production by *Enterobacter aerogenes*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35, 85-92.
- **Li, L., Su, F., Wang, Y., Zhang, L., Liu, C., Li, J., Ma, C., Xu, P. (2012).** Genome sequences of two thermophilic *Bacillus licheniformis* strains, efficient producers of platform chemical 2,3-butanediol. *Journal of Bacteriology* 194, 4133-4134.
- **Li, J., Wang, W., Ma, Y., Zeng, A. P. (2013).** Medium optimization and proteome analysis of (R,R)-2,3-butanediol production by *Paenibacillus polymyxa* ATCC 12321. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 585-597.
- **Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L., Xu, P. (2015).** Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R, 3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. *Metabolic engineering* 28, 19-27.
- **Lino, T., Uchimura, T., Komagata, K. (2002).** The effect of sodium acetate on the growth yield, the production of L-and D-lactic acid, and the activity of some enzymes of the glycolytic pathway of *Lactobacillus sakei* NRIC 1071T and *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067T. *The Journal of General and Applied Microbiology* 48, 91-102.
- **Lu, W. Y., Zhang, T., Zhang, D. Y., Li, C. H., Wen, J. P., Du, L. X. (2005).** A novel bioflocculant produced by *Enterobacter aerogenes* and its use in defecating the trona suspension. *Biochemical Engineering Journal* 27,1-7.
- **Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenernegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M., Schleifer, K. H. (1998).** Bacterial phylogeny based on comparative sequences analysis. *Electrophoresis* 19, 554-568.
- **Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009).** Plant-Growth-Promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63, 541-556.
- **Madian, H., Nassar, H., Abu Amr, S. (2015).** Response surface optimization of the thermal acid pretreatment of sugar beet pulp for bioethanol production using *Trichoderma viride* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Patents on Biotechnology*, 9, 50-62.

- **Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2003).** Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edición. Southern Illinois University. Carbondale, EE. UU.
- **Maddox, I. S. (1996).** Microbial production of 2,3-butanediol. En: Rehm, H. J., Reed, G., Puhler, A., Stadler, P. (Eds.), *Biotechnology*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, p. 269-291.
- **Magee, R. J., Kosaric, N. (1987).** The microbial production of 2,3-butanediol. *Advances in Applied Microbiology* 32, 89-161.
- **Mamma D., Kourtoglou E., Christakopoulos P. (2008).** Fungal multienzyme production on industrial by-products of citrus-processing industry. *Bioresource Technology* 99, 2373-2383.
- **Manachini, B. (2007).** Preliminary results on the soil biodiversity of rice crops. En: Bocchi, S., Ferrero, A., Porro, A. (Eds.), *Proceedings IV Temperate Rice Conference*. Novara, Italia, p. 40-41.
- **Mano, H., Morisaki, H. (2008).** Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes and Environments* 23, 109-117.
- **Marina, V. A., Fanny, C. P. (2005).** Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55, 305-310.
- **Markova, A., Romanenko, A., Dukhanina, A., (2005).** Isolation of bacteria of the family *Enterobacteriaceae* from plant tissues. *Mikrobiologiya* 74, 663-666.
- **Martín, M. Á., Chica, A. F., Martín, A. (2009).** Una tecnología sostenible para el tratamiento de residuos agroindustriales: la digestión anaerobia. En: *Buenas prácticas de transferencia de conocimiento en la Universidad de Córdoba*. Consejo Social de la Universidad de Córdoba, Córdoba, España. p. 52-55.
- **Mehta, N. J., Vaidya, V. K. (2010).** Application of chromium resistant organisms in bioremediation. *Journal of Industrial Pollution Control* 26, 23-29.

- **Meca, A., Sepulveda, B., Ogona, J. C., Grados, N., Moret, A., Morgan, M., and Tume, P. (2009).** In vitro pathogenicity of northern Peru native bacteria on *Phyllocnistis citrella* Stainton (Gracillariidae: Phyllocnistinae), on predator insects (*Hippodamia convergens* and *Chrisoperna externa*), on *Citrus aurantifolia* Swingle and white rats. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7, 137-145.
- **Michel, F., Thibault, J., Barry, J. y de Baynast, R. (1988).** Preparation and characterisation of dietary fibre from sugar beet pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 42, 77-85.
- **Miller, J.H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Nueva York, EE.UU.
- **Miller, E. M., Nickoloff, J. A. (1995).** *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods in Molecular Biology* 47, 105-113.
- **Moyes, R. B., Reynolds, J., Breakwell, D. P. (2009).** Differential staining of bacteria: Gram stain. *Current Protocols in Microbiology* Appendix 3C.
- **Mulvey, M. A., Lopez-Boado, Y. S. (1998).** Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282, 1494-1497.
- **Nicholson, W. L. (2008).** The *Bacillus subtilis ydjL (bdhA)* gene encodes acetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6832-6838.
- **Nielsen, J. (2001).** Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 263-283.
- **Nigam, J. N. (1999).** Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *Journal of Biotechnolog*, 72, 197-202.
- **Oberoi, H. S., Vadlani, P. V., Madl, R. L., Saida, L., Abeykoon, J. P. (2010).** Ethanol production from orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6), 3422-3429.

- **Oliva, J. M. (2003).** Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- **Orndorff, P. E., Falkow, S. (1984).** Organization and expression of genes responsible for type 1 piliation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 160, 61-66.
- **Pardo, M., Cassellis, M., Escobedo, R., García, E. (2014).** Chemical characterisation of the industrial residues of the pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* 3, 53.
- **Pelczar, J. M., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. (1996).** Microbiología: conceptos e aplicações. Makron Books, São Paulo, Brasil, p.524-517.
- **Perego, P., Converti, A., Del Borghi, A., Canepa, P. (2000).** 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*: selection of the optimal conditions and application to food industry residues. *Bioprocess Engineering* 23, 613-620.
- **Peri, F., Piazza, M., Calabrese, V., Damore, G., Cighetti, R. (2010).** Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochemical Society Transactions* 38, 1390-1395.
- **Petrov K., Petrova P. (2009).** High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 659-665.
- **Piñón-Castillo, H. A., Brito, E. M. S., Goñi-Urriza, M., Guyoneaud, R., Duran, R., Nevarez-Moorillon, G. V., Reyna-López, G. E. (2010).** Hexavalent chromium reduction by bacterial consortia and pure strains from an alkaline industrial effluent. *Journal of Applied Microbiology* 109, 2173-2182.
- **PlasticsEurope.** <http://www.plasticseurope.org>
- **Prescott, L., Harley, J., Klein, D., (1993).** Microbiology 2^a edición. William C Brown, Iowa, EE.UU., p.436-437.
- **Puerta-García, A., Mateos-Rodríguez, F. (2010).** Enterobacterias. *Medicine* 10, 3426-3431.

- **Quandt, J., Hynes, M. F. (1993).** Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15-21.
- **Raji, Y., Jibril, M., Misau, I., Danjuma, B. (2012).** Production of vinegar from pineapple peel. *International Journal of Advanced Scientific Research and Technology* 3, 656-666.
- **Reese, M. G., Harris, N. L., Eeckman, F. H. (1996).** Large scale sequencing specific neural networks for promoter and splice site recognition. *Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium*, 737-738.
- **Rezic, T., Oros, D., Markovic, I., Kracher, D., Ludwig, R., Santek, B. (2013).** Integrated hydrolyzation and fermentation of sugar beet pulp to bioethanol. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 3, 1244-1252.
- **Ristuccia, P. A., Cunha, B. A. (1985).** Enterobacter. *Infection Control* 6, 124-128.
- **Rodrigues, R. C. L. B., Felipe, M. G. A., Almeida e Silva, J. B., Vitolo, M., Gómez, P. V. (2001).** The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and non volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 18, 299-311.
- **Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G., Marqués-Calvo, M. S. (2013).** High production of poly (3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of Applied Microbiology* 114, 1378-1387.
- **Russell, P. W., Orndorff, P. E. (1992).** Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. *Journal of Bacteriology* 174, 5923-5935.
- **Sabra, W., Groeger, C., Zeng, A. P. (2015).** Microbial cell factories for diol production. *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications* 155, 165-197.
- **Sacsquispe, R., Velásquez, J. (2002).** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

- **Saha, B. C., Bothast, R. J. (1999).** Production of 2, 3-butanediol by newly isolated *Enterobacter cloacae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 321-326.
- **Sambrook, J., Russell, D. W. (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. New York, EE.UU.
- **Sánchez Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A., Muñoz Hernández, J. A., Rivera Barrero, C. A. (2010).** Bioethanol production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Tumbaga* 5, 61-91.
- **Sanders, W. E., Sanders, C. C. (1997).** *Enterobacter spp.*: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 220-41.
- **Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A., Struve, C. (2010).** Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiology* 10, 179.
- **Short, S. A., Kaback, H. R., Kohn, L. D. (1975).** Localization of D-lactate dehydrogenase in native and reconstituted *Escherichia coli* membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 250, 4291-4296.
- **Sikora, B., Kubik, C., Kalinowska, H., Gromek, E., Białkowska, A., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Turkiewicz, M. (2015).** Application of byproducts from food processing for production of 2, 3-butanediol using *Bacillus amyloliquefaciens* TUL 308. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 46, 610-619.
- **Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Rosa, M. D. (2008).** Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19, 634-643.
- **Sruamsiri, S. (2007).** Agricultural wastes as dairy feed in Chiang Mai. *Animal Science Journal* 78, 335-341.
- **Stanley, J., Gunsalus, R., Lory, S., Perry, J. (2007).** Microbial life. Sinauer Associates. Massachusetts, EE.UU.
- **Sun, L. H., Wang, X. D., Dai, J. Y., Xiu, Z. L. (2009).** Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 847-852.

- **Syu, M. J. (2001).** Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 10-18.
- **Tajima, Y., Yamamoto, Y., Fukui, K., Nishio, Y., Hashiguchi, K., Usuda, Y., Sode, K. (2015).** Effects of eliminating pyruvate node pathways and of coexpression of heterogeneous carboxylation enzymes on succinate production by *Enterobacter aerogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 929-937.
- **Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007).** Microbiology: An introduction 9^a edición. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco, EE.UU.
- **Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. (2012).** Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40, e115.
- **Van Houdt, R., Aertsen, A., Michiels, C. W. (2007).** Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. *Research in Microbiology* 158, 379–385.
- **Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J., Lupski, J. R. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods in Cell Biology* 5, 25–40.
- **Vieira, J., Messing, J. (1982).** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. 19, 259-68.
- **Wadhwa, M., Bakshi, M. (2013).** Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. FAO. Bangkok, Tailandia.
- **Walsh, P., Metzger, D., Higuchi, R. (1991).** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506–513.
- **Wang, A. L., Wang, Y., Jiang, T. Y., Li, L. X., Ma, C.Q. (2010).** Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 965–970.

- **Wang, A., Xu, Y., Ma, C., Gao, C., Li, L., Wang, Y., Xu, P. (2012).** Efficient 2,3-butanediol production from cassava powder by a crop-biomass-utilizer, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* SDM. *PLoS One* 7, e40442.
- **Wilkins, M. R. (2009).** Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy* 33, 538–541.
- **Yang, T., Rao, Z., Zhang, X., Xu, M., Xu, Z., Yang, S. T. (2013).** Improved production of 2,3-butanediol in *Bacillus amyloliquefaciens* by over-expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 2, 3-butanediol dehydrogenase. *PLoS One* 8, e76149.
- **Zhang, C., Ma, K., Xing, X. H. (2009).** Regulation of hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD⁺. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 1226–1232.
- **Zhao, H. X., Ma, K., Lu, Y., Zhang, C., Wang, L. Y., Xing, X. H. (2009).** Cloning and knockout of formate hydrogenlyase and H₂-uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 186–194.

