



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“METABOLISMO MICROBIANO”

GUÍA DEL MAESTRO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LADY LAURA ROSALES CUETO

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“METABOLISMO MICROBIANO”

GUÍA PARA EL MAESTRO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LADY LAURA ROSALES CUETO

DIRIGIDA POR

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
DIRECTOR

SINODALES

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
DIRECTOR

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA
SINODAL

DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
SINODAL

DRA. SILVIA LORENA AMAYA LLANO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
PRÓLOGO	xvii
1.ANTECEDENTES	1
2.OBJETIVOS	3
2.1 General	3
2.2 Específicos	3
3.INTRODUCCIÓN AL METABOLISMO	4
3.1 Taxonomía microbiana	4
3.1.1 Sistema de nominación de bacterias	10
3.2 Arquitectura de la célula microbiana	11
3.3 Principios generales de metabolismo microbiano	18
3.4 Clasificación de los microorganismos por su metabolismo	21
4.TRASPORTE Y BIOENERGÉTICA	24
4.1 Transporte celular	24
4.1.1 Transporte pasivo	26
4.1.2 Transporte facilitado	26
4.1.3 Transporte activo	29
4.1.4 Cinéticas de transporte	36
4.2 Introducción a la bioenergética	39
4.2.1 Termodinámica de los seres vivos	42
4.2.2 Fuerza protón motriz	43
4.3 Sistemas de producción de ATP	47
4.4 Fosforilación a nivel de sustrato	49
4.5 Fosforilación oxidativa	52
5. METABOLISMO ENERGÉTICO (CATABOLISMO)	60
5.1 Metabolismo quimiorganotrofo	60
5.1.1 Glucólisis (EMP)	63
5.1.2 Vías alternas a la glucólisis	75

5.1.2.1 Vía hexosa monofosfato (HMP)	77
5.1.2.2 Vía Entner-Doudoroff (EDP)	80
5.1.2.3 Vía fosfocetolasa	82
5.1.3 Fermentaciones	84
5.1.3.1 Fermentación alcohólica	85
5.1.3.2 Fermentación ácido láctica (homoláctica y heteroláctica)	87
5.1.3.3 Fermentación butírica	89
5.1.3.4 Fermentación butanediol	90
5.1.3.5 Fermentación propiónica	92
5.1.3.6 Fermentación mezcla de ácidos	93
5.1.3.7 Fermentación de ácidos dicarboxílicos	96
5.1.3.8 Fermentación en <i>Archeas</i> hipertermofílicas	97
5.1.4 Ciclo de Krebs y vías anapleróticas	97
5.1.4.1 Ciclo del glioxilato	99
5.1.4.2 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	100
5.1.4.3 Ciclo reductivo de los ácidos carboxílicos	100
5.1.4.4 Fijación anaplerótica del CO ₂	101
5.2 Metabolismo quimiolitotrófico	102
5.2.1 Bacterias Nitrificantes	107
5.2.2 Bacterias del azufre	115
5.2.3 Bacterias oxidantes del hierro	119
5.2.4 Bacterias oxidantes de hidrógeno	120
5.2.5 Vía de la fijación de CO ₂ en quimiolitótrofos	123
5.3 Metabolismo fotolitotrófico	124
5.3.1 Fotosíntesis	125
5.3.1.1 Microorganismos fotosintéticos	128
5.3.1.2 Metabolismo del carbono en fotoorganótrofos	131
5.4 Respiración	133
5.4.1 Anaerobia	133
5.4.1.1 Denitrificación	133

5.4.1.2 Reducción de metales	134
5.4.1.3 Sulfidogénesis	135
5.4.1.4 Metanogénesis	137
5.5 Metabolismo Intermediario	138
5.5.1 Degradación de polímeros.	138
5.5.1.1 Carbohidratos	139
5.5.1.2 Ácidos nucleicos	146
5.5.1.3 Lípidos	149
5.5.1.4 Proteínas	150
5.5.2 Degradación de compuestos recalcitrantes	156
5.5.2.1 Vía del catecol y protocatecuato	159
6. METABOLISMO BIOSINTÉTICO (ANABOLISMO)	163
6.1 Biosíntesis de sacáridos y sus derivados	168
6.1.1 Gluconeogénesis	168
6.1.2 Hexosa monofosfato	164
6.1.3 Monómeros de mureína	165
6.1.4 Síntesis de ácido teicoico	167
6.2 Biosíntesis de aminoácidos.	169
6.2.1 Familias del piruvato y oxalacetato	171
6.2.2 Familias del fosfoglicerato	174
6.2.3 Familias del cetoglutarato	175
6.2.4 Aminoácidos aromáticos	176
6.2.5 Biosíntesis de histidina	177
6.3 Biosíntesis de ácidos nucleicos.	178
6.3.1 Vías de salvamento	179
6.3.2 Biosíntesis <i>de novo</i>	179
6.3.2.1 Pirimidina	180
6.3.2.2 Purina	181
6.3.3 Biosíntesis de deoxinucleóticos	182
6.4 Síntesis de lípidos	183
6.4.1 Síntesis de ácidos grasos	184

6.4.2 Biosíntesis de fosfolípidos	185
6.4.3 Biosíntesis de isoprenoides	187
6.5 Formación de tetrapirroles y grupo hemo	188
7. INTEGRACIÓN METABÓLICA Y ANÁLISIS DE CULTIVOS.	
7.1 Regulación enzimática	191
7.2 Regulación metabólica	192
7.3 Crecimiento microbiano	194
7.4 Sistemas de cultivo de crecimiento.	195
7.5 Factores ambientales	197
8. APLICACIONES ADICIONALES DEL METABOLISMO MICROBIANO	197
8.1 Metagenómica y biotecnología	198
8.2 Ecofisiología microbiana	199
8.3 Organismos no cultivables	203
8.4 Sistema de metagenómica y selección	204
8.5 Principios de ingeniería metabólica	212
8.5.1 Ejemplos de aplicación de la ingeniería metabólica	212
9. HERRAMIENTAS VIRTUALES	216
9.1 Laboratorios virtuales	218
9.2 Canales de YouTube	220
9.3 Cursos en línea	222
9.4 Apps	223
9.5 Bibliotecas digitales	228
9.6 Software especializado	228
10. BIBLIOGRAFÍA	229
10.1 BIBLIOGRAFIA DIGITAL	233
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Comparación de los componentes celulares de cada dominio	7
2	Composición macromolecular del interior de una bacteria	13
3	Componentes de la membrana exterior y sus funciones en <i>Escherichia coli</i>	15
4	Grupos fisiológicos de litótrofos	22
5	Requerimientos nutricionales de algunos microorganismos	24
6	Promedio de la energía libre de la hidrólisis de fosfato en algunos compuestos de interés biológico	52
7	Resumen del rendimiento energético máximo obtenido por la oxidación completa de glucosa	59
8	Promedio de la energía libre de la hidrólisis de fosfato en algunos compuestos de interés biológico ATP	67
9	Cambios en la energía libre de Gibbs en la glucólisis en el músculo del corazón	75
10	Ejemplos de diferentes vías de fermentación	96
11	Tipo de reacción dependiendo la fuente de energía	105
12	Bacterias del nitrógeno que oxidan el amonio	108
13	Bacterias del nitrógeno que oxidan los nitritos	109
14	Ejemplos de procariotas fijadoras de nitrógeno	110
15	Complejo nitrogenasa de <i>Rhizobium spp</i>	111
16	Sustancias reducidas por el complejo nitrogenasa	113
17	Bacterias oxidantes de azufre	117
18	Bacterias oxidantes de azufre. Bacterias filamentosas* quimiolitótrofas del azufre y otros géneros	118
19	Bacterias oxidantes del hidrógeno	121
20	Bacterias oxidantes del hidrógeno, Gram positivas.	122
21	Toxinas producidas por cianobacterias	126
22	Bacterias fotosintéticas	126
23	Pigmentos fotosintéticos	127

24	Diferencias entre plantas y bacterias durante la fotosíntesis	133
25	Ejemplo de respiraciones anaerobias en procariontes	135
26	Degradación de polímeros de carbono	14
27	Algunos ejemplos de microbios que utilizan hidrocarburos	161
28	Esqueletos de carbono usados en la biosíntesis de aminoácidos	176
29	Esquema del número de células según el número de generaciones	199
30	Tiempo de generación celular	200
31	Relación entre los microorganismos y el pH	208
32	Actividad del agua para diferentes sustancias	208
33	Efecto del oxígeno sobre el crecimiento bacteriano	211
34	Trabajos relevantes sobre actividades biológicas encontradas en bibliotecas metagenómicas de suelos	214
35	Comparación de métodos de secuenciación	221

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de la vida en la tierra, 5 reinos, 2 dominios	5
2	Relación filogenética entre formas de vida basada en las secuencias de rARN	6
3	Taxonomía básica de las Eubacterias	7
4	Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S	8
5	Números de filos y secuencias genómicas entre Bacteria y Archea identificadas desde 1987	9
6	Sistema de nomenclatura binominal para la taxonomía bacteriana	10
7	Diagrama de la pared bacteriana. Gram positiva a la derecha y Gram negativa a la izquierda	11
8	Diagrama de una célula bacteriana "típica" <i>Escherichia coli</i>	12
9	Composición macromolecular del interior de una bacteria	12
10	Estructura celular de la superficie de procariontes	14
11	Estructura celular de microorganismos	16
12	La estructura de envoltura de un microorganismo Gram positivo (izquierda) y un microorganismo Gram negativo (derecha)	16
13	Vista esquemática de los peptidoglicanos bacterianos	17
14	Papel del ATP acoplado el catabolismo y la fotosíntesis a la biosíntesis	18
15	La relación entre catabolismo y anabolismo en la célula	19
16	El catabolismo y anabolismo	20
17	Metabolismo y biosíntesis	20
18	Clasificación de los microorganismos de acuerdo a su fuente de energía	21
19	Fuentes de energía para los microorganismos: fototrofia, quimiorganotrofia y quimiolitotrofia	23
20	Esquema general donde se muestran las principales diferencias	25

	en los tipos de transporte a través de la célula	
21	Difusión simple	26
22	Difusión facilitada	27
23	Gramicina A modelo de un ionóforo formador de canales	27
24	Formación del canal de Gramicina con el acarreador Valinomicina	28
25	Difusión pasiva a través de porinas	28
26	Esquema del transporte activo primario y el transporte activo secundario	30
27	Transporte activo dependiente del gradiente electroquímico	30
28	Transporte primario	31
29	Transporte secundario	32
30	Transporte activo secundario: Antiporte	32
31	Transporte activo secundario: Uniporte	33
32	Precusores/productos del sistema antiporte de bacterias ácido lácticas	33
33	Transporte de maltosa a través de los transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC	34
34	Transportadores ABC o ATPasas de tráfico	35
35	Translocación de grupo	35
36	La célula como sistema semiaislado	39
37	Transducción energética celular	40
38	Esquema generalizado de la formación de energía metabólica y su uso	41
39	Los procesos energéticos en las reacciones.	41
40	Transducción de la energía	43
41	Diagrama general de la fuerza protón motriz en la membrana celular bacteriana	44
42	Formación de una membrana celular energizada: fuerza protón motriz	44
43	Formación de la membrana celular energizada por la Hidrólisis	45

	de ATP	
44	Fuerza protón motriz	45
45	Fuerza protón motriz en acidófilos y alcalófilos	46
46	Formación de fuerza protón motriz y síntesis de ATP por medio de ETP	46
47	Ciclo energético del ATP	47
48	Estructuras ATP, ADP, AMP y Adenosin	48
49	Formación de ATP	48
50	Reacciones involucradas a nivel sustrato en la formación de enlaces de fosfato de alta energía	50
51	Formación de compuestos de alta energía por deshidrogenación	50
52	Hidrólisis de ATP	51
53	ΔG total de la hidrólisis de ATP	52
54	Cadena respiratoria	53
55	Cadena transportadora de electrones	54
56	Generación de ATP en la cadena respiratoria	55
57	Fosforilación oxidativa	55
58	Fosforilación oxidativa y la ATPasa	56
59	Esquema de la ATP sintetasa, anclada a la membrana celular	57
60	Gradiente de protones y fosforilación oxidativa	58
61	Esquema del gradiente de electrones en la membrana celular y formación de ATP.	59
62	Balance energético en la cadena respiratoria y glucólisis	60
63	Catabolismo de los carbohidratos, vías de degradación	61
64	Esquema de las diversas vías que puede tomar la glucosa	61
65	Catabolismo y anabolismo	62
66	Glucólisis	63
67	Intermediarios en la glucólisis	65
68	Glucólisis y las enzimas catalizadoras.	66
69	Parte 1 de la vía de la glucólisis	67

70	Parte 2 de la vía de la glucólisis	68
71	Reacción de hexocinasa	69
72	Reacción hexosa fosfato isomerasa	69
73	Reacción de la fosfofructocinasa	70
74	Reacción de la aldolasa	70
75	Reacción triosa fosfato isomerasa	71
76	Reacción gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	71
77	Reacción fosfoglicerato cinasa	72
78	Reacción fosfoglicerato mutasa	72
79	Reacción enolasa	73
80	Reacción piruvato cinasa	73
81	Cambios en la energía libre de Gibbs	74
82	Glicolisis balance general	75
83	Oxidación de la glucosa por la vía de Embden-Mayerhof-Parnas	76
84	Vía Hexosa Monofosfato (Pentosa fosfato)	77
85	Reacción de la transcetolasa y reacción trasaldolasa	78
86	Relación glicolisis/pentosa fosfato	79
87	Puntos clave de la vía de la pentosa fosfato	80
88	Vía Entner-Doudoroff	81
89	Productos de la Vía Entner-Douderoff	82
90	Vía fosfocetolasa	83
91	Catabolismo lineal y ramificado	84
92	Fermentación etanólica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Zymomonas mobilis</i>	85
93	Fermentación de glucosa a etanol y CO ₂ por levaduras	86
94	Formación de lactato a partir de glucosa por la vía homofermentativa	87
95	Fermentación ácido láctica, homofermentativa	88
96	Fermentación butírica	89
97	Formación de butanodiol	90
98	Fermentación ABE Acetona Butanol Etanol en C.	91

	<i>acetobutylicum</i>	
99	Fermentación propiónica	92
100	Fermentación propiónica por la vía del acrilato	92
101	Mezcla de ácidos producto de la fermentación	93
102	Fermentación ácido-mixta	94
103	Esquema de fermentaciones	96
104	Conversión de acetato a intermediarios del metabolismo central a través del ciclo del glioxilato y de los ácidos tricarbóxicos	96
105	Fermentación de azúcar por <i>Pyrococcus furiosus</i>	97
106	Relación entre las vías de los carbohidratos y el ciclo del ácido cítrico	98
107	Ciclo del ácido cítrico	99
108	La vía del ácido cítrico reductiva en bacterias fermentativas	101
109	Fijación del CO ₂	102
110	Interacción microorganismo-ambiente	103
111	Reacción oxido reducción	104
112	Nitrificación paso 1	105
113	Nitrificación paso 2	106
114	Oxidación del amonio con nitritos como aceptor de electrones en condiciones anaerobias	107
115	Ciclo del nitrógeno	109
116	Reducción de N ₂ por el complejo nitrogenasa	110
117	Roles de la planta hospedera y <i>Rhizobium</i> en la fijación simbiótica del N ₂	111
118	Fijación de N ₂ en heteroquistes de cianobacterias heterocísticas	112
119	Micrografía de bacterias oxidantes de azufre	113
120	Vía Sulfito oxidasa	114
121	Asimilación por reducción del sulfato y síntesis de cisteína	116
122	Rusticianina, proteína periplásmica que contiene fierro	117
123	Bacterias del hidrógeno quimioheterótrofas	118
124	<i>Ralstonia eutropha</i> , aspectos principales del metabolismo	119

	heterotrófico y litoautotrófico	
125	<i>Arthrobacter spp</i> , bacterias del suelo capaces de degradar simbióticamente con <i>Streptomyces</i> compuestos tóxicos	120
126	Vía sulfito oxidasa	121
127	Los organismos fotolitróficos emplean el ATP y el poder reductor para fijar el CO ₂ a través del ciclo de Calvin.	122
128	El ciclo de Calvin	123
129	Estructura de la clorofila	125
130	Espectro de absorción de organismo fotosintéticos	126
131	Fotosistema I: flujo cíclico de electrones acoplado a la fosforilación	127
132	Flujo de electrones en la planta durante la fotosíntesis	127
133	Tilacoides, organelos fotosintéticos en cianobacterias	128
134	Clorosoma unido a la membrana citoplasmática en bacterias verdes	128
135	Aparato fotosintético en bacterias púrpuras	129
136	Cadena fotosintética de transporte de electrones de cianobacterias	129
137	Transporte de electrones fotosintético en bacterias verdes	130
138	Reacciones de luz en bacterias púrpuras	130
139	Metabolismo fotoorganotrófico en bacterias púrpuras	131
140	Butirato metabolizado por bacterias púrpuras	132
141	Metabolismo del carbono por cianobacterias	132
142	Desnitrificación en la membrana	134
143	Micrografía de <i>Geobacter metallireducens</i>	135
144	Reducción desasimiladora de sulfatos	136
145	Micrografía <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	136
146	Comparación de reducciones asimiladoras y desasimiladoras de sulfatos	137
147	Metanógenos	138
148	Diagrama general de la degradación de polímeros	139

149	Hidrólisis de celulosa cristalina por exo- β -1,4-glucanasa	141
150	Degradación de bases purinas	142
151	Degradación de bases pirimidinas	143
152	Conversión del acetato a intermediarios del metabolismo central a través de ciclo de los ácidos tricarbóxicos y el ciclo del glioxilato	144
153	Degradación de palmitato a acetil-CoA a través de la β -oxidación	145
154	Vía del acrilato	146
155	Conversión del acetato a intermediarios del metabolismo central a través del ciclo del ácido tricarbóxico y ciclo del glioxilato	147
156	Ciclo de los ácidos dicarbóxicos y vía del glicerato para la utilización del glioxilato	148
157	Metabolismo del glioxilato a través de la vía 3-hidroxiaspartato por <i>Paracoccus denitrificans</i>	149
158	Metabolismo del oxalacetato en <i>Pseudomonas oxolaticus</i>	149
159	Degradación de histidina	150
160	Degradación de aminoácidos con cadena lateral	151
161	Degradación de arginina	152
162	Degradación de prolina	152
163	Degradación de lisina	156
164	Degradación de triptófano	157
165	Oxidación de hidrocarburos alifáticos por <i>Pseudomonas oleovorans</i>	158
166	Oxidación de hidrocarburos alifáticos por <i>Nocardia petroleophila</i>	159
167	Oxidación de propileno por <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	159
168	Degradación de aminoácidos aromáticos	160
169	Metabolismo de los carbohidratos usando Ortho y Meta fisión	161
170	Compuestos aromáticos metabolizados a través de protocatecuato	161
171	Compuestos aromáticos metabolizados por catecol	162

172	Meta fisión de catecol y protocatecuato	163
173	Vía gentisato	164
174	Gluconeogénesis, la biosíntesis de la glucosa a partir de compuestos no glucosídicos	165
175	Vía hexosa monofosfato (Pentosa- fosfato)	165
176	Ciclo hexosa monofosfato oxidativo.	166
177	Síntesis de los monómeros de mureína, UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilmuramato	166
178	Síntesis de UDP-N-acetilmuramilpentapéptido a través de la síntesis de un péptido no ribosomal agregando aminoácidos al grupo lactil de UDP-N-acetilmuramato	167
179	Estructuras de los ácidos teicoicos	168
180	Variaciones en las estructuras de los ácidos teicoicos	169
181	Ruta biosintética para aminoácidos y compuestos relacionados	170
182	La asparagina sintetasa sintetiza la asparagina a partir del aspartato y el amonio consumiendo energía en forma de ATP	171
183	Biosíntesis de treonina, metionina y lisina del precursor común aspartato	172
184	Biosíntesis de lisina en levaduras y hongos a través de la vía 2-aminoadipato	173
185	Biosíntesis de Isoleucina, valina y leucina	174
186	Biosíntesis de glicina, serina y cisteína a partir de 3-fosfoclicerato	176
187	Biosíntesis de glutamato, glutamina, prolina y arginina de 2-cetoglutarato	177
188	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos	178
189	Biosíntesis de la histidina	179
190	Biosíntesis de novo de nucleótidos de piridina	180
191	Biosíntesis de nucleótidos de purina	181
192	Biosíntesis de nucleótidos de purina	182
193	Síntesis de Acil-ACP	183

194	Síntesis de Acil-ACP insaturado por la ruta anaeróbica	185
195	Biosíntesis de fosfolípidos	186
196	Síntesis de isopentil pirofosfato	188
197	Vía hemo biosintética de ALA a protohemo	189
198	Represión enzimática por operón	190
199	Inducción de síntesis enzimática	192
200	Crecimiento celular logarítmico	193
201	Sistema de cultivo cerrado	195
202	Curva típica de crecimiento en un sistema cerrado	197
203	Sistema de cultivo continuo	198
204	Efecto de la temperatura en el crecimiento celular	199
205	Clases de microorganismos en relación a la temperatura óptima	200
206	El pH en el crecimiento microbiano	200
207	Efecto de soluciones (isotónica, hipotónica e hipertónica) sobre la pared celular de las bacterias	202
208	Efectos de la presión osmótica y la disponibilidad del agua en los microorganismos	202
209	Aplicaciones de la metagenómica	204
210	Flujo de trabajo general de estudio metagenómico	205
211	Enzimas industriales obtenidas del metagenoma, para aplicaciones y procesos industriales	207
212	Diagrama de flujo del análisis del metagenoma de una muestra de suelo en laboratorio	208
213	Estrategias para el estudio metagenómico de muestras ambientales	209
214	Flujo de trabajo para los análisis metagenómicos; a) secuenciación de alto rendimiento; b) secuenciación tipo shotgun	211
215	Estrategias para aumentar la acumulación de carbono en un producto determinados	212
216	Un mismo intermediario (dihidrokaempferol) puede dar lugar a	214

	dos tipos de productos diferentes	
218	La síntesis de flavonoides es un ejemplo del éxito de la ingeniería metabólica	215
219	Transformación de la hiosciamina en escopolamina	216
220	Síntesis de ácido salicílico a partir de fenilalanina	217
221	Laboratorio virtual de Expresión génica de PhET	218
222	Virtual Labs	219
223	<i>VALUE @ Amrita</i>	220
224	Lista de experimentos del laboratorio virtual de Biorreactores, Sakshat Virtual lavas del Indian Institute of Technology Delhi	221
225	Canal Microbiology Videos	222
226	MITOPENCOURSEWARE	223
227	OpenWetWare	224
228	Curso de Introducción al metabolismo por Khan Academy	225
229	Aplicaciones para dispositivos móviles que apoyaran el aprendizaje	226
230	Mendeley una biblioteca web personalizada	227

PRÓLOGO

Apreciable docente:

Esta guía contiene una selecta compilación de herramientas que le permitirá preparar cada clase. Es importante recalcar que no es un libro de texto, son materiales elegidos minuciosamente para facilitar la preparación de clase, ahorrando tiempo en los conceptos básicos para poder ahondar más en el tema.

Se eligió la asignatura de metabolismo microbiano debido a su impacto en el desarrollo de las biotecnologías. Comprender el intercambio energético y de metabolitos en las comunidades microbiológicas sumado al conocimiento en bioquímica, microbiología, termodinámica, fisiología permite generar nuevos productos y procesos biotecnológicos o la optimización de los actuales.

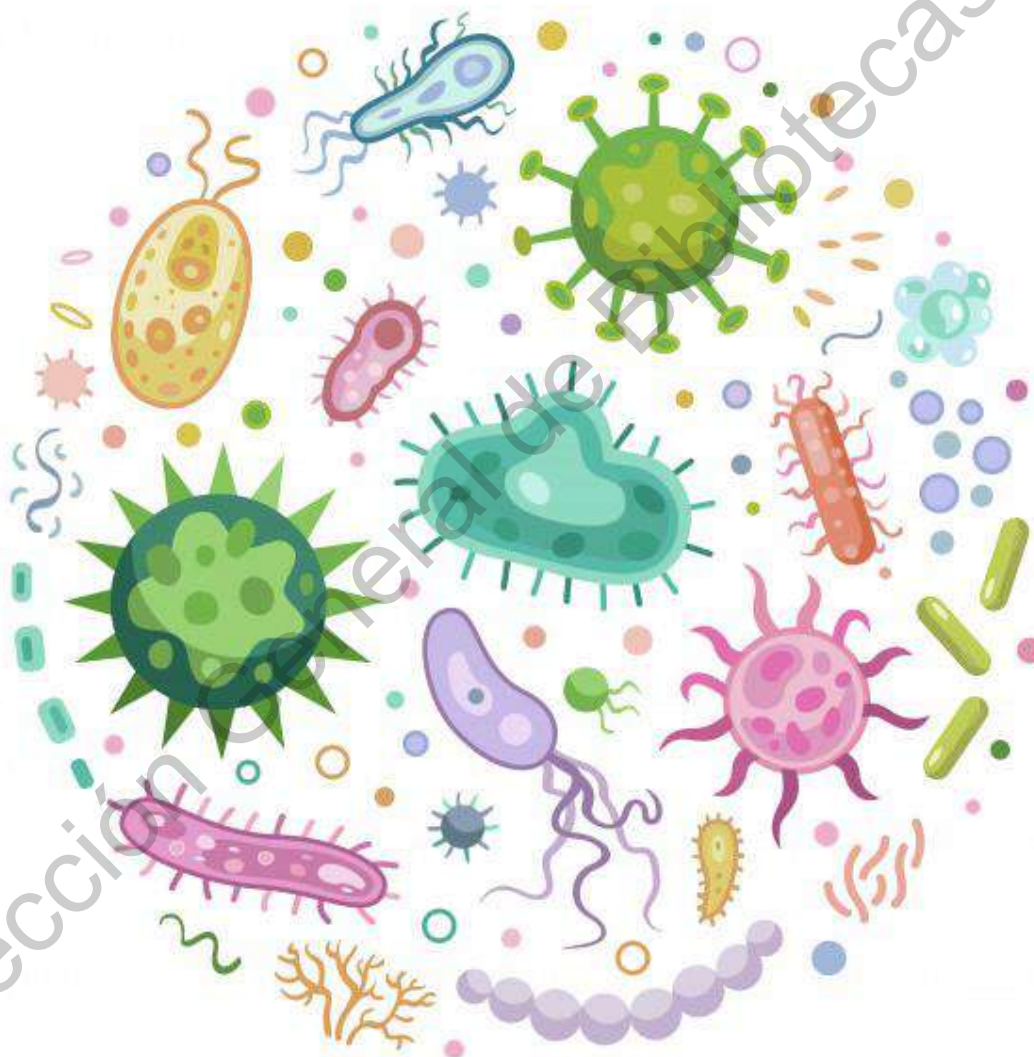
La elección de cada material fue hecha a partir del programa de estudios vigente para la Ingeniería en Biotecnología, carrera ofertada en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, así mismo se revisaron programas de estudios de otras universidades del mundo, con el objetivo de estar a la vanguardia en conocimientos.

Se agrega al menos un material por cada parte del temario, el cual puede ser una figura, un artículo, una ecuación o imagen que facilite el aprendizaje. El contenido se presenta de manera concisa y simple, dando oportunidad a que se pueda profundizar tanto como el grupo y el docente lo necesiten.

Para el desarrollo de las sesiones se puede recurrir a la exposición y explicación de los temas, fortalecer el aprendizaje con artículos que demuestren la aplicación de conceptos y el intercambio de ideas innovadoras sobre posibles aplicaciones biotecnológicas.

Invito a todos los lectores a retar su creatividad y la de sus estudiantes, en la aplicación del conocimiento para solucionar problemas actuales y realizar proyectos de gran impacto social.

“Un maestro es una brújula que activa los imanes de la curiosidad, conocimiento y sabiduría en sus pupilos”.



1. ANTECEDENTES

La vida en la Tierra es posible gracias a la gran diversidad microbiana (Capello, 2000). Esta diversidad microbiana se puede traducir en diversidad metabólica. Los microorganismos procariontes y eucariontes realizan el mismo metabolismo básico, sin embargo, la diversidad recae en las formas de generar energía y en los metabolitos secundarios que estos secretan (Kenneth, 2008).

Cuando hablamos de metabolismo nos referimos a la suma de reacciones bioquímicas necesarias para generar energía y al uso de esa energía para sintetizar el material celular a partir de pequeñas moléculas en el ambiente. El metabolismo contiene un componente generador de energía llamado catabolismo y un componente biosintético consumidor de energía llamado anabolismo. Las vías o reacciones catabólicas producen energía como ATP la cual es utilizada en las reacciones catabólicas para la síntesis de material celular a partir de nutrientes en el ambiente (Kenneth, 2008).

El conocimiento de esta diversidad microbiana y sus metabolitos derivan en aplicaciones biotecnológicas. Los microorganismos como herramientas biotecnológicas tienen una gama infinita de posibilidades industriales, agrícolas, alimentarias, ambientales y para la salud, ya sea que utilicemos la entidad celular completa o los metabolitos producidos por estas.

En los probióticos podemos ver el uso de los organismos completos, y en el caso de los metabolitos tenemos la producción de aminoácidos aditivos alimentarios. La producción de nuevos antibióticos, vacunas, interferones y otros agentes terapéuticos, son producto de la tecnología aplicada de estos microorganismos. En el caso de la agricultura también vemos el impacto en el desarrollo de bioinsecticidas, biofungicidas, para control biológico. La biorremediación del suelo o el tratamiento de aguas residuales por consorcios microbianos son un claro ejemplo de aplicaciones ambientales.

La proyección de las biotecnologías en todas las facetas de la vida humana, dependerá del ingenio de cada biotecnólogo, no teniendo limite en cuanto a posibilidades, por lo que el comprender el metabolismo microbiano es fundamental para la aplicación de nuevas alternativas tecnológicas.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2. OBJETIVOS

2.1 General

Tener una compilación selecta de herramientas sobre el curso de metabolismo microbiano que le permita al profesor facilitar la preparación de las clases.

2.2 Específicos.

- Permitir al docente contar con una guía específica de contenido para cada clase que deba impartir.
- Tener un recurso gráfico que facilite al alumnado la comprensión e internalización de la información que se revisa durante la clase.
- Formar un precedente para futuros textos de referencia, ya sea para esta materia o para otras.
- Integrar el contenido de otras materias de manera concreta y guiada, a través de los artículos que se anexan.
- Proporcionar herramientas virtuales que apoyen el aprendizaje en línea y a distancia.

3. INTRODUCCIÓN AL METABOLISMO

3.1 Taxonomía microbiana

Para estudiar la diversidad de organismos existentes es preciso agruparlos y organizar los grupos generales en una estructura jerárquica sin superposiciones. De eso se encarga la TAXONOMÍA, que es la ciencia de la clasificación biológica. La taxonomía en su sentido más amplio se descompone en tres partes independientes pero interrelacionadas: clasificación, nomenclatura e identificación.

La clasificación es la estructuración de los organismos en taxones o grupos en función de semejanzas o del parentesco evolutivo. La nomenclatura es la rama de la taxonomía que se ocupa de la asignación de nombres a grupos taxonómicos de conformidad con normas publicadas. La identificación constituye el lado práctico de la taxonomía que consiste en establecer que un organismo determinado pertenece a un taxón reconocido (Madigan, 1998).

Durante la primera mitad del siglo XIX sólo se conocían dos reinos, animal y vegetal. Luego de comenzar a conocerse la existencia de microorganismos, en 1866, Ernst Haeckel creó un tercer reino que llamó los Protistas.

Lynn Margulis en colaboración con Karlene V Schwarz clasificaron a los organismos en 5 reinos naturales y 2 dominios de acuerdo a su morfología (Figura 1). Esta clasificación trajo aciertos y equivocaciones, aunque la clasificación es compleja, se reconoce a los hongos como un reino aparte, muchos organismos son difíciles de colocar (Protistas o protoctistas) y supone que las *Archea* son bacterias (Figura 3). Su clasificación se basó en la propuesta de R. H. Whittaker en 1969, con algunas diferencias.

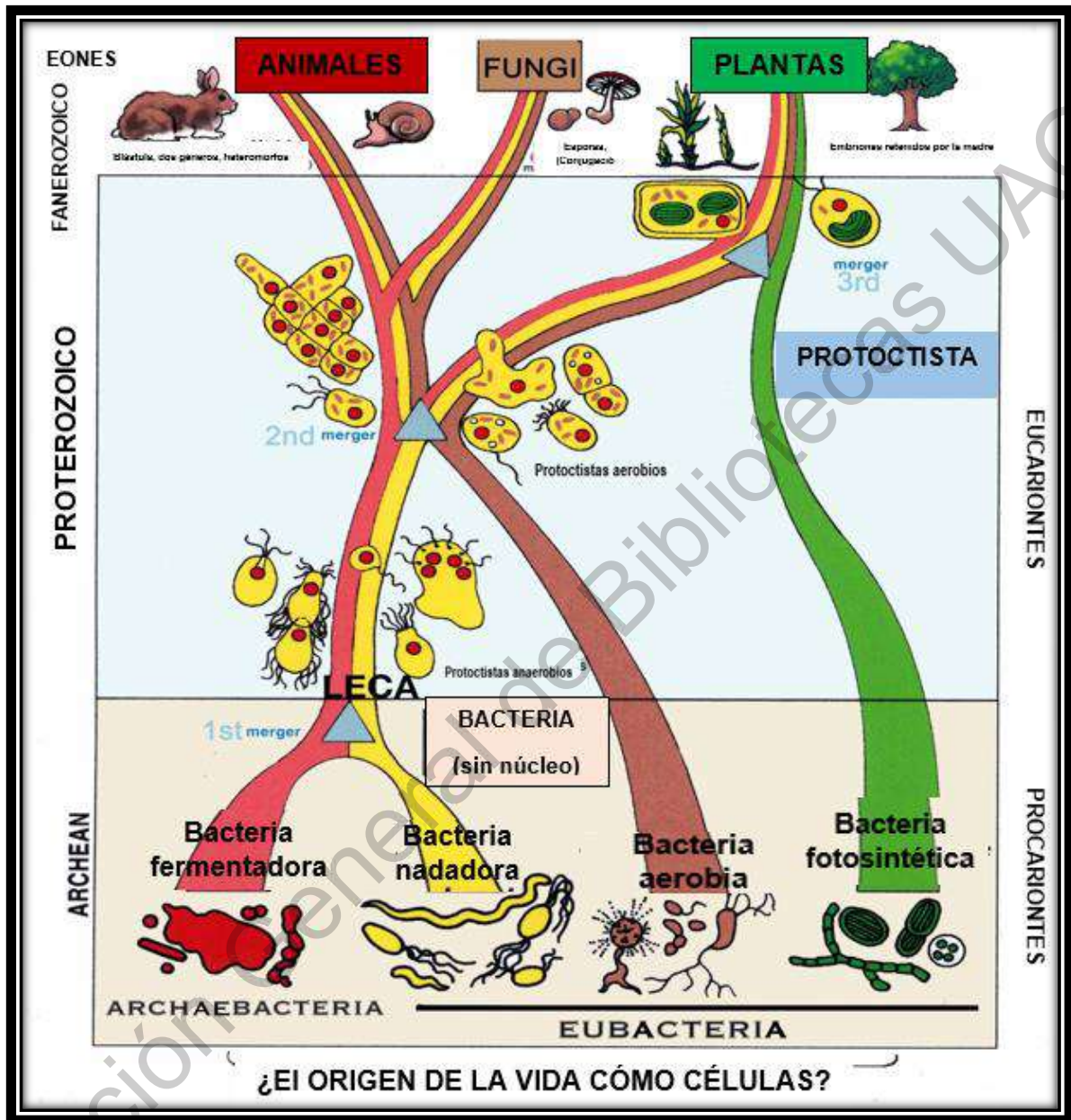


Figura 1. Clasificación de la vida en la tierra, 5 reinos, 2 dominios. (Margulis & Michael J Chapman, 1982-1998-2009). ["Kingdoms and Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth."](#) p53

Las nuevas técnicas de biología molecular (Figura 4) permitieron estudiar la composición del ARN ribosómico y descubriendo que hay dos tipos de células procariotas (arqueas y bacterias) y un tipo de células eucariotas. En 1978, Carl R. Woese propuso elevar los tres tipos de células a un nivel por encima del reino, llamado dominio y de ahí surgió el sistema de clasificación de tres dominios que se conoce en la actualidad y que comprende (Figura 2, Cuadro 1):

- Bacteria (procariotas unicelulares cuya pared celular contiene peptidoglicano)
- Arquea (procariotas unicelulares cuya pared celular no contiene peptidoglicano)
- Eukarya (todos los eucariotas)

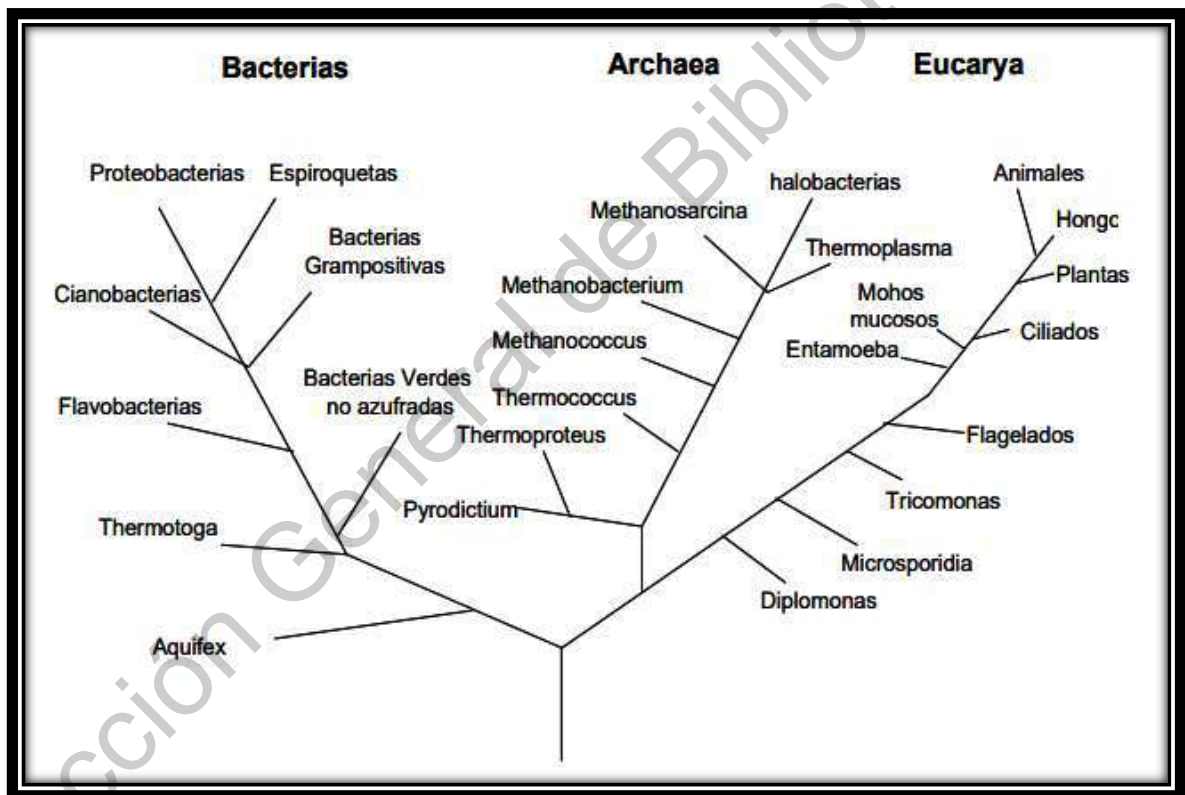


Figura 2. Relación filogenética entre formas de vida basada en las secuencias de rARN. Woese determinó que las comparaciones moleculares muestran que la vida en la tierra, se divide en tres grandes dominios, Bacteria, Archea y Eukarya. (Woese,1990).

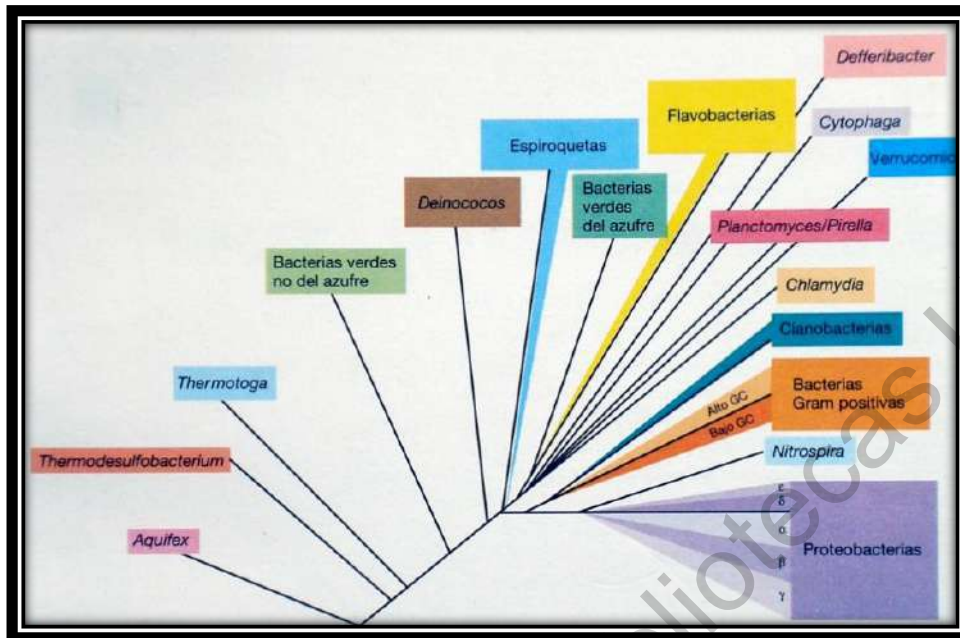


Figura 3. Taxonomía básica de las Eubacterias (Prescott,2002).

Cuadro 1. Comparación de los componentes celulares de cada dominio (Prescott,2002).

Dominios	BACTERIA	ARCHEA	EUCARIA
Estructura celular	Procariota	Procariota	Eucariota
Cromosomas	Uno circular y desnudo	Uno circular y una cromatina	Múltiples lineales con cromatina
Composición de la pared celular	Peptidoglicano	Glicopéptidos, proteínas o glúcidos	Glúcidos (celulosa, quitina)
Enlace peptídico de la membrana	Ester	Éter	Ester
Ácidos grasos de la membrana	Lineales	Ramificados	Lineales
Flagelo	Bacteriano	Arqueano	Eucariota
Ribosoma	70S	70S	80S, pero 70S(o 55S) en mitocondrias y cloroplastos
Intrones	No	En los genes del ARNt	En la mayoría de genes
Operones	Si	Si	No
Plásmidos	Si	Si	Raros
Cromatina con nucleosomas e histonas	No	Si	Si
Iniciador de ARNt	Formil-metionina	Metionina	Metionina
ARN polimerasa	Una	Varias	Varias
Subunidades de ARNP	4-5	8-12	12-14
Estreptomycin y cloranfenicol	Sensible	Resistente	Resistente
Toxina diftérica	Resistente	Sensible	Sensible

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) análisis de la secuencia (Figura 5).

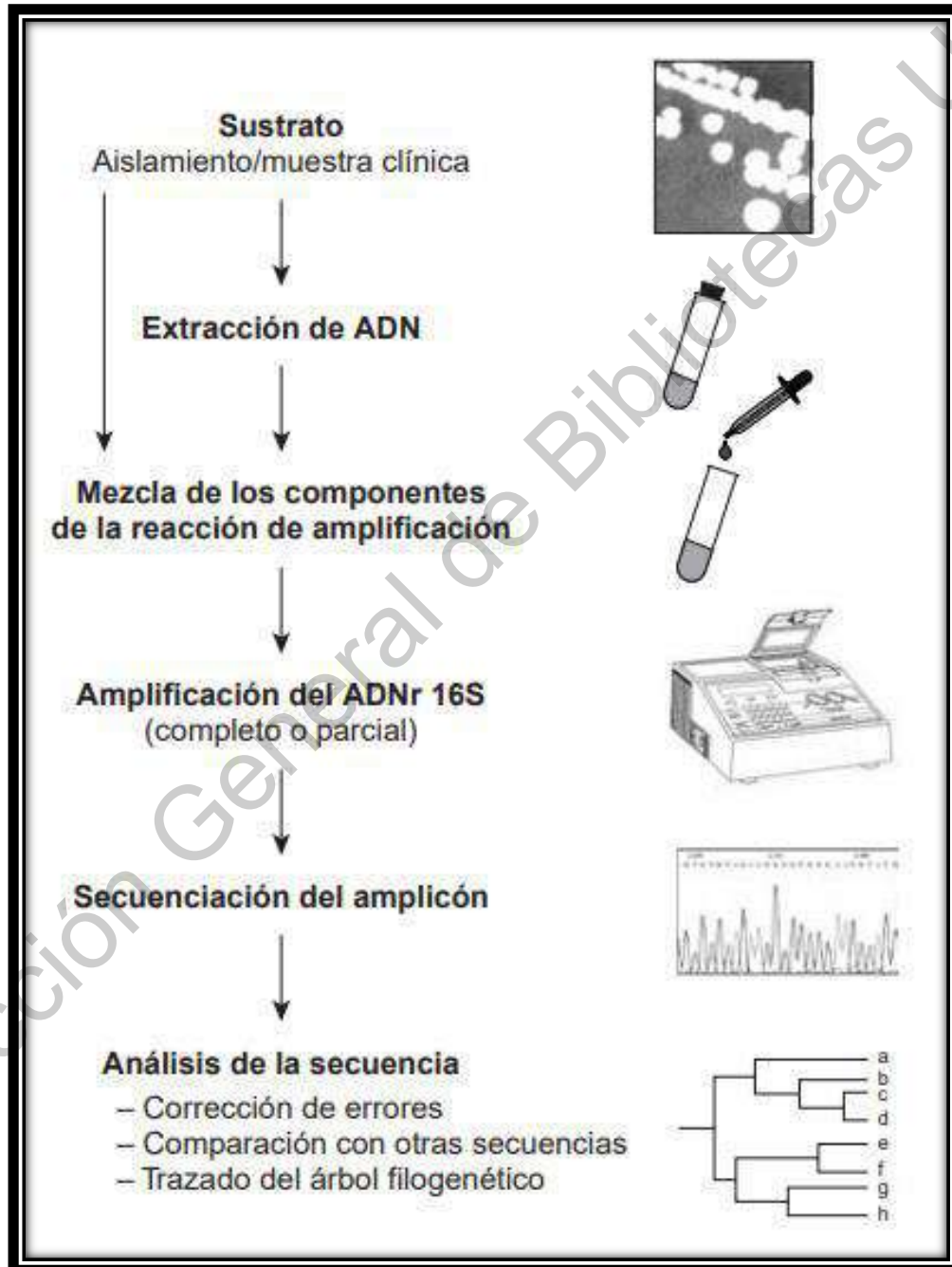


Figura 4. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S (Rodicio,2004).

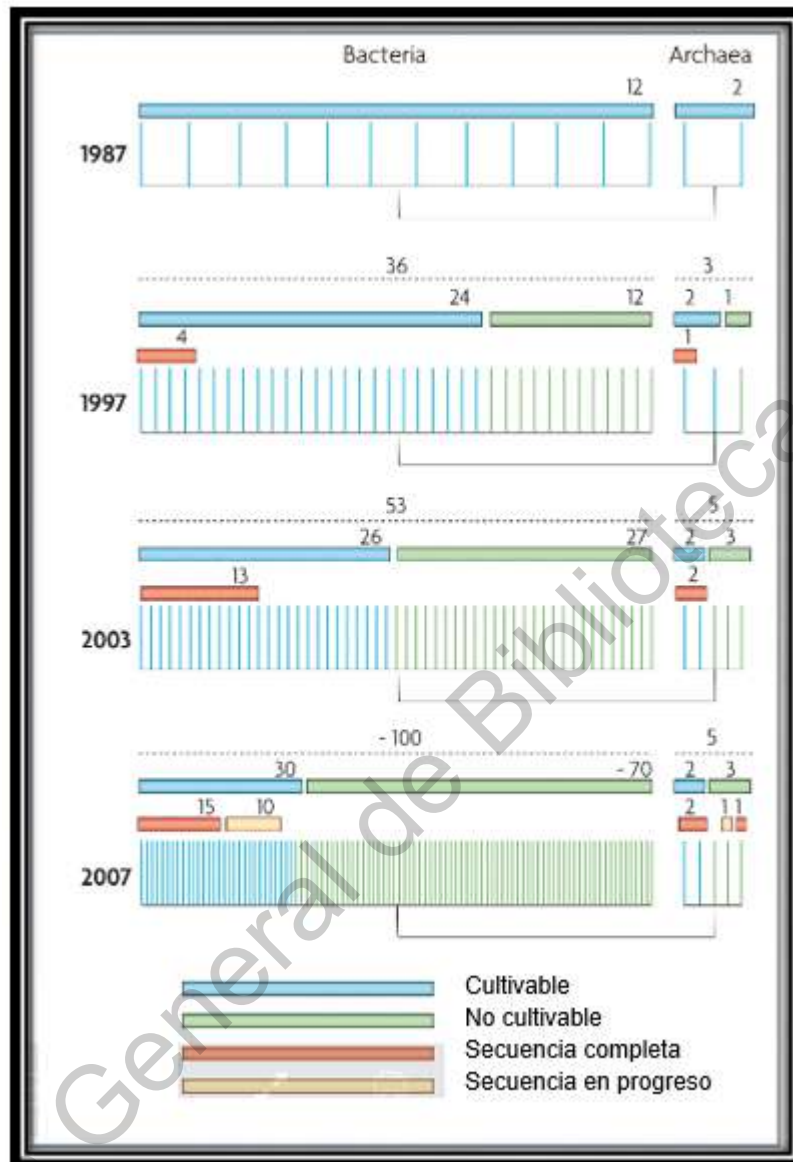


Figura 5. Números de filios y secuencias genómicas entre Bacteria y *Archea* identificadas desde 1987. Cada árbol filogenético muestra el número de filios conocidos, en cada uno comparten una secuencia genómica del ARNr 16S <85% con otros grupos, también se indica el año en que estos fueron reconocidos. Cada filo es representado por una línea vertical, cuyo color indica si alguno de sus miembros ha sido cultivado (azul) o no (verde). Las barras de color horizontal abarcan filios para los cuales al menos una secuencia genómica está completa (rojo) o en progreso (amarillo). Los números encima de cada línea indican el número de filios que abarcan (Liolios, 2007).

3.1.1 Sistema de nominación de bacterias

En la actualidad usamos el sistema de nomenclatura del creador de la taxonomía el botánico sueco Carl von Linneo, un sistema binomial. Este sistema está formado por 2 términos. El primero se refiere al género y el segundo a la especie. Se escribe en cursiva o se subraya y son palabras que vienen del latín y griego (Figura 6). Ejemplos: *Bacillus luteus*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*.

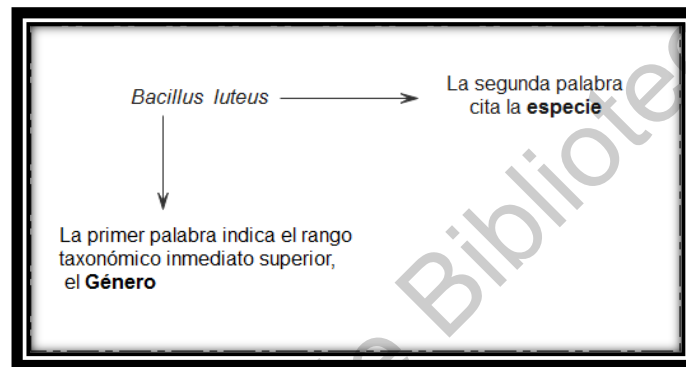


Figura 6. Sistema de nomenclatura binominal para la taxonomía bacteriana. Siguiendo la forma de nombrar primero el Género seguido de la especie, ambos términos en cursivas, y generalmente son palabras que vienen del latín o del griego.

La regla para pronunciar nombres científicos en español se basa en el uso del latín, y al ser una lengua muerta es inmutable. El latín usado es el de la iglesia cristiana preservando desde la antigüedad el cual es el latín bajo, cuyas reglas son las siguientes:

C = K	J = I	Ph = F
V = U	Z = Ds	Th = θ
Ch = K	LL = larga	
X = Cs, gS	G = suave	

Es válido usar el latín culto, pero no es común. Debe tomarse en cuenta el origen de la palabra, cuando el origen es obviamente griego debe usarse esta pronunciación si se trata de una latinización es correcto primero usar la pronunciación original.

3.2 Arquitectura de la célula microbiana

Las diferentes estructuras bacterianas las podemos dividir, según sean constantes en las células o no, en estructuras permanentes o variables (Figura 7). Dentro de las primeras se destaca: la pared celular, la membrana celular, los ribosomas y el material genético (Figura 8). Las estructuras variables son: los flagelos, las fimbrias o pilis, la cápsula y, además, podemos clasificar las estructuras bacterianas en citoplasmáticas y externas o de la envoltura celular (Figura 9). Dentro de las citoplasmáticas destacamos el material genético, los ribosomas y los cuerpos de inclusión. La envoltura celular engloba la membrana plasmática, la pared celular que la recubre, la cápsula y los apéndices como fimbrias o pilis y flagelos (Figuras 10,11,12,13, Cuadros 2 y 3). El microorganismo Gram Negativo *Escherichia coli* ha sido usado como paradigma (Figura 8).

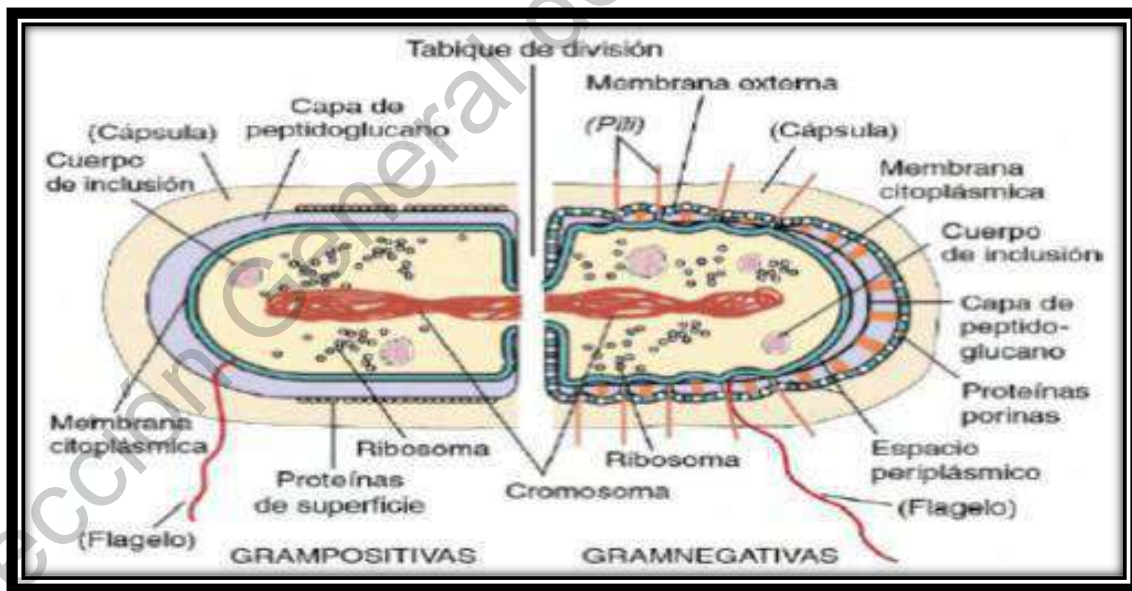


Figura 7. Diagrama de la pared bacteriana. Gram positiva a la derecha y Gram negativa a la izquierda (Prescott,2002).

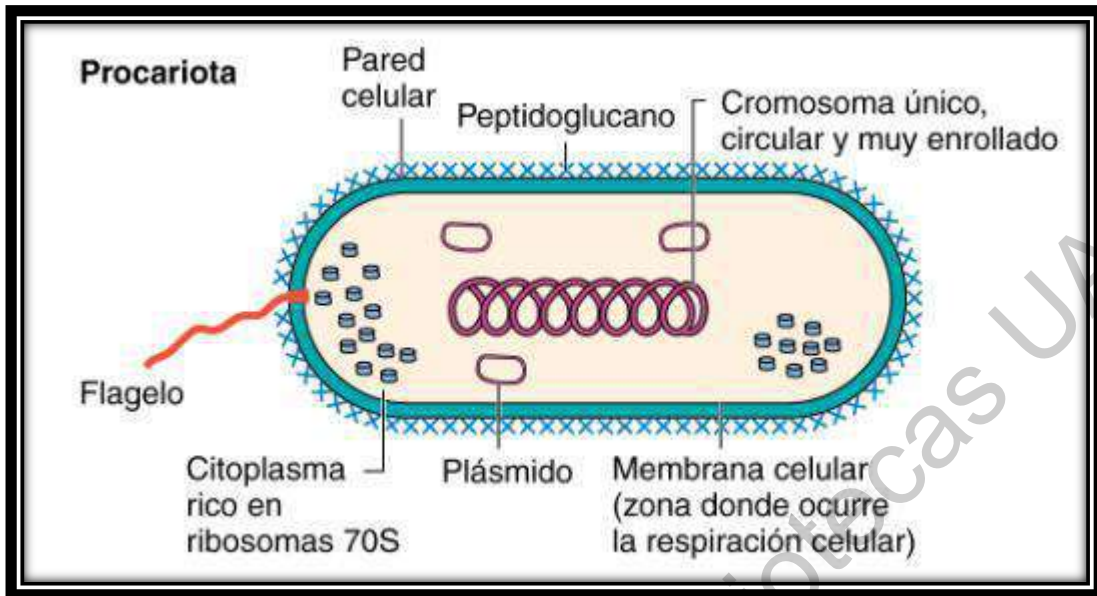


Figura 8. Diagrama de una célula bacteriana "típica" (*Escherichia coli*). Las porciones de la célula se amplían para mostrar más detalles (Moat,2002).

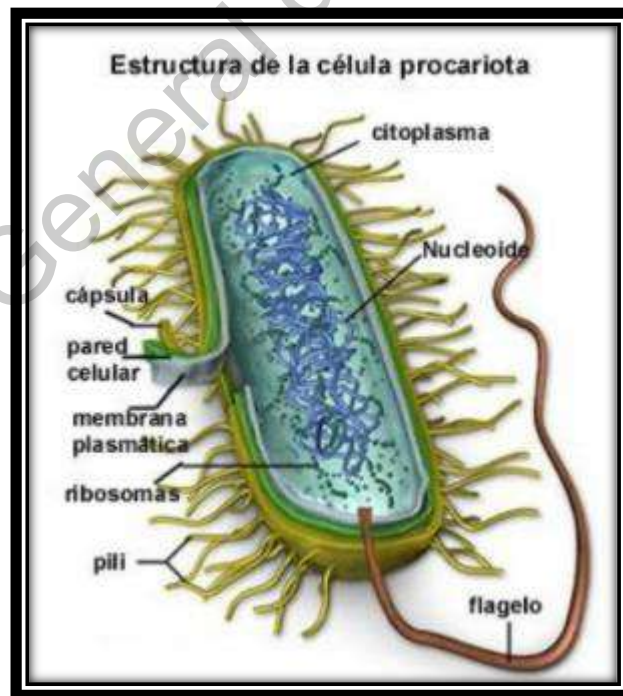


Figura 9. Composición macromolecular del interior de una bacteria. Esta figura se basa en los datos del cuadro 2 (White,2007).

Cuadro 2. Composición macromolecular del interior de una bacteria (White,2007).

Macromolécula	Porcentaje del peso total seco	Peso por célula (10^{15} x peso, gramos)	Peso Molecular	Número de moléculas por célula	Diferentes familias de moléculas
Proteína	55.0	115.0	4.0×10^4	2,360,000.0	1, 050
ARN	20.5	59.0			
23S ARNr		31.0	1.0×10^6	18,700.0	1
16S ARNr		16.0	5.0×10^5	18,700.0	1
5S ARNr		1.0	3.9×10^4	18,700.0	1
Transferencia		8.6	2.5×10^4	205,000.0	60
Mensajero		2.4	1.0×10^6	1,380.0	400
ADN	3.1	9.0	2.5×10^{11}	2.13	1
Lípidos	9.1	26.0	705	220,000,00.0	4 _b
Lipopolisacáridos	3.4	10.0	4346	1,200,000.0	1
Mureína	2.5	7.0	(904) _n	1.0	1
Glucógeno	2.5	7.0	1.0×10^6	4360.0	1
Macromoléculas totales	96.1	273.0			
Moléculas solubles bloques de construcción metabolitos, vitaminas		7.0 1.0			
Iones inorgánicos	1.0	3.0			
Total peso seco	100.0	284.0			

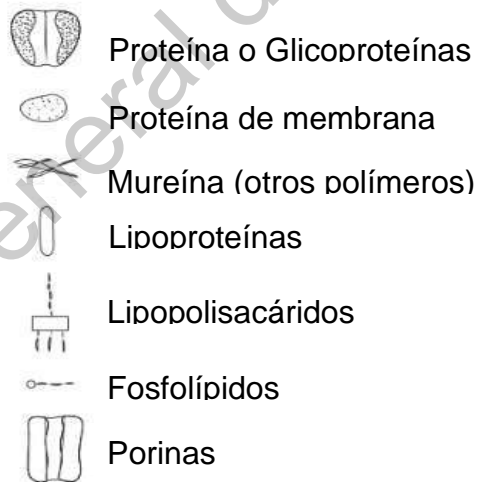
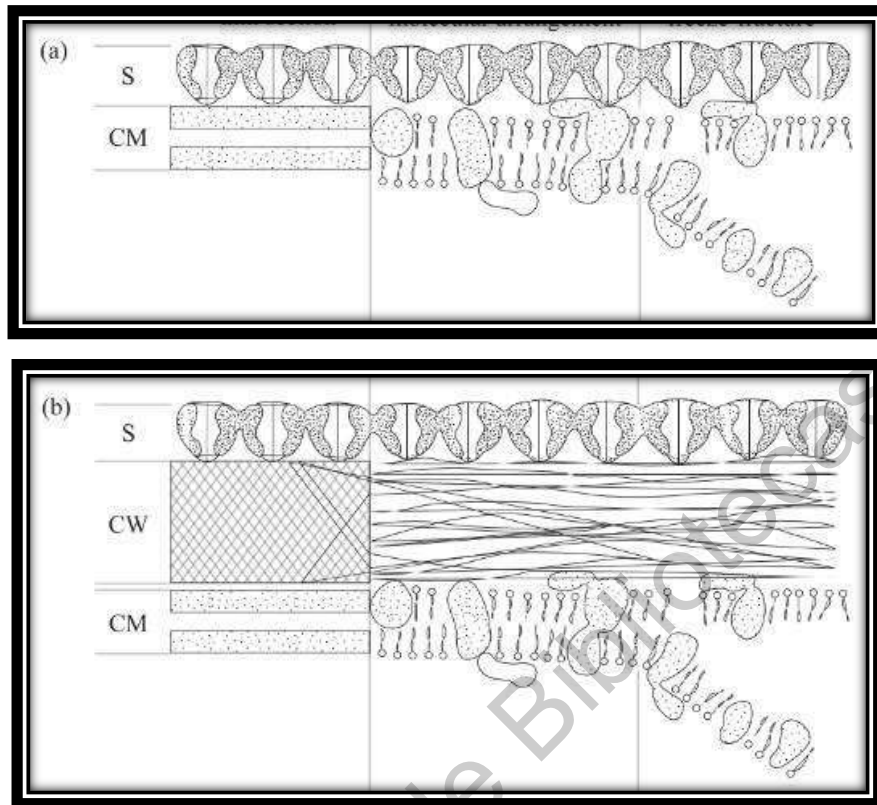


Figura 10. Estructura celular de la superficie de procariontes. a) *Archeas* b) Bacteria Gram-Positiva, c) Bacteria Gram-Negativa. S- Superficie, CM-Membrana Citoplasmática, CW-Pared Celular, OM-Membrana Externa, PG-Peptidoglicanos (Kim, 2008).

Cuadro 3. Componentes de la membrana exterior y sus funciones en *Escherichiacoli* (Kim,2008).

Componente	Función
Fosfolípidos	Estructura de la membrana plasmática.
Lipopolisacárido	Membrana externa, hidrofílico provee una barrera natural contra los compuestos hidrofóbicos. Estabilización de la membrana con la unión a iones como el Mg^{2+}
Lipoproteínas	La parte lipídica esta incrustada en la región hidrofóbica de la membrana celular externa y la parte de carbohidrato está unida covalentemente a la mureína para estabilizar la membrana celular externa.
Proteína A de la membrana externa	Mantiene la estabilidad de la membrana externa, es receptor de aminoácidos y péptidos.
Porina	Tres diferentes porinas, OmpC, OmpF y PhoE , cada una de las cuales consta de tres péptidos, actúan como canales específicos y no específicos para solutos hidrofílicos.
Proteínas receptoras	Para azúcares, aminoácidos y vitaminas.
Otras proteínas	Enzimas como fosfolipasa, proteasa, proteínas de la maquinaria de transporte.

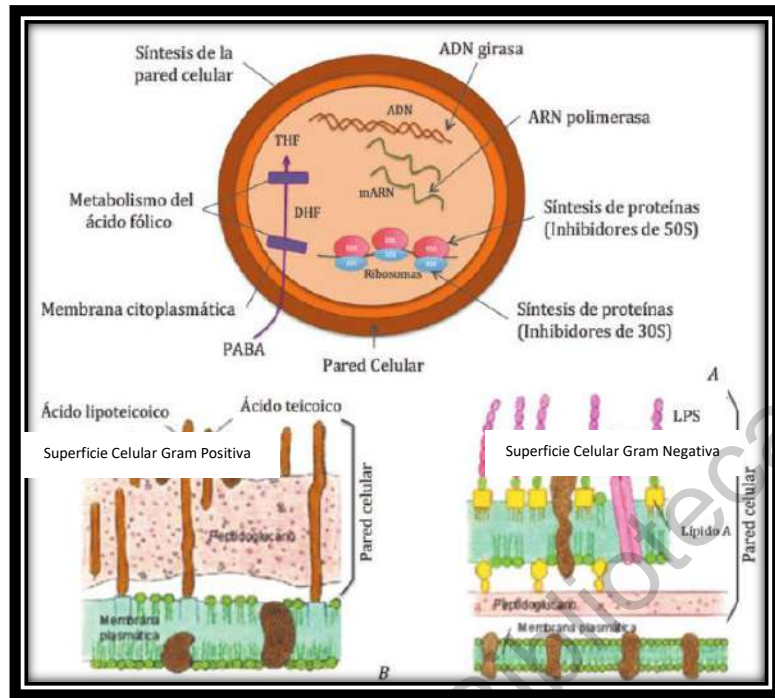


Figura 11. Estructura celular de microorganismos. A. Características químicas, síntesis y metabolismo de una célula bacteriana. B. Pared celular de bacterias Gram (+). C. Pared celular de bacterias Gram (-) (Osorio, 2017).

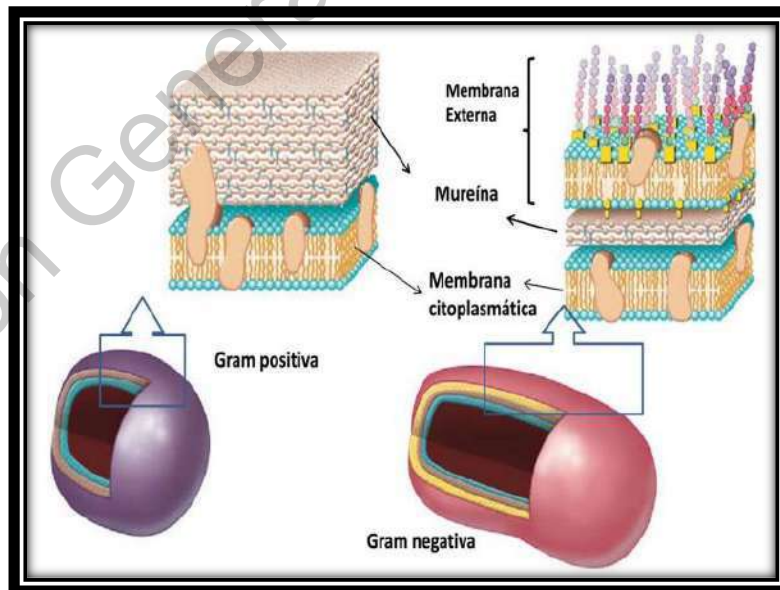


Figura 12. La estructura de envoltura de un microorganismo Gram positivo (izquierda) y un microorganismo Gram negativo (derecha). No se muestran las cápsulas y los

apéndices ni las proteínas de superficie, como la proteína M de los estreptococos (Osorio, 2017).

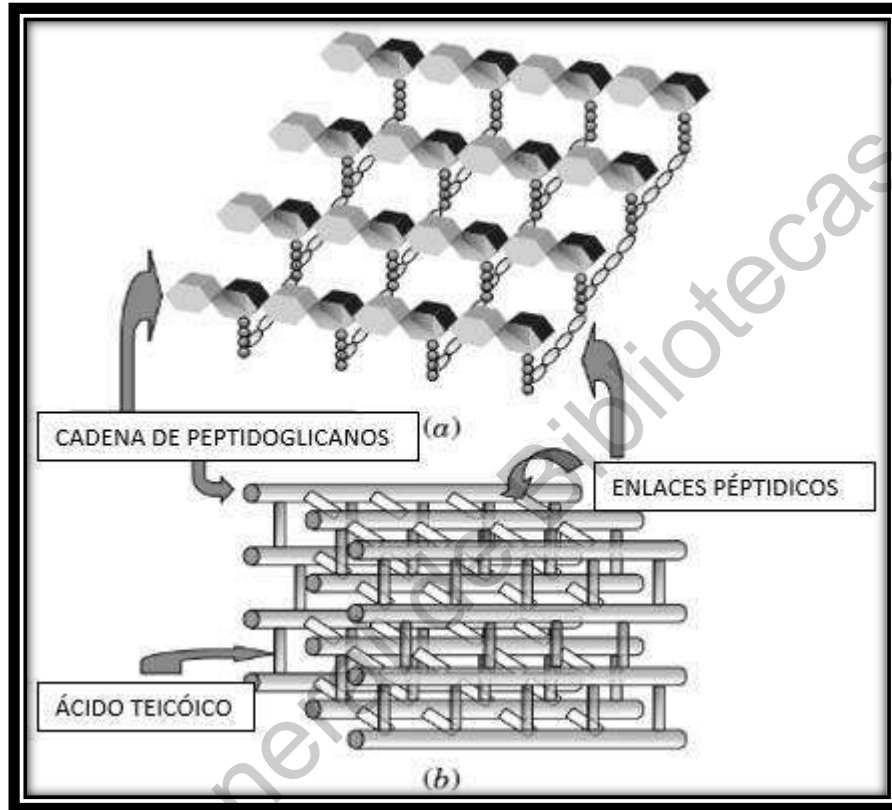


Figura 13. Vista esquemática de los peptidoglicanos bacterianos. (a) Monocapa de peptidoglicanos. Los hexágonos sombreados claramente representan la N-acetilglucosamina, los hexágonos sombreados en oscuro representan el ácido N-acetilmurámico; las esferas puestas verticalmente representan los péptidos de las cadenas laterales, los óvalos horizontales representan los aminoácidos que cruzan entre las cadenas de péptidos. (b) Representación esquemática de las multicapas de peptidoglicanos en la pared celular de Gram Positivos. Las barras largas horizontales representan las cadenas de N-acetilglucosamida y ácido N-acetilmurámico. Las barras cortas horizontales representan los enlaces peptídicos y las barras verticales representan el ácido teicoico (Moat,2008).

3.3 Principios generales de metabolismo microbiano.

El término metabolismo se refiere a la suma de todas las reacciones bioquímicas necesarias para la generación de energía y el uso de energía para sintetizar material célula a partir de pequeñas moléculas en el ambiente (Figura 14).

Por lo tanto, el metabolismo tiene un componente que produce energía llamado catabolismo y un componente biosintético que consume energía llamado anabolismo. Las vías catabólicas que producen energía como ATP se pueden utilizar en reacciones anabólicas para consumir material celular a partir de los nutrientes en el ambiente (Figura 15).

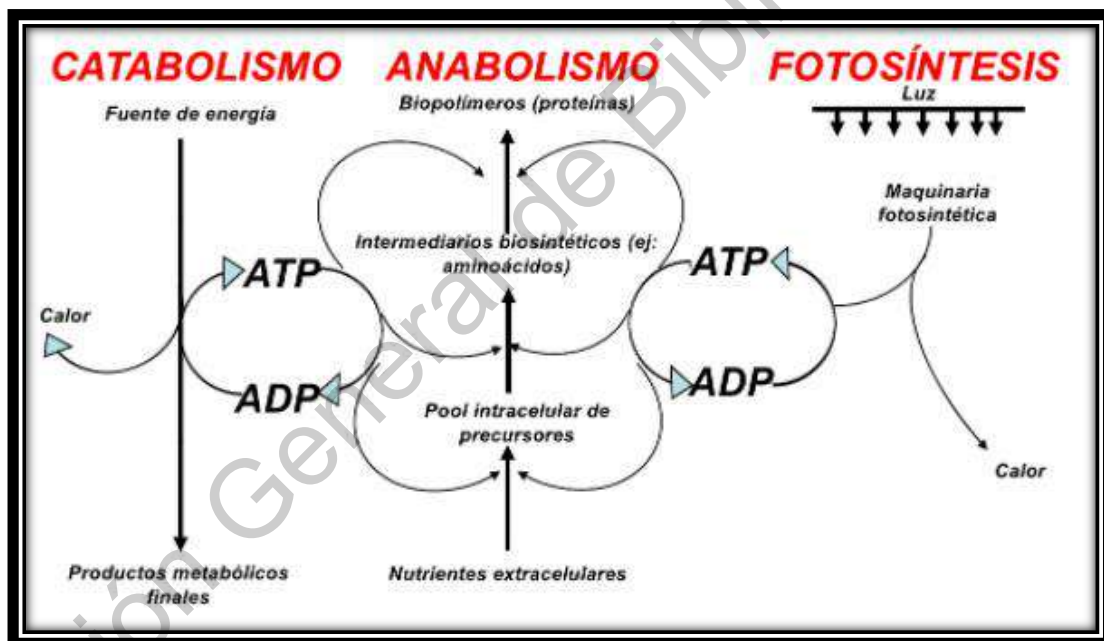


Figura 14. Papel del ATP acoplado el catabolismo y la fotosíntesis a la biosíntesis. La energía en los enlaces fosfato del ATP interviene en diversas etapas del proceso biosintético. Participa de la entrada de nutrientes a la célula, se utiliza para convertir estos nutrientes en metabolitos intermedios de bajo peso molecular (aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, etc.) y además se utiliza en la polimerización de estos intermediarios en biopolímeros que constituyen los componentes principales del material celular (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) (Doelle, 2010).

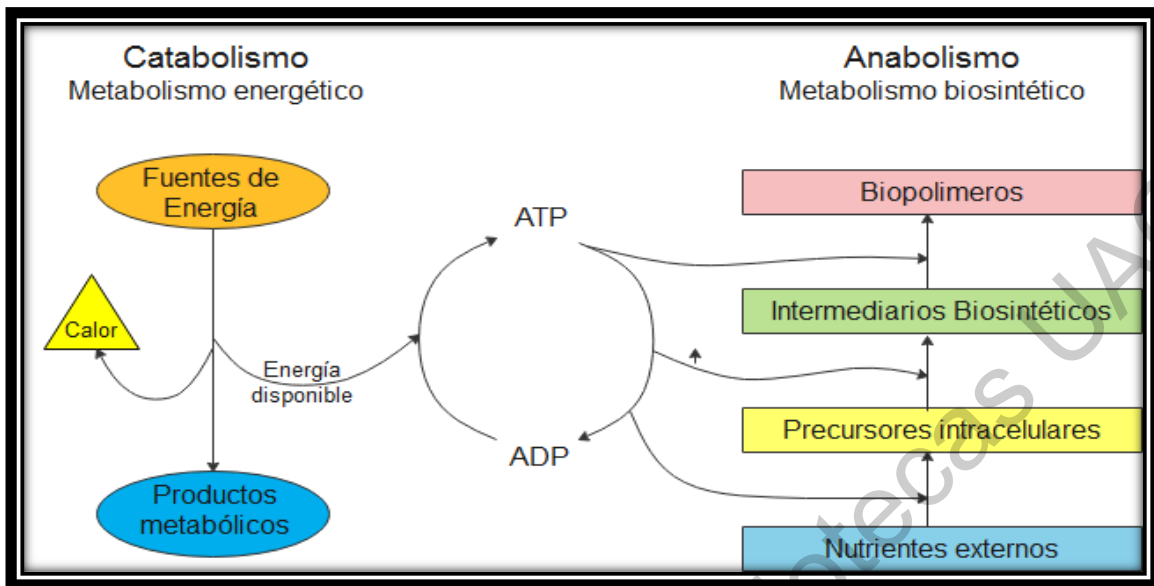


Figura 15. La relación entre catabolismo y anabolismo en la célula. Durante el catabolismo, la energía cambia de una forma a otra, y siguiendo las leyes de la termodinámica, tales transformaciones de energía nunca son completamente eficientes, es decir, se pierde algo de energía en forma de calor. La eficiencia de una secuencia catabólica de reacciones es la cantidad de energía disponible para la célula (para el anabolismo) dividida por la cantidad total de energía liberada durante las reacciones (Kenneth, 2008).

El metabolismo tiene tres funciones específicas:

- Obtener energía química del entorno, almacenarla, para utilizar luego en diferentes funciones celulares,
- Convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana,
- Formar y degradar moléculas necesarias para funciones celulares específicas, por ejemplo, movilidad y captación de nutrientes (Figura 16 y 17)

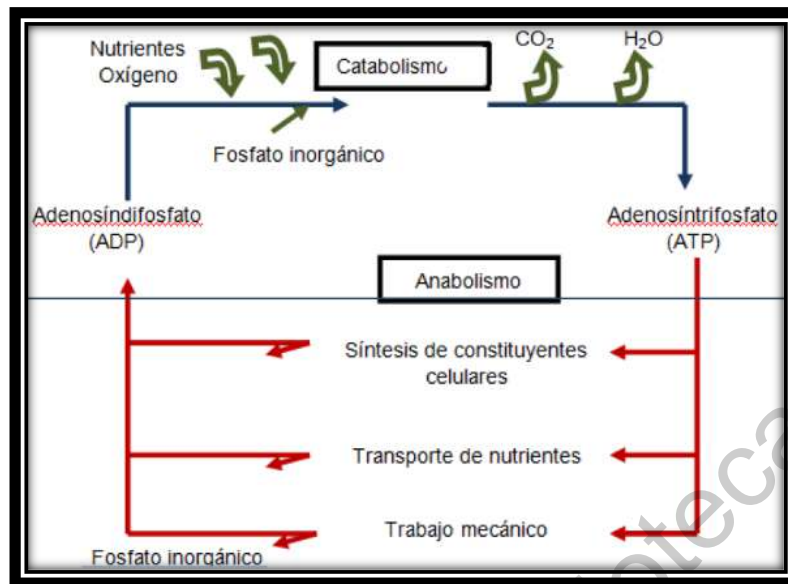


Figura 16. El catabolismo y anabolismo. La energía liberada en las reacciones catabólicas se usa para fosforilar ADP, generando ATP. La energía almacenada en el ATP se utiliza en la mayoría de los trabajos celulares. Por lo tanto, el ATP acopla los procesos productores de energía de la célula a los consumidores de energía (Kenneth, 2008).

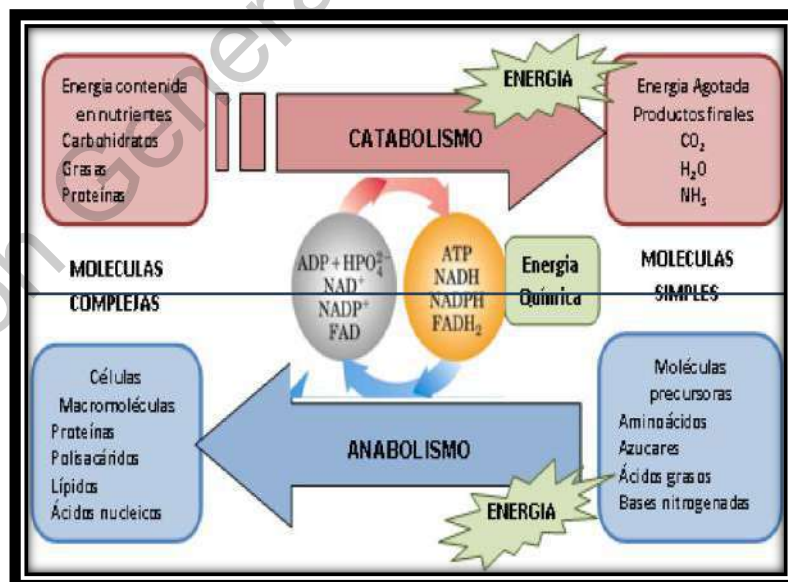


Figura 17. Metabolismo y biosíntesis. La biosíntesis es el proceso por el cual la célula bacteriana sintetiza sus propios componentes, la energía requerida se obtiene del medio que la rodea. (Kenneth, 2008).

3.4 Clasificación de los microorganismos por su metabolismo.

Aunque los organismos eucariontes, principalmente los protistas, presentan una gran diversidad en su morfología, los procariontes no tienen esa distinción. Sin embargo, en función de su metabolismo, los procariontes son mucho más diversos que todos los eucariotas y esta gran diversidad se debe a la diversidad en las vías metabólicas para producir energía y sintetizar metabolitos secundarios.

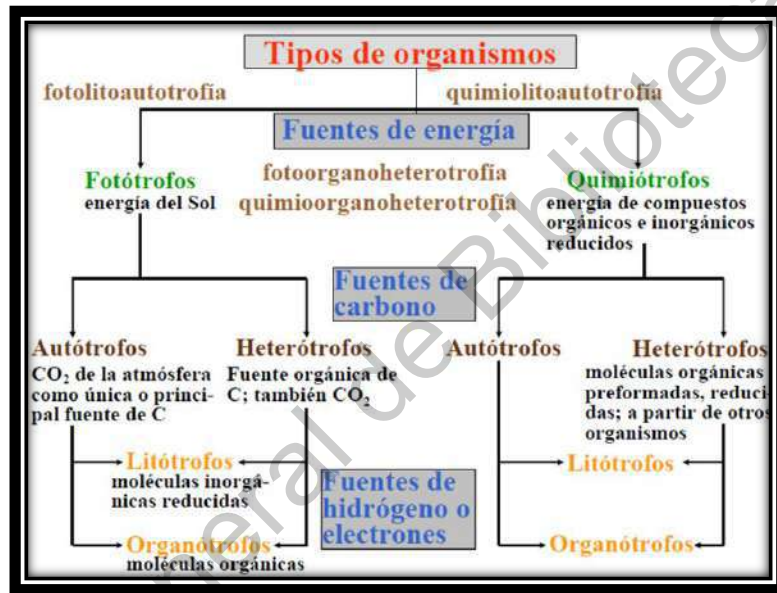


Figura 18. Clasificación de los microorganismos de acuerdo a su fuente de energía (Kenneth, 2008).

Los distintos tipos de metabolismo microbiano se pueden clasificar según tres criterios distintos:

I. Según la fuente de carbono que utilizan

El carbono es el mayor constituyente de la célula bacteriana, por lo tanto, no llama la atención que requiera más carbono que cualquier otro nutriente. Las bacterias se pueden dividir de acuerdo a la forma en la que el organismo obtiene o utiliza el carbono para la construcción de la masa celular:

- Autótrofo. crecen sintetizando sus materiales a partir de sustancias inorgánicas sencillas. El carbono se obtiene del dióxido de carbono (CO₂).
- Heterótrofo. su fuente de carbono es orgánica. El carbono se obtiene de compuestos orgánicos.
- Mixótrofo. son aquellas bacterias con metabolismo energético litótrofos (obtienen energía de compuestos inorgánicos), pero requieren sustancias orgánicas como nutrientes para su metabolismo biosintético. El carbono se obtiene tanto de compuestos orgánicos como fijando el dióxido de carbono.

II. Según el punto de vista biosintético

La forma en la que organismo obtiene los equivalentes reductores para la conservación de energía o en las reacciones biosintéticas:

- Litotrofo. son aquellas que sólo requieren sustancias inorgánicas sencillas Los equivalentes reductores se obtienen de compuestos inorgánicos. (SH₂ SO, NH₃, NO, Fe, etc.) (Cuadro 4).
- Organotrofo. requieren compuestos orgánicos. Los equivalentes reductores se obtienen de compuestos orgánicos. (hidratos de carbono, hidrocarburos, lípidos, proteínas, alcoholes) (Cuadro 5).

Cuadro 4. Grupos fisiológicos de litótrofos (Tortora,2013).

Grupo fisiológico	Fuente de energía	Producto final oxidado	Organismo
Bacteria del hidrógeno	H ₂	H ₂ O	<i>Alcaligenes, Pseudomonas</i>
Metanógenos	H ₂	H ₂ O	<i>Metanobacterium</i>
Carboxidobacteria	CO	CO ₂	<i>Rhodospirillum, Azotobacter</i>
Bacteria nitrificante	NH ₃	NO ₂	<i>Nitrosomas</i>
Bacteria nitrificantes	NO ₂	NO ₃	<i>Nitrobater</i>
Bacterias oxidantes del azufre	H ₂ S o S	SO ₄	<i>Thiobacillus, Sulfolobus</i>
Bacterias del hierro	Fe	Fe	<i>Gallionella, Thiobacillus</i>

III. Según la fuente de energía:

Según la forma en la que el organismo obtiene la energía para vivir y crecer:

- Quimiotrofo. La energía se obtiene de compuestos químicos externos.
- Fototrofo. La energía se obtiene de la luz (Figura 19).

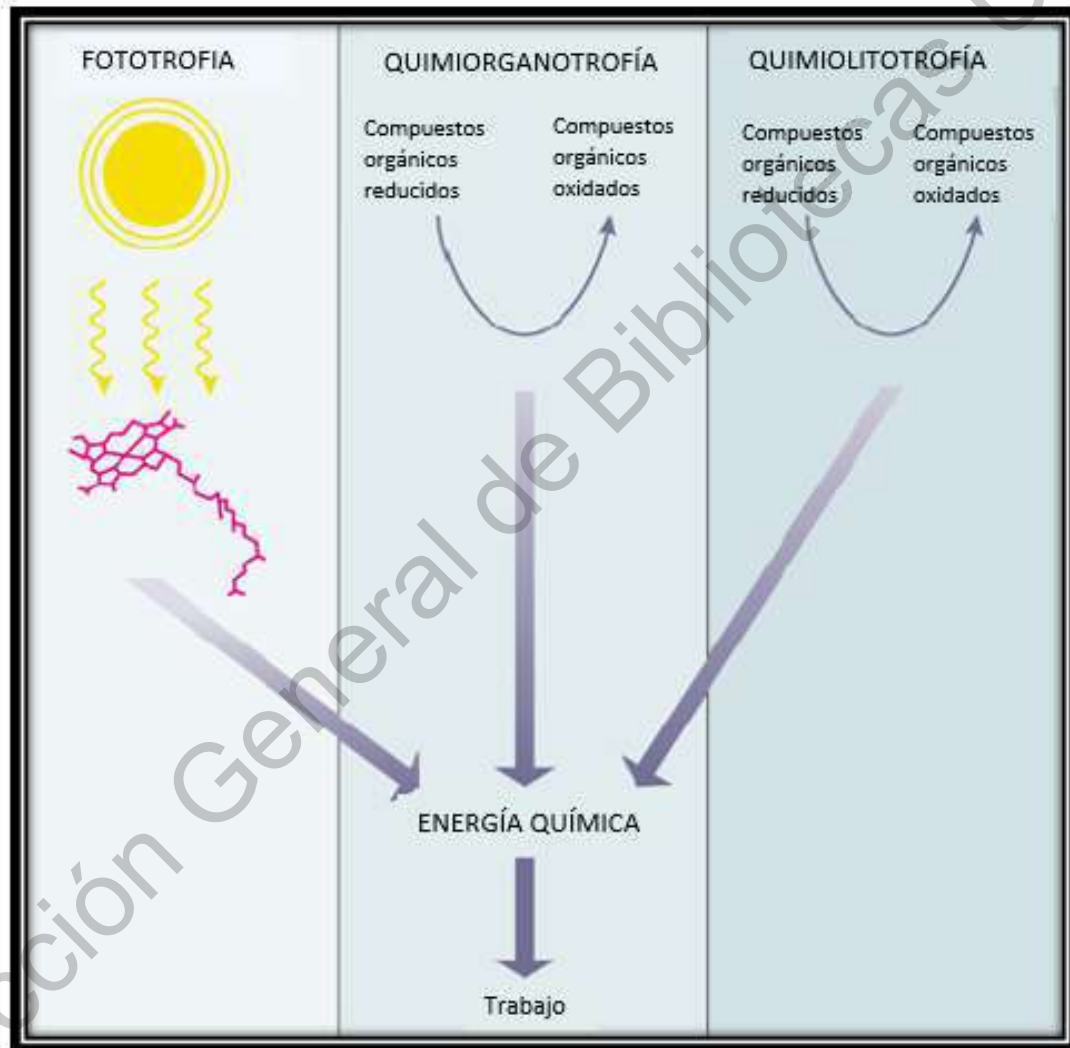


Figura 19. Fuentes de energía para los microorganismos: fototrofia, quimiorganotrofia y quimiolitotrofia.

Cuadro 5. Requerimientos nutricionales de algunos microorganismos (Corzo, 2020).

Tipo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Ejemplos
Fotoautotrofas	Luz	CO ₂	Algas y cianobacterias
Fotoheterotrofas	Luz	Compuestos orgánicos	Algas y bacterias fotosintéticas
Quimioautotrofas o Litotrofas	Química	Compuesto inorgánicos: H ₂ , NH ₃ , NO ₂ , H ₂ S, CO ₂	Pocas bacterias
Quimioheterotrofas o Heterotrofas	Química	Compuesto orgánicos: glucosa	La mayoría de bacterias

4. TRANSPORTE Y BIOENERGÉTICA

4.1 Transporte celular

Las moléculas pueden ser transportadas a través de la membrana citoplasmática por tres diferentes mecanismos (Figura 20):

- (1) transporte pasivo o difusión pasiva
- (2) transporte facilitado o difusión facilitada
- (3) transporte activo o difusión activa.

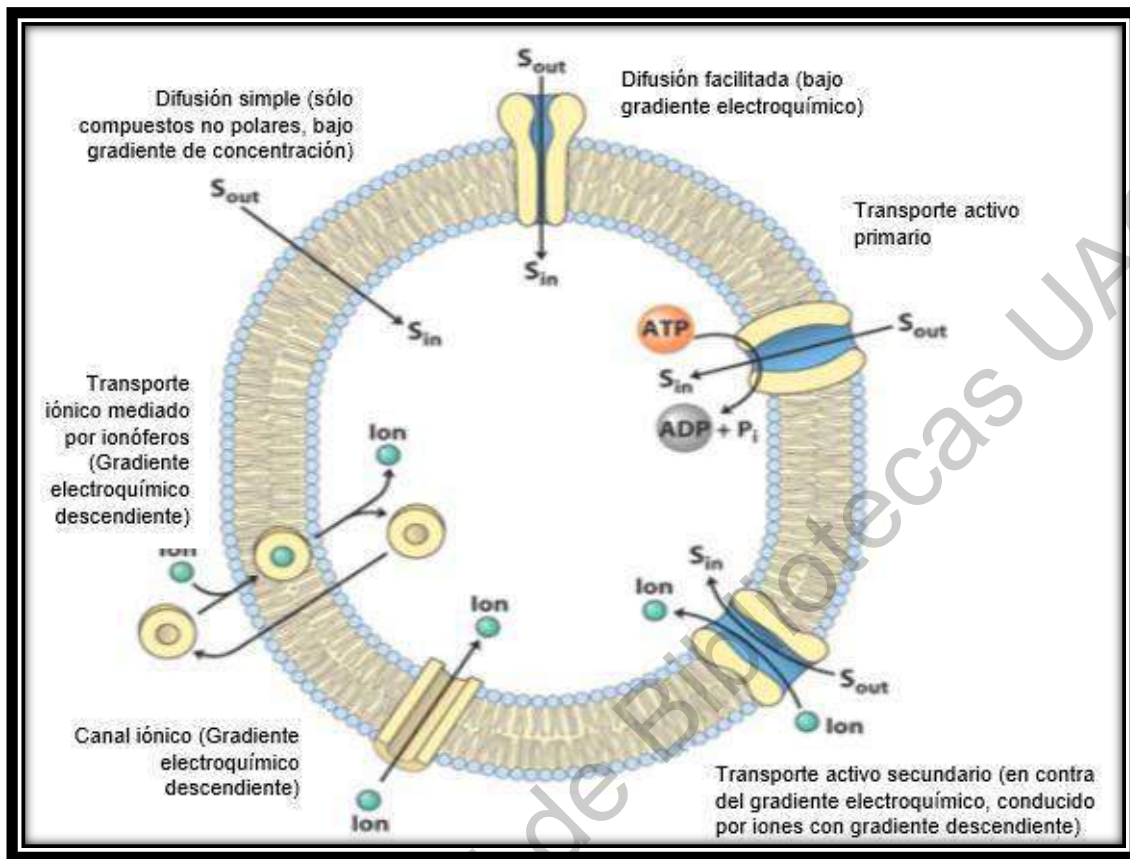


Figura 20. Esquema general donde se muestran las principales diferencias en los tipos de transporte a través de la célula (Lehninger, 2005).

Los dos primeros mecanismos son procesos pasivos que, en principio no requieren suministro de energía libre de Gibbs para que ocurra. El transporte facilitado es gratis y las moléculas son transportadas por un gradiente de concentración.

La diferencia entre los dos mecanismos es que el transporte facilitado tiene un transportador específico o una proteína transmembranal que está involucrada en el transporte, mientras que la difusión libre es transporte molecular, impulsado por una diferencia de potenciales químicos.

El tercer mecanismo permite que las especies sean transportadas en contra de un gradiente de concentración por un proceso activo que requiere la entrada de energía libre de Gibbs.

El transporte activo se asemeja a la difusión facilitada en que las proteínas específicas localizadas en la membrana, o permeasas, regulan el proceso.

4.1.1 Transporte pasivo

El transporte de un compuesto por difusión pasiva (Figura 21) a través de una membrana lipídica implica tres pasos:

- (1) transferencia del compuesto del medio extracelular a la membrana;
- (2) difusión del compuesto a través de la bicapa lipídica y
- (3) transferencia del compuesto de la membrana al citosol.

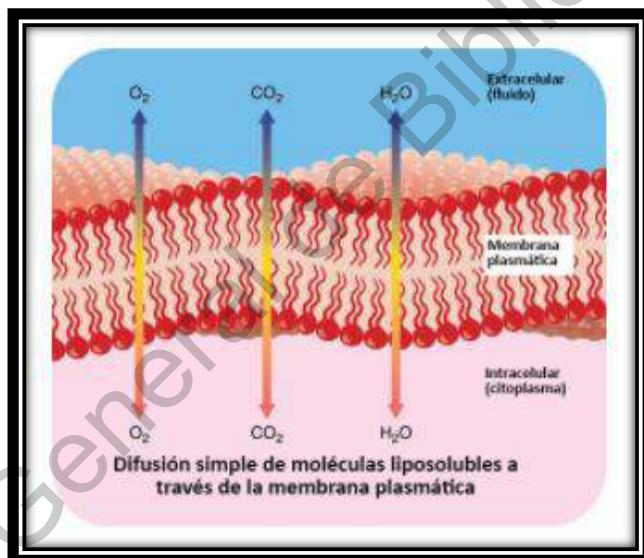


Figura 21. Difusión simple. Las moléculas que son pequeñas y sin carga pueden esparcirse a través de la membrana celular. Simplemente fluyen a través de la membrana celular. La difusión simple no requiere energía o necesita de asistencia de una proteína de transporte (Kennet,2008).

4.1.2 Transporte facilitado

Muchos compuestos se transportan a velocidades extremadamente lentas por difusión libre, debido a que es muy baja solubilidad en la membrana plasmática.

El transporte de tales compuestos puede mejorarse significativamente mediante la mediación del portador de moléculas incrustadas en la membrana citoplasmática (Figura 22).

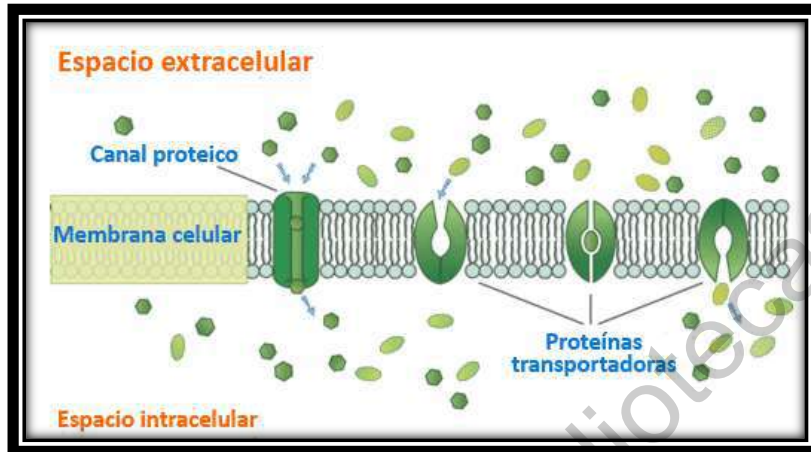


Figura 22. Difusión facilitada. Los canales proteicos proveen un canal abierto o pasadizo a través de la membrana celular para que las moléculas se muevan. Muchos canales proteicos permiten la difusión de iones (Kenneth, 2008).

Este transporte ocurre pasivamente, es decir, no requiere gasto de energía, y se conoce como difusión facilitada. Se utiliza para el transporte de muchos compuestos en eucariotas (Figura 23 y 24), mientras que el transporte de glicerol en *Escherichia coli* y el transporte de glucosa en *Zymomonas mobilis* y *Streptococcus bovis* parecen ser los únicos ejemplos de la difusión facilitada en procariontes (Moat, 2002).

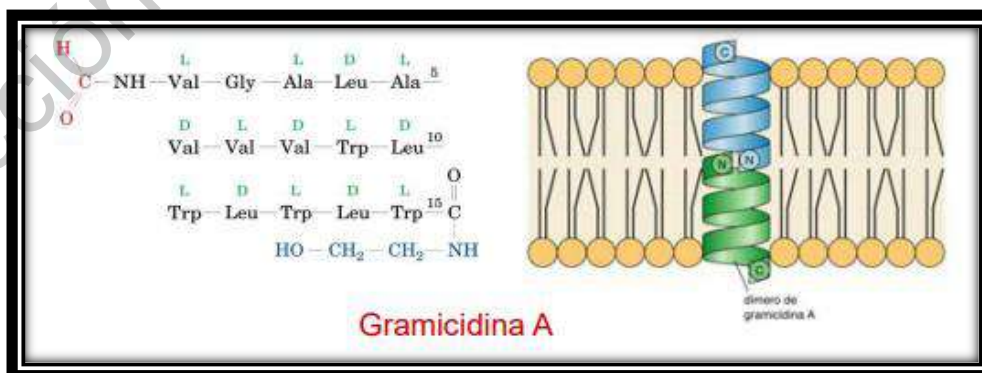


Figura 23. Gramicidina A modelo de un ionóforo formador de canales. Dos moléculas de este péptido con 15 residuos de aminoácidos forman un poro a través de la

membrana por medio de la interacción hidrofóbica entre las cadenas laterales de los aminoácidos y el lípido de la membrana. Los solutos pueden moverse a través del poro (Kim, 2002).

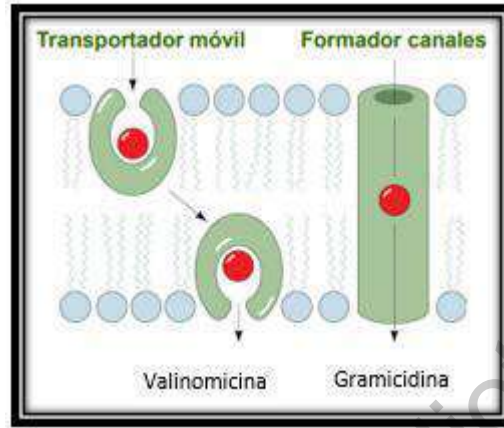


Figura 24. El acarreador Valinomicina y la formación del canal Gramicidina (Lehninger,2005).

La difusión facilitada se asemeja a la difusión libre, ya que el transporte ocurre solo en la dirección de un gradiente de concentración. Sin embargo, el compuesto puede entrar a través de la membrana solo si hay una molécula transportadora libre y disponible, siguiendo una cinética de Michaelis-Menten (Figura 25 y 26).

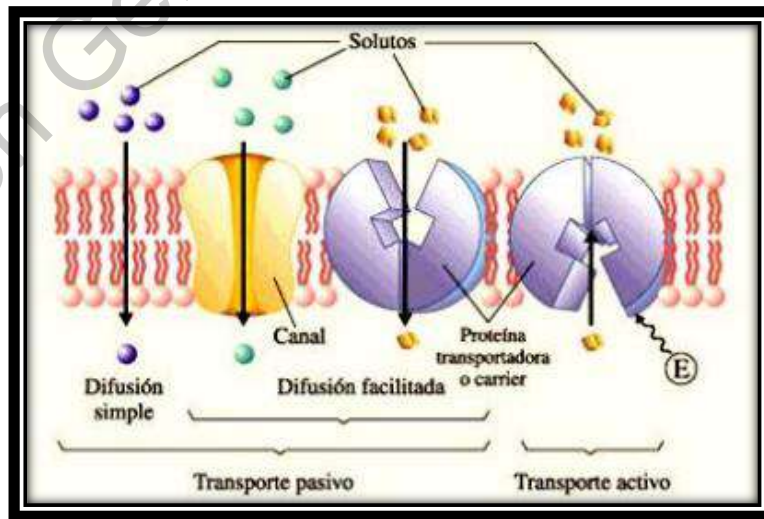


Figura 25. Difusión pasiva a través de porinas. Los azúcares y alcoholes se difunden pasivamente al periplasma a través de las porinas específicas LamB y PhoE, donde

pueden secuestrarlos proteínas de unión periplasmicas (el MalE, PiBP), y llevadas al citoplasma por los Transportadores ABC (MalFGK, PstABC) o por canales (GlpF). Los iones penetran en y hacia fuera la célula por porinas inespecíficas como OmpF y por canales iónicos como CIC y por la proteína mecanosensitiva MscL. Sideróforos atrapadores de hierro (por ejemplo, ferricromo) son importados por receptores externos de la membrana como FhuA, una proteína periplásmica de unión (FhuD) y un transportador de ABC(FhuBC). En este caso la energía que se requiere para activar el transporte de la membrana externa, proviene de un gradiente de protones a través de la membrana citoplasmática, por el complejo TonB-ExbBD. La secreción de toxinas como hemolisina y secreción de sustancias tóxicas como antibióticos es mediada por transportadores dependientes de energía a nivel de la membrana citoplasmática, y por proteínas que forman un poro en el periplasma y la membrana externa, como TolC. Los barriles de la membrana externa apoyan en funciones diversas incluyendo el anclaje de la membrana externa al peptidoglicano (OmpA), la adherencia a células receptoras (OpcA, que une a la heparina sobre la superficie de células epiteliales, y OmpX, que puede asociar con proteínas de células hospedadoras) y la actividad enzimática (las lipasas OMPLA y PagP, que conservan la composición de lípido externo, y la peptidasa OmpT). (Faraldo-Gómez,2004)

4.1.3 Transporte activo

El transporte activo se asemeja al transporte facilitado porque requiere proteínas localizadas específicamente en la membrana, llamadas permeasas, que median el proceso de difusión (Figura 27). A diferencia del transporte facilitado, el transporte activo puede ocurrir en contra de un gradiente de concentración y por lo tanto es un proceso que consume energía libre de Gibbs.

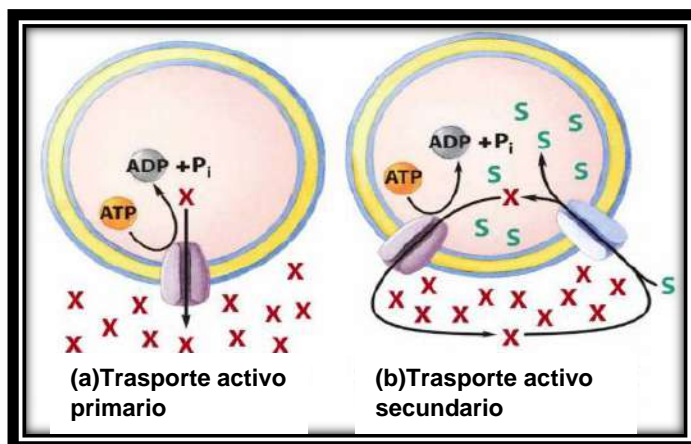


Figura 26. Esquema del transporte activo primario y el transporte activo secundario. La generación de energía en el último caso contrarresta el consumo de energía libre, para impulsar el proceso de transporte activo. Finalmente, un tipo especial de transporte activo llamado Translocación de grupos se caracteriza por que la molécula experimenta un cambio en la composición química, puede ser adición o sustitución de grupos funcionales (González,2004).

La energía libre de Gibbs que se requiere para el proceso de transporte puede ser proporcionada por un fosfato de alta energía, por ejemplo, un ATP (transporte activo primario) (Figura 28). Alternativamente, el proceso de transporte se puede acoplar a otro proceso de transporte con un gradiente de concentración cuesta abajo (transporte activo secundario) (Figura 29).

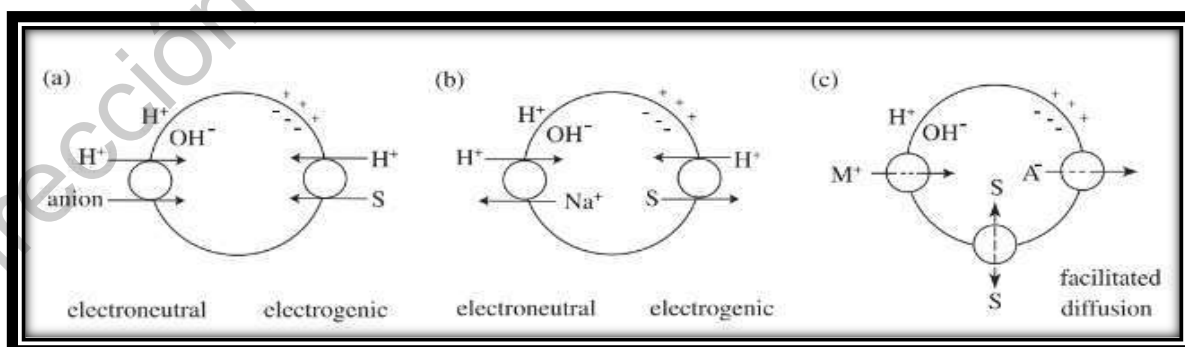


Figura 27. Transporte activo dependiente del gradiente electroquímico Algunos solutos se mueven a través de la membrana junto con los protones, ambos en la

misma dirección a) Simporte, mientras que otros se mueven en dirección opuesta b) Antiporte, algunos iones cruzan la membrana a lo largo del gradiente electroquímico c) Uniporte. El transporte que involucra el potencial de membrana es llamado transporte electrogénico. Cuando los aniones con una carga total negativa de n son simportados con m protones el transporte se convierte en electroneutral, en el caso de $n=m$ y electrogénico en el caso de $n \neq m$. En antiporte cuando los cationes de una carga total positiva de n son expulsados con m protones se convierte en electroneutral en el caso de $n=m$ y electrogénica en el caso de $n \neq m$ (Dawes, 1986).

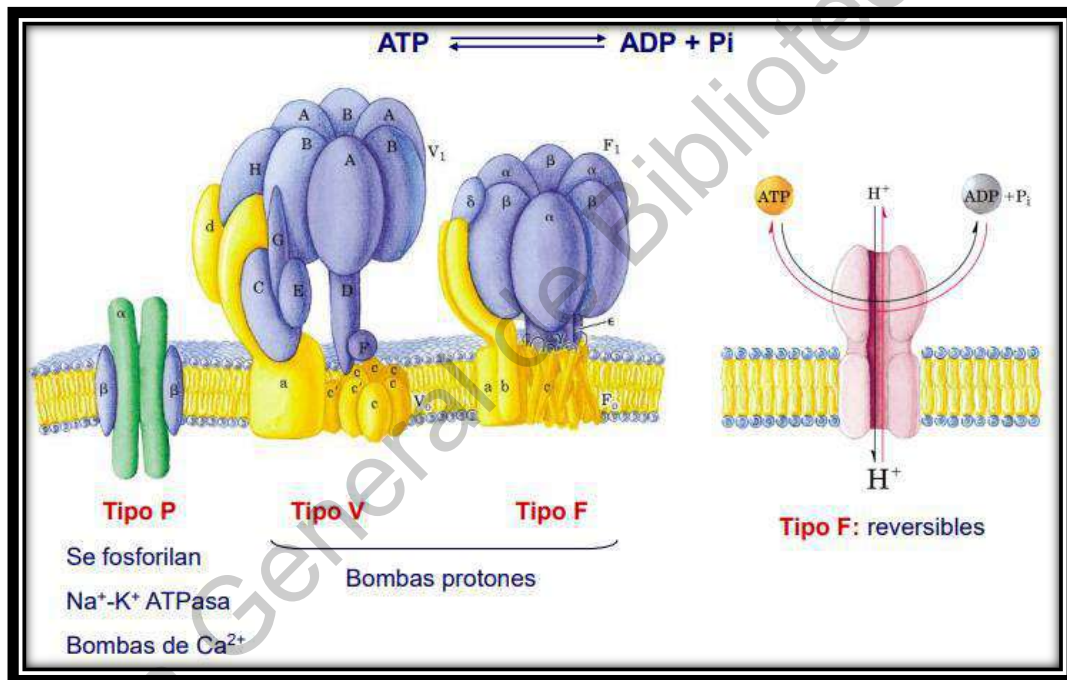


Figura 28. Transporte primario. Es producido por un evento metabólico productor de energía: ATP, energía luminosa o reacciones de oxidación-reducción (Lehninger, 2005).

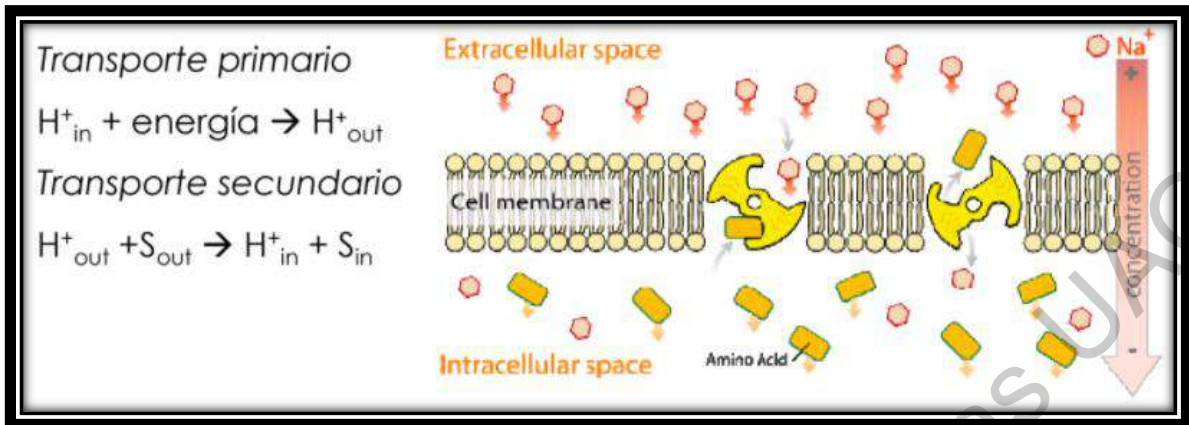


Figura 29. Transporte secundario. Es guiado por gradientes electroquímicos y está acoplado al transporte primario (Lehninger, 2005).

Se consideran como transporte secundario a: Uniporte, Simporte y Antiporte (Figura 30, 31 y 32).

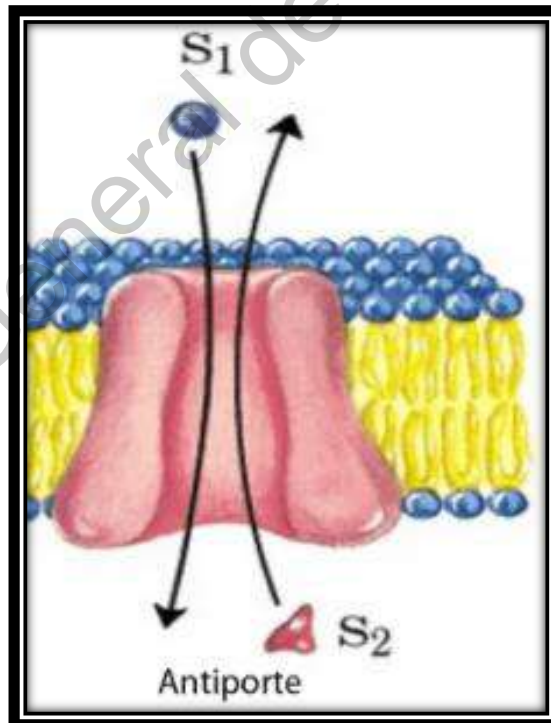


Figura 30. Transporte activo secundario: Antiporte. Dos moléculas fluyen simultáneamente por el mismo transportador, pero en direcciones opuestas, formando un gradiente de concentración (Doelle, 2010).

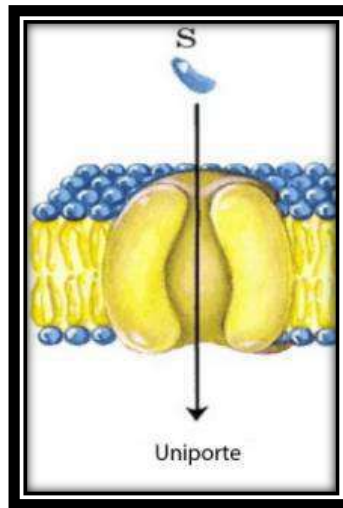


Figura 31. Transporte activo secundario: Uniporte. Es el flujo de iones en una misma dirección por un gradiente electrostático (Doelle, 2010).

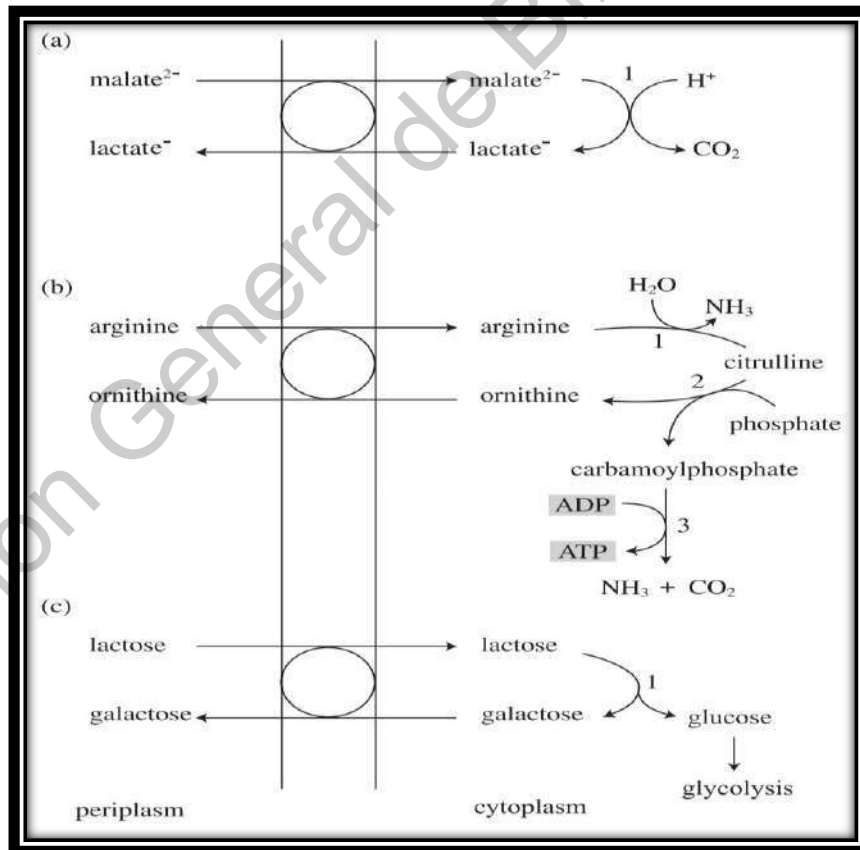


Figura 32. Precursores/productos del sistema antiporte de bacterias ácido lácticas. Algunas bacterias anaerobias fermentativas, incluyendo las bacterias ácido lácticas,

utilizan la energía potencial de una alta concentración de los productos de la fermentación dentro de la célula para importar el precursor. (a) Antiporte malato/lactato 1, Fermentación maloláctica. (b) Antiporte Arginina/ ornitina 1, arginadeiminasa; 2, ornitina carbamoiltransferasa; 3, carbamato cinasa. (c) Antiporte Lactosa/galactosa .1, -galactosidasa (Poolman,1990).

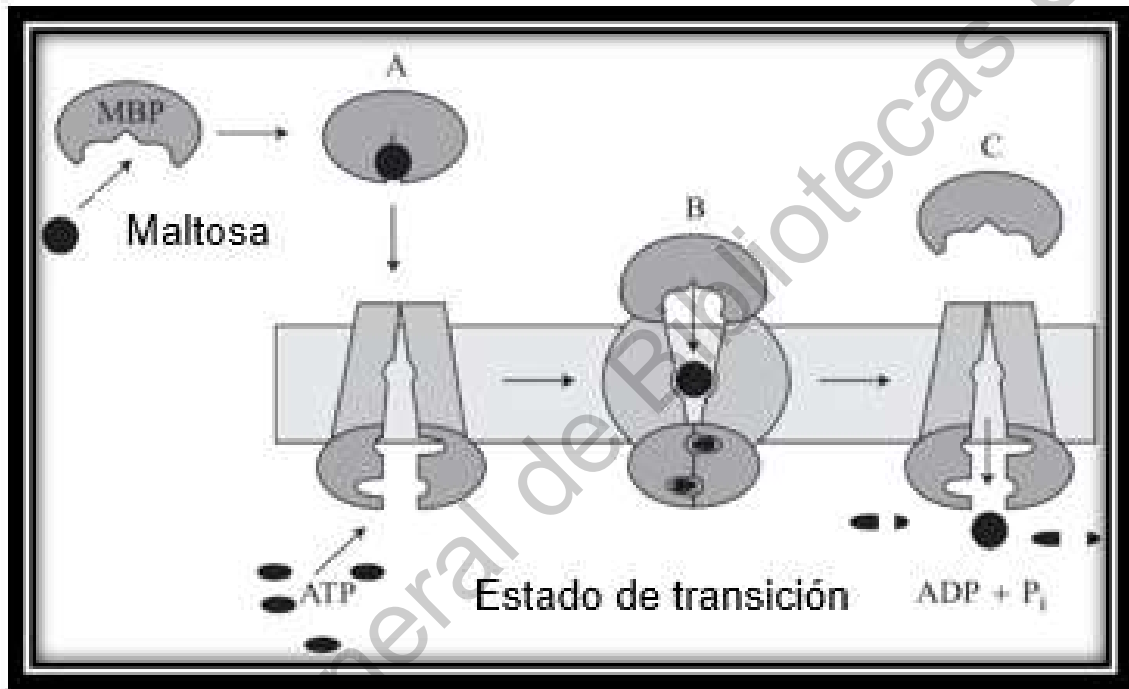


Figura 33. Transporte de maltosa a través de los transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC. (A) Proteína de unión a maltosa (MBP) se une a la maltosa, experimentando un cambio de conformación abierta a cerrada, generando alta afinidad en el sitio de unión azúcar. En la conformación cerrada, MBP se une al casete de unión a ATP de maltosa (ABC) para iniciar el transporte y la hidrólisis de ATP. (B) En el estado de transición para la hidrólisis de ATP, el MBP se une fuertemente a la maltosa ABC para transferir el azúcar. (C) La maltosa es transportada y liberada (Moat, 2008).

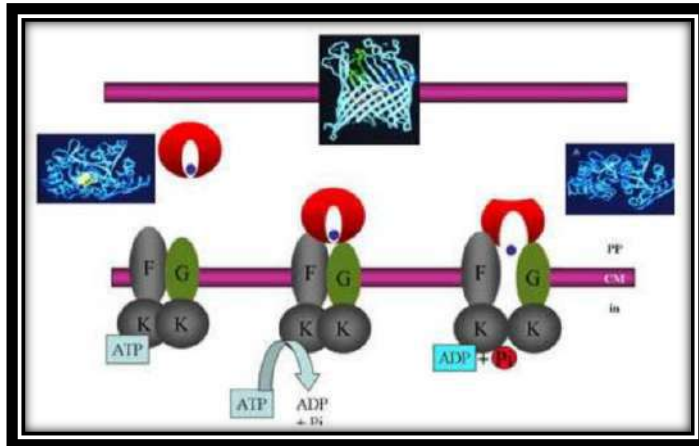


Figura 34. Transportadores ABC o ATPasas de tráfico. Se trata de un sistema de varios componentes, en el que existen proteínas periplasmicas que captan el sustrato con gran afinidad, y lo llevan hasta unas proteínas de membrana, las cuales acoplan el paso de dicho sustrato hasta el citoplasma con la hidrólisis de ATP (González, 2004).

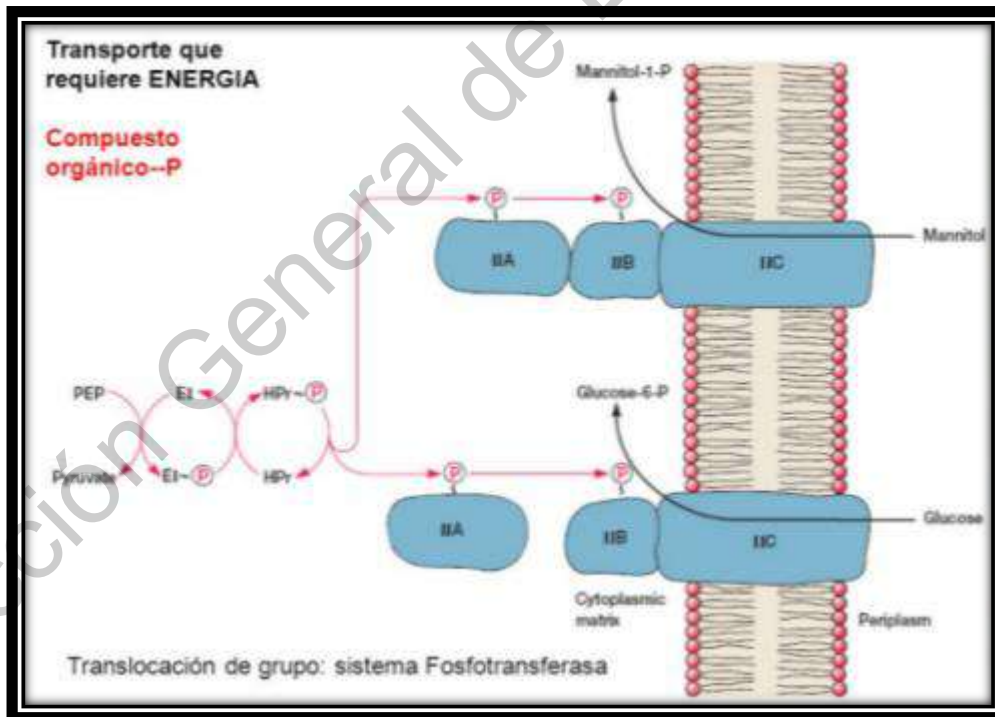


Figura 35. Translocación de grupo. Principalmente ocurre en bacterias anaerobias y facultativas. Funciona como una cadena de transportadores del grupo fosfato de alta energía del fosfoenolpirúvico (PEP) hasta el azúcar a transportar (Tortora, 2013).

4.1.4 Cinéticas de transporte.

Potencial eléctrico de membrana es resultado de la diferencia de carga a ambos lados de una membrana:

$$\Delta\Psi = \Psi_{in} - \Psi_{out}$$

Por convención se considera que el potencial es negativo cuando la carga interna es negativa. El trabajo realizado por el campo eléctrico cuando una carga atraviesa la membrana es igual a la carga total transportada multiplicada por el potencial de la membrana si un solo electrón o protón se mueve a través de la una membrana el trabajo realizado es igual a $\Delta\Psi$ electrón-volts y se calcula con la siguiente ecuación.

$$\Delta G = F * \Delta\Psi$$
$$\frac{J = V * C}{F * C * mol^{-1}} = V * mol$$

Si tomamos en cuenta que coulomb x volts = Joules. Sabemos que $V = J/F$ podemos dividir ambos lados de la ecuación entre la constante de Faraday.

$$\frac{\Delta G}{F} = \frac{F * \Delta\Psi}{F} \rightarrow \frac{\Delta G}{F} = \Delta\Psi (V)$$

La energía electroquímica del potencial de membrana ($\Delta\mu_{H^+}$) puede calcularse como una función de su concentración.

$$G = G_0 + RT \ln[H^+]$$

G_0 = Energía libre estándar

El cambio de energía libre cuando un mol de protones se mueve a través de un gradiente de concentración es igual a la diferencia de energía libre de las dos concentraciones.

Constante de Faraday (carga que transporta un mol de e^-) = $1.6022 \times 10^{-19} \text{ mol}^{-1} \times 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} = 96485 \text{ } ^\circ\text{C} \times \text{mol}^{-1}$

Donde:

$$\Delta G = RT \ln[H_{IN}^+] - RT \ln[H_{OUT}^+]$$

Y se puede resumir como:

$$\Delta G = \frac{RT \ln[H_{IN}^+]}{[H_{OUT}^+]}$$

Esta ecuación normalmente se expresa en unidades eléctricas y para convertirla se divide entre la constante de Faraday.

$$\frac{\Delta G}{F} = \frac{(8.3144 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})(303 \text{ K})(2.303 \log_{10} \frac{[H_{IN}^+]}{[H_{OUT}^+]})}{F = 96.485 \text{ Coulombs}}$$

$$\frac{\Delta G}{F} = \frac{0.060 \text{ (J} \cdot \text{mol}^{-1})}{\text{Coulombs}} \cdot \log_{10} \frac{[H_{IN}^+]}{[H_{OUT}^+]} \text{ (mol)}$$

$$\frac{\Delta G}{F} = \frac{0.060 \text{ V} \cdot \text{Coulombs}}{\text{Coulombs}} \cdot \frac{\text{mol}}{\text{mol}}$$

$$\frac{\Delta G}{F} = \left(\frac{0.060 \text{ V}}{\text{mol}} \right) \cdot \left(\frac{\log[H_{IN}^+]}{[H_{OUT}^+]} \right)$$

$$\frac{\Delta G}{F} = 60(\text{pH}_{OUT} - \text{pH}_{IN}) = -60(\text{pH}_{IN} - \text{pH}_{OUT})$$

$$\frac{\Delta G}{F} = -60 \Delta \text{pH}$$

La suma de la energía eléctrica y química resulta en la fuerza electroquímica del protón y a partir de esto podemos calcular la fuerza protón motriz.

Fuerza electro química ($\Delta\mu_{H^+}$)

$$\Delta\mu_{H^+} = F \cdot \Delta\Psi + RT \ln \frac{[H_{in}^+]}{[H_{out}^+]} = \frac{J}{F}$$

$$\Delta P = \Delta\Psi - 60 \Delta \text{pH} = \text{mV} @ 30^\circ\text{C}$$

$$\Delta\mu_{Na} = \Delta\Psi - 60 \Delta P(\text{Na}^+) \text{ para sodio } P = -\log(\text{Na})$$

Potencial químico del hidrógeno μ_{H^+}

$$\mu_{H^+} = \mu_{H^+}^0 + RT \ln[H^+] + Z * F\Delta\Psi$$

Donde Z es la carga del ion.

Para un ion con una sola carga.

$$\Delta G = \mu_{H_{IN}^+} - \mu_{H_{OUT}^+} = -2.3 RT\Delta pH + F\Delta\Psi$$

$$\Delta G = \mu_{H^+}^0 + RT \log[H_{IN}^+] + F\Psi_{IN} - (\mu_{H^+}^0 + RT \log[H_{OUT}^+] + F\Psi_{OUT})$$

Cuando los protones pasan a través de la membrana, el trabajo es:

$$\Delta G = \mu_{H_{IN}^+} - \mu_{H_{OUT}^+} = -2.3 RT\Delta pH + F\Delta\Psi$$

$$\Delta G = \mu_{H^+}^0 + RT \log[H_{IN}^+] + F\Psi_{IN} - (\mu_{H^+}^0 + RT \log[H_{OUT}^+] + F\Psi_{OUT})$$

$$\Delta G = RT \log \frac{[H_{IN}]}{[H_{OUT}]} + F\Delta\Psi$$

Si establecemos que $\Delta pH = 0.5$ a $\Psi = 0.154$ y $T = 303$ K cual es el valor de ΔG

$$\Delta G = -2.3 (8.3144 \text{ J} * \text{K}^{-1} * \text{mol}^{-1})(303 \text{ K})(0.5) + (96485 \text{ C} * \text{mol}^{-1})(-0.154 \text{ V})$$

$$\Delta G = (2897.153 \text{ J} * \text{mol}^{-1}) - (14472 \text{ J} * \text{mol}^{-1})$$

$$\Delta G = 17369.903 \text{ J} * \text{mol}^{-1}$$

Si para la síntesis de ATP pasan 4 H^+ el

$$\Delta G \text{ asociado} = (4) (17369.903) = 69479.612 \text{ J.}$$

$$\Delta G \text{ para ATP} = 31.4 \text{ KJ /mol.}$$

4.2 Introducción a la bioenergética

Las células son máquinas termodinámicas rodeadas por una membrana semipermeable que extraen energía del ambiente para compensar su entropía interna (Figura 36).

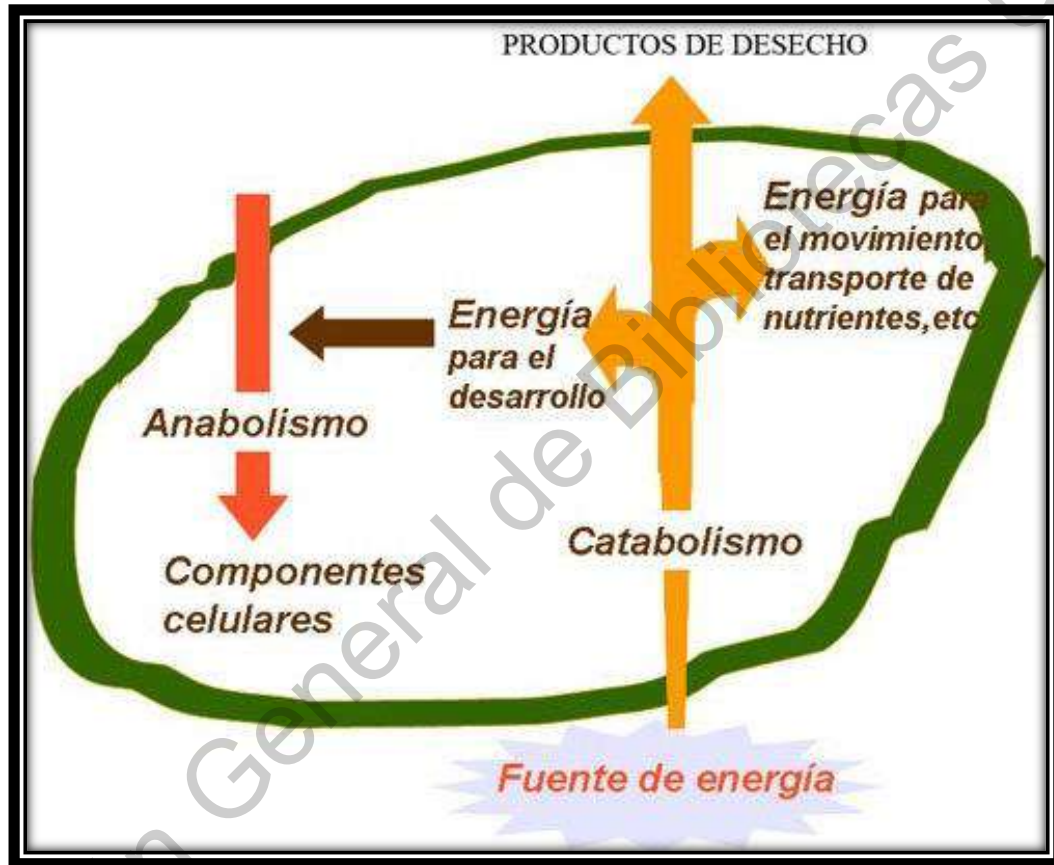


Figura 36. La célula como sistema semiaislado. Durante las reacciones del anabolismo la célula consume energía y durante el catabolismo la célula produce energía (Madigan, 2015).

Los materiales del ambiente son convertidos en componentes celulares y esta transformación depende de la obtención de energía del ambiente y su conversión en energía biológica (transducción) (Figura 37).

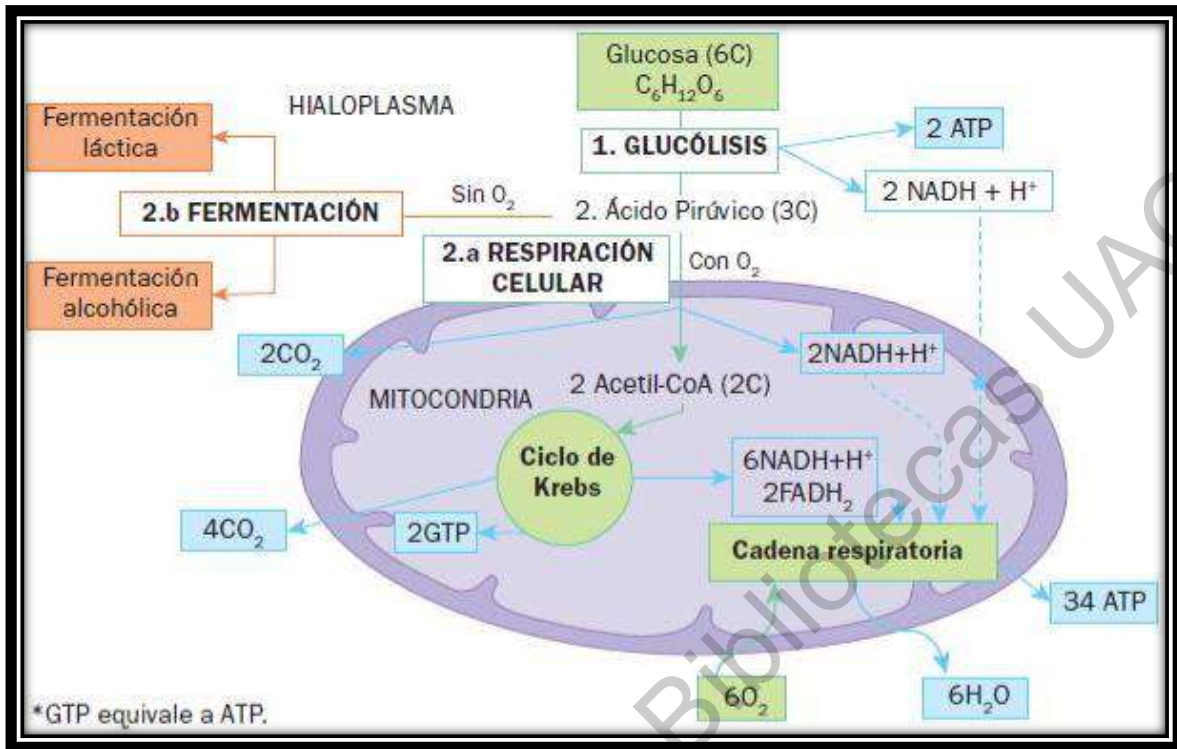


Figura 37. Transducción energética celular (Doelle, 2010).

La energía ambiental se presenta en forma de luz y la energía de los enlaces químicos y se basa en reacciones de óxido-reducción (Figura 39).

El proceso completo requiere de 4 componentes (Figura 38).

- Fuente de energía.
- Donador de e⁻.
- Aceptor final de e⁻.
- Fuente de carbono.

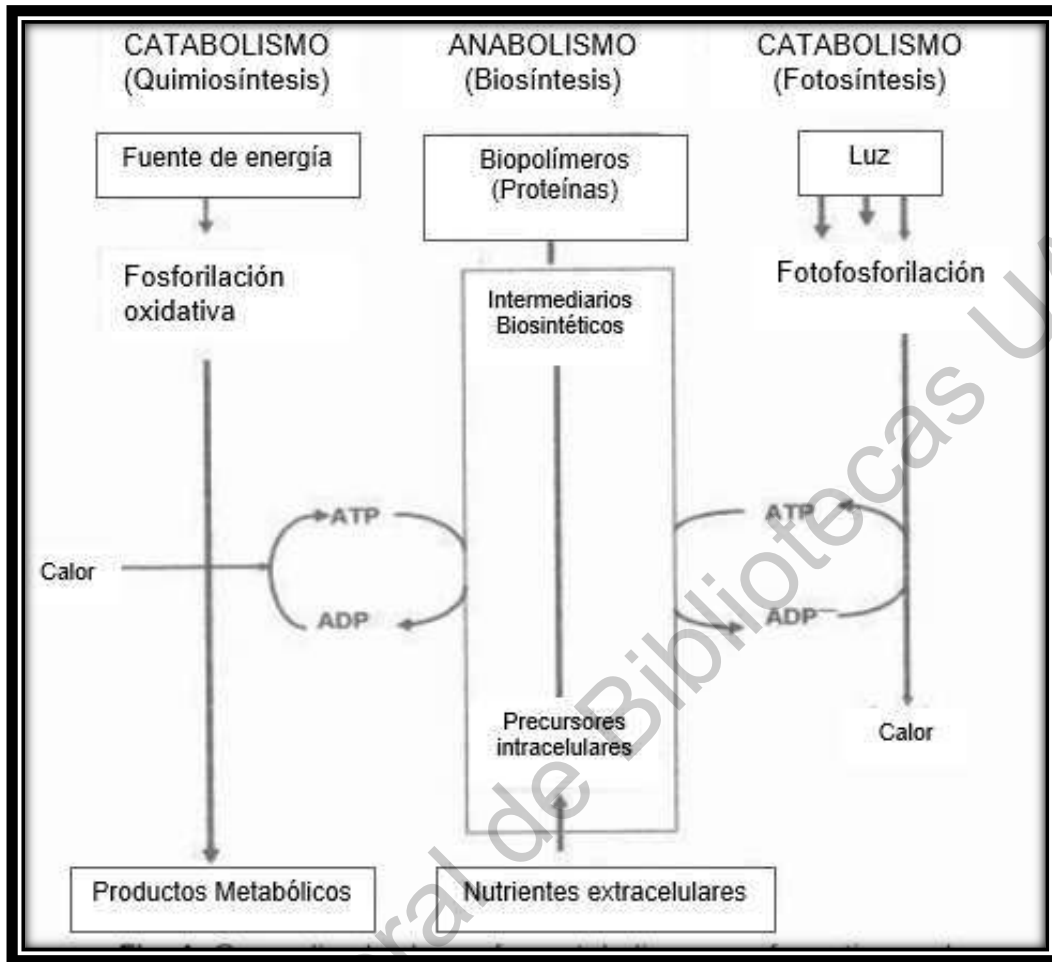


Figura 38. Esquema generalizado de la formación de energía metabólica y su uso (Doelle, 2010).

Para la reacción $A \rightleftharpoons B$,
$$K_e = \frac{[B]}{[A]}$$

Si $K_e > 1$, la reacción es eficiente. Si $K_e < 1$, la reacción no es eficiente.

K_e se relaciona con ΔG° así: $\Delta G^\circ = -RT \ln K_e$

- Si $K_e > 1$, $\Delta G < 0$. La reacción es espontánea.
- Si $K_e < 1$, $\Delta G > 0$. La reacción no es espontánea.

Figura 39. Los procesos energéticos en las reacciones (Prescott, 2002).

4.2.1 Termodinámica de los seres vivos

La transferencia de energía se da siguiendo las leyes de la termodinámica donde:

La energía total involucrada en una reacción química se expresa en términos de ganancia o pérdida de energía durante la reacción. La primera Ley de la termodinámica es la Ley de la conservación de la energía, el total de la energía es constante.

$$q = \Delta E + w'$$

$$\Delta E = q - w'$$

$$Q = \Delta E + P\Delta V$$

$$= q - w'$$

$$\Delta H = \Delta E + nRT$$

El signo negativo indica una reacción exergónica.

La segunda Ley de la termodinámica, establece que la entropía del universo aumenta constantemente.

ΔG : Mide la espontaneidad de una reacción

$$\Delta G = \Delta H - T(\Delta S)$$

Entalpia: Energía del sistema (H)

Entropía: Orden de sistema (S)

ΔG_o ~ Energía libre de formación o reacción asumiendo un estado inicial standard

$$G = 0$$

Equilibrio: $\Delta H = T(\Delta S)$

$$\Delta G = -RT \ln K$$

Los cambios son aditivos la ΔG debe ser negativa para que la reacción sea espontánea.

4.2.2 Fuerza protón motriz

La energía libre generada del catabolismo es conservada en forma de ATP y de fuerza protón motriz la cual provee la energía necesaria para el anabolismo (Kim, 2008) (Figuras 40-46).

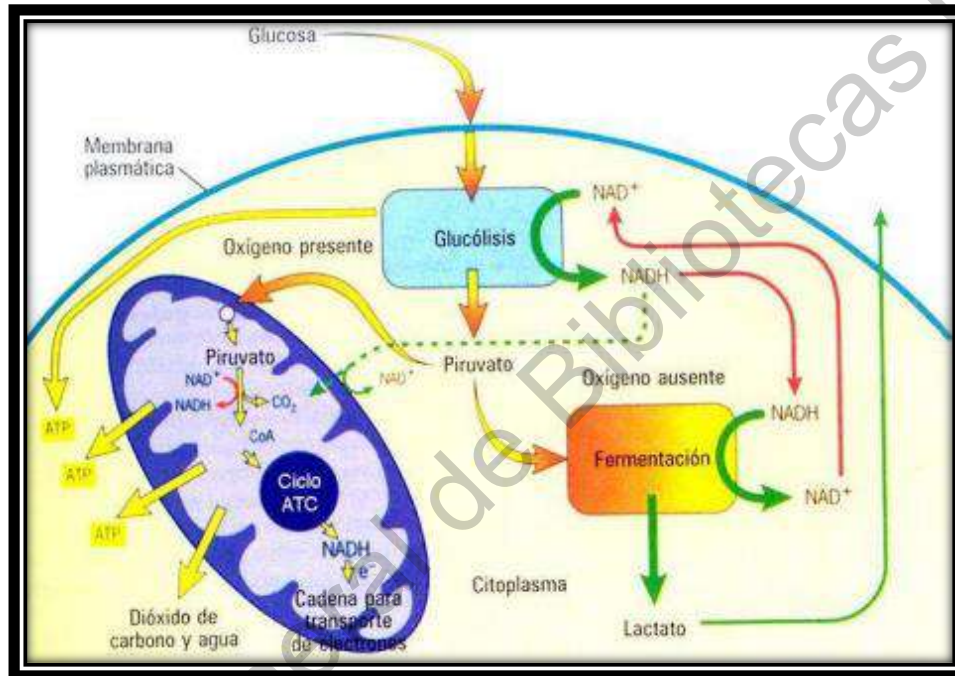
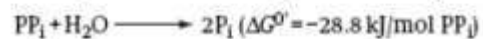
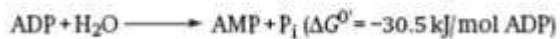
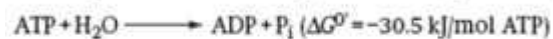
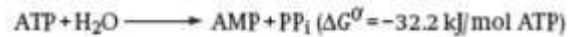


Figura 40. Transducción de la energía, (Kim, 2008).



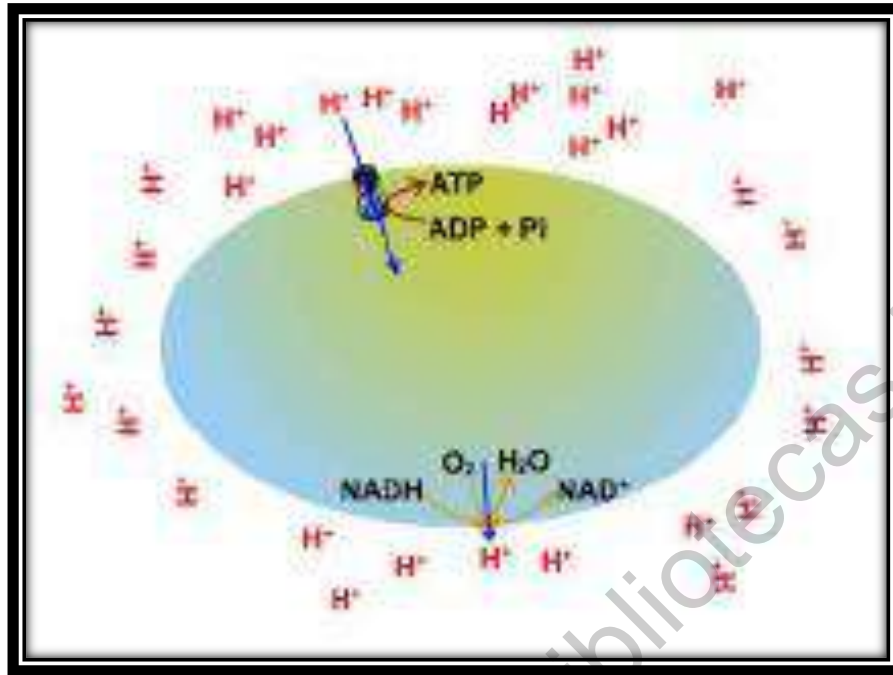


Figura 41. Diagrama general de la fuerza protón motriz en la membrana celular bacteriana (Doelle, 2010).

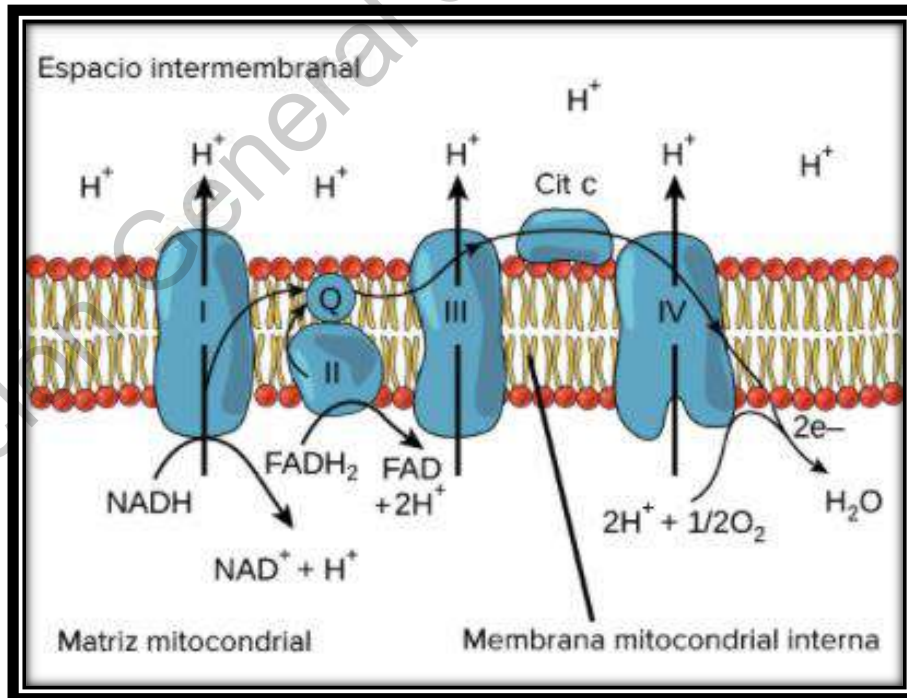


Figura 42. Formación de una membrana celular energizada: fuerza protón motriz (Doelle, 2010).

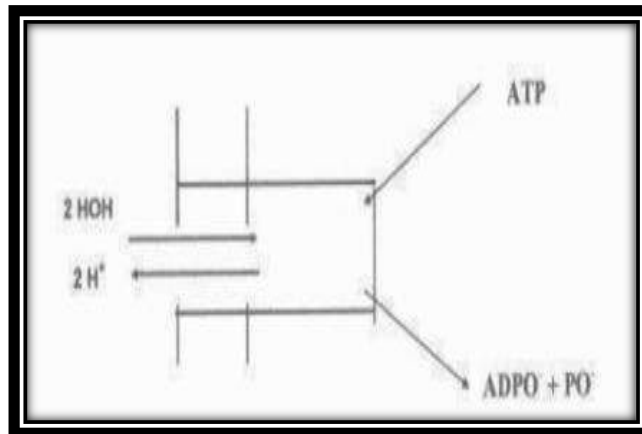


Figura 43. Formación de la membrana celular energizada por la Hidrólisis de ATP: Fuerza protón motriz (Doelle, 2010).

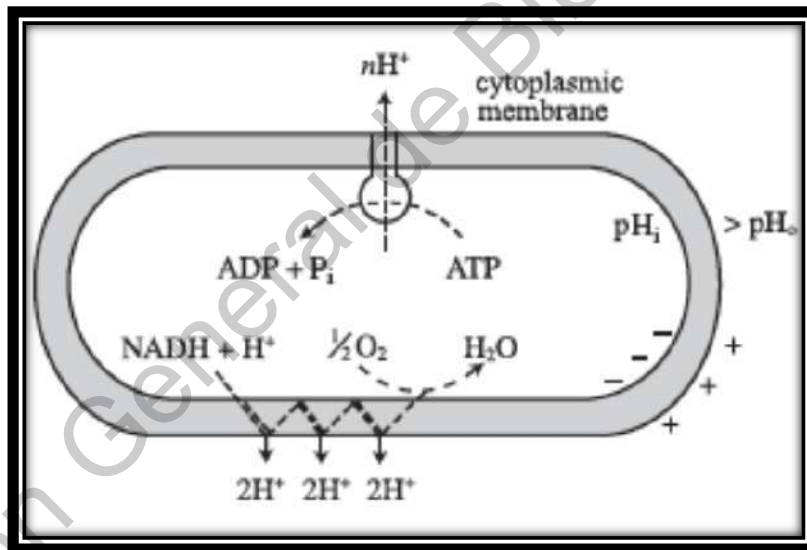


Figura 44. Fuerza protón motriz. La fuerza protón motriz (Δp) es una forma biológica de energía que facilitando la síntesis de ATP, el transporte y motilidad. Δp consiste en un interior alcalino y un exterior de gradiente de protones ácido, de membrana interno negativo y e externo positivo. El transporte de electrones por fosforilación (ETP) durante la respiración y la fotosíntesis forman Δp (parte baja). Δp se consume para sintetizar ATP. En las células fermentativas la ATPasa unida a membrana hidroliza ATP para exportar H^+ la cual forma Δp (parte alta) (Kim, 2008).

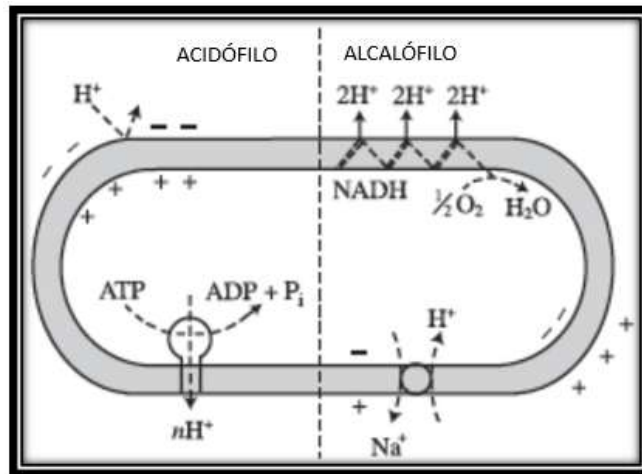


Figura 45. Fuerza protón motriz en acidófilos y alcalófilos. Los acidófilos mantienen un pH interno neutro cuando el pH externo es ácido con un ΔpH . Tienen un potencial positivo bajo de membrana o interno para proporcionar una adecuada $\Delta\mu$ compensando el gran ΔpH (Kim, 2008).

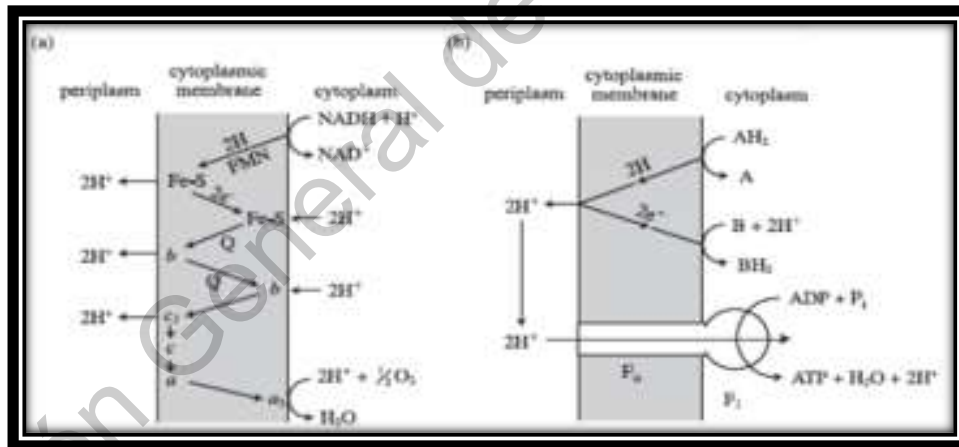


Figura 46. Formación de fuerza protón motriz y síntesis de ATP por medio de ETP. (Dawes E.A.1986 Microbial Energetics, Figure 7.3 Blackie & Son, Glasgow) Desde que los electrones transportados son acomodados en la membrana interna y en los procariontes en la membrana citoplásmica de tal manera que los electrones se mueven de la cara interna de la membrana a la cara externa de la membrana con H^+ , y en dirección inversa sin H^+ , H^+ es exportado durante el transporte de electrones.

a) La membrana unida a la ATPasa sintetiza ATP, consumiendo la fuerza protón motriz con H⁺ fluyendo al lado de menor concentración de H⁺ (b) (Kim,2008).

4.3 Sistemas de producción de ATP

El ATP es una molécula de cambio energético que conecta el anabolismo y el catabolismo) (Figura 47).

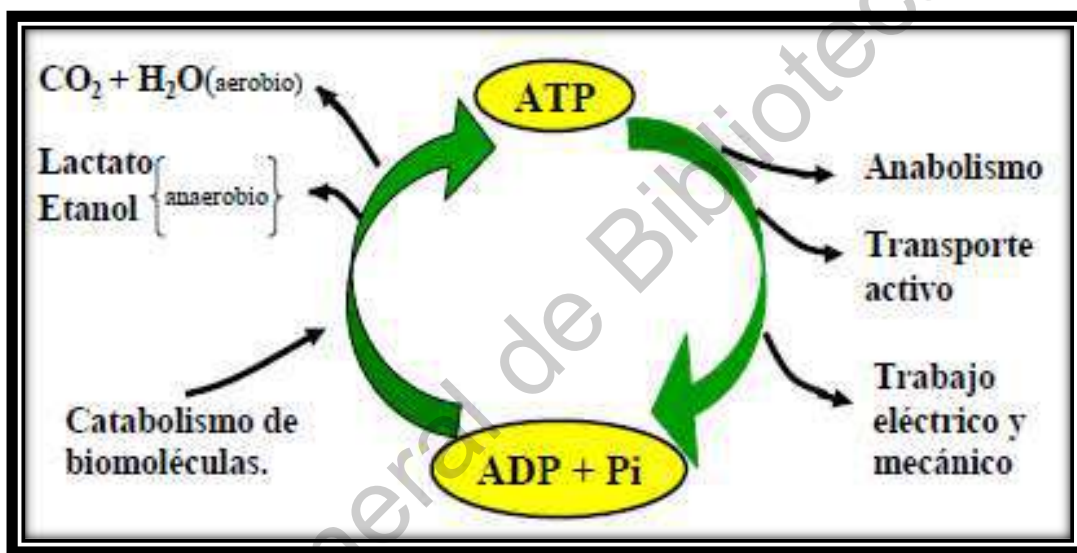
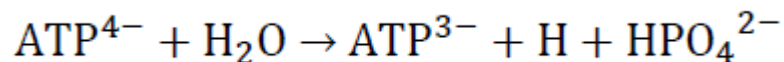
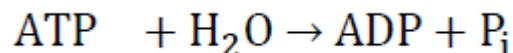


Figura 47. Ciclo energético del ATP. (González, 2004)

Para el complejo Mg-ATP tenemos una $G^0 = -30.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $\text{pH} = 7$ y $T = 310 \text{ K}$:



Pero se representa más comúnmente como:



Al enlace del tercer fosfato se le llama enlace de alta energía y es resultado de la suma de la repulsión eléctrica y la estabilización de la resonancia.

A pH = 7 el ATP tiene 4 cargas negativas (Figura 48 y 49):

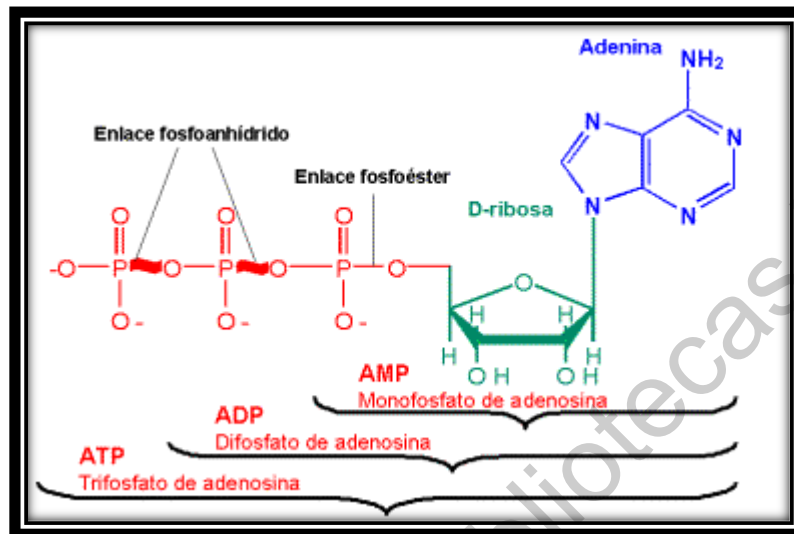


Figura 48. Estructuras ATP, ADP, AMP y Adenosin. La formación de ATP, involucra un $\Delta G = 30.5 \text{ kJ/mol}$ f. Separación de cargas negativas, incremento de entropía y 2 fosfatos libres que se estabilizan por resonancia (Wiley, 2008.)

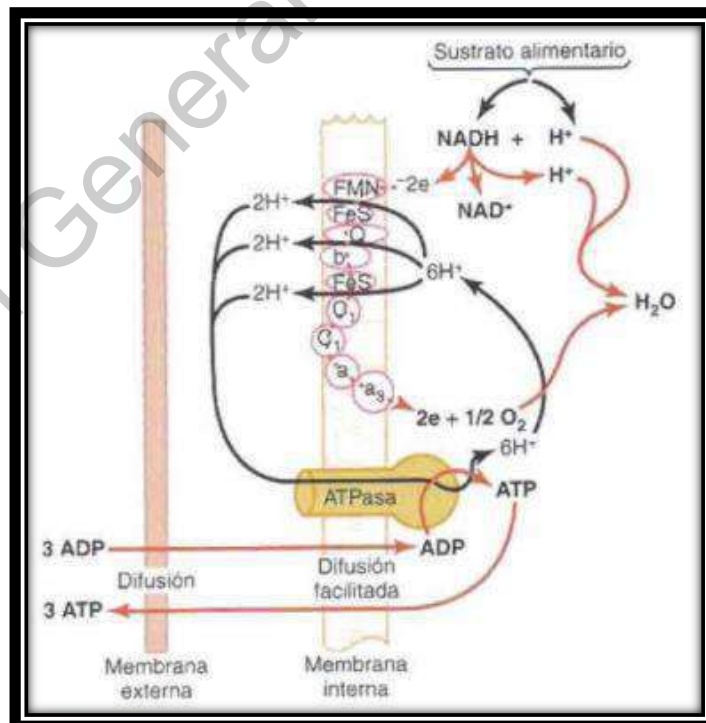
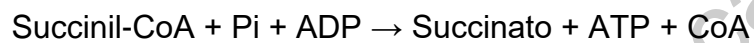
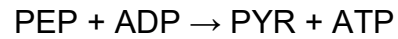
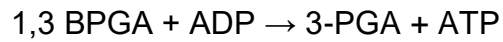


Figura 49. Formación de ATP (Moat,2002).

4.4 Fosforilación a nivel de sustrato

Los 4 sustratos para fosforilación a nivel de sustrato son:



Las reacciones de formación de compuestos de alta energía son (Figura 50, cuadro 6):

- Deshidrogenación: 1,3 BPGA (Figura 51)
- Deshidratación: PEP
- Transacetilación: Acetil PO₄

La estequiometría de la formación de ATP por PPM es de alrededor de: 2.5 – 3 H⁺/ATP.

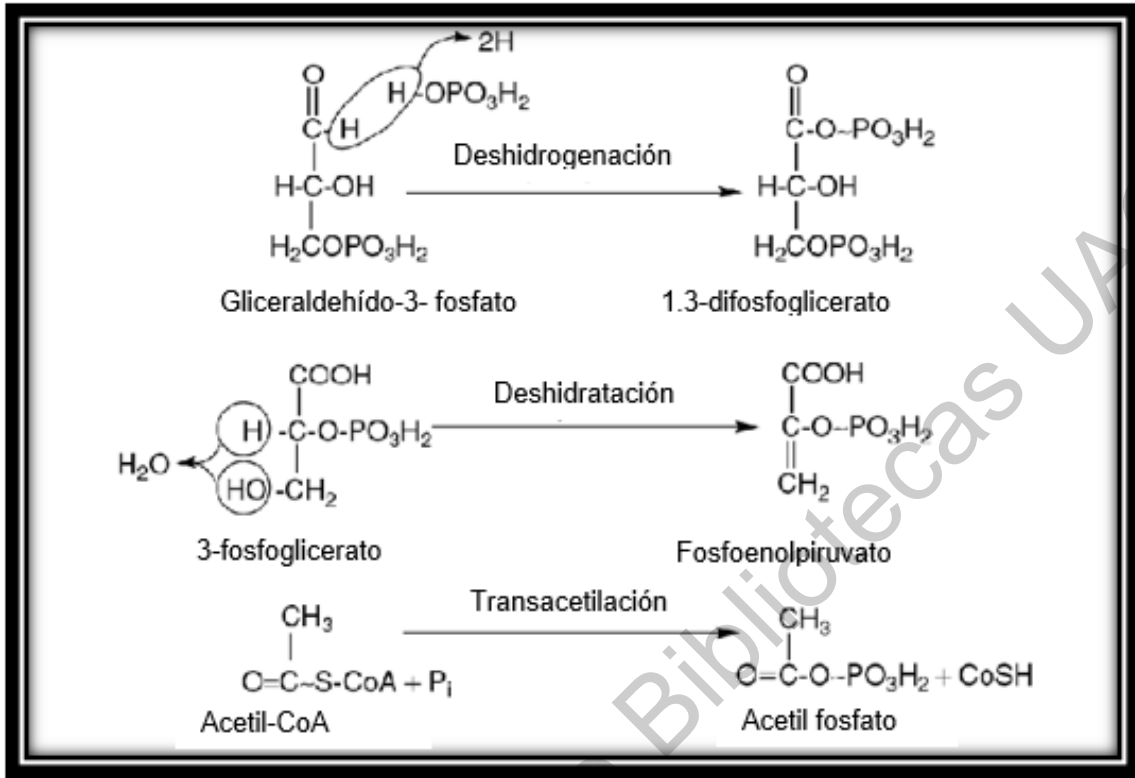


Figura 50. Reacciones involucradas a nivel sustrato en la formación de enlaces de fosfato de alta energía (White, 2007).

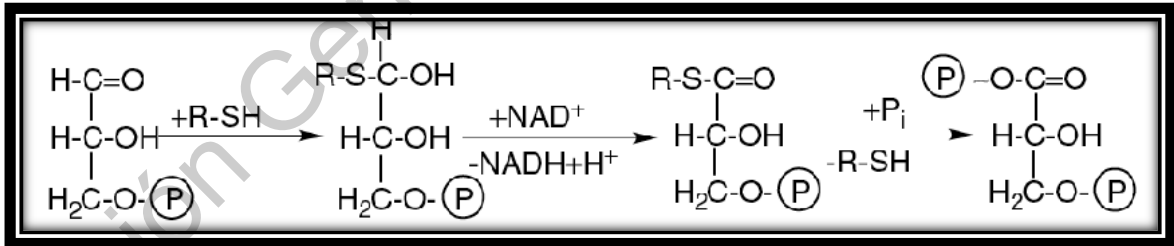


Figura 51. Formación de compuestos de alta energía por deshidrogenación (White, 2007).

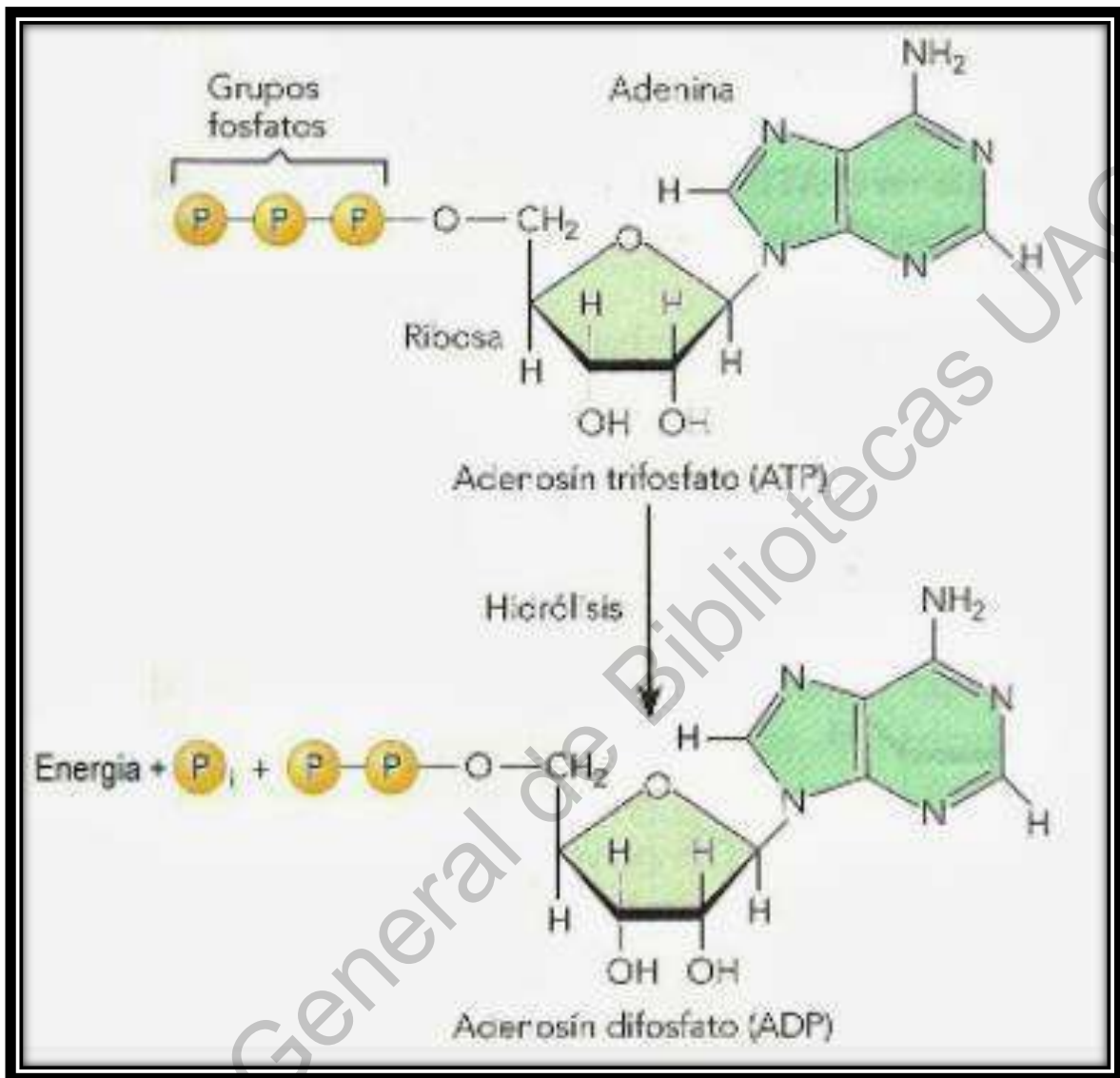


Figura 52. Hidrólisis de ATP (White, 2007).

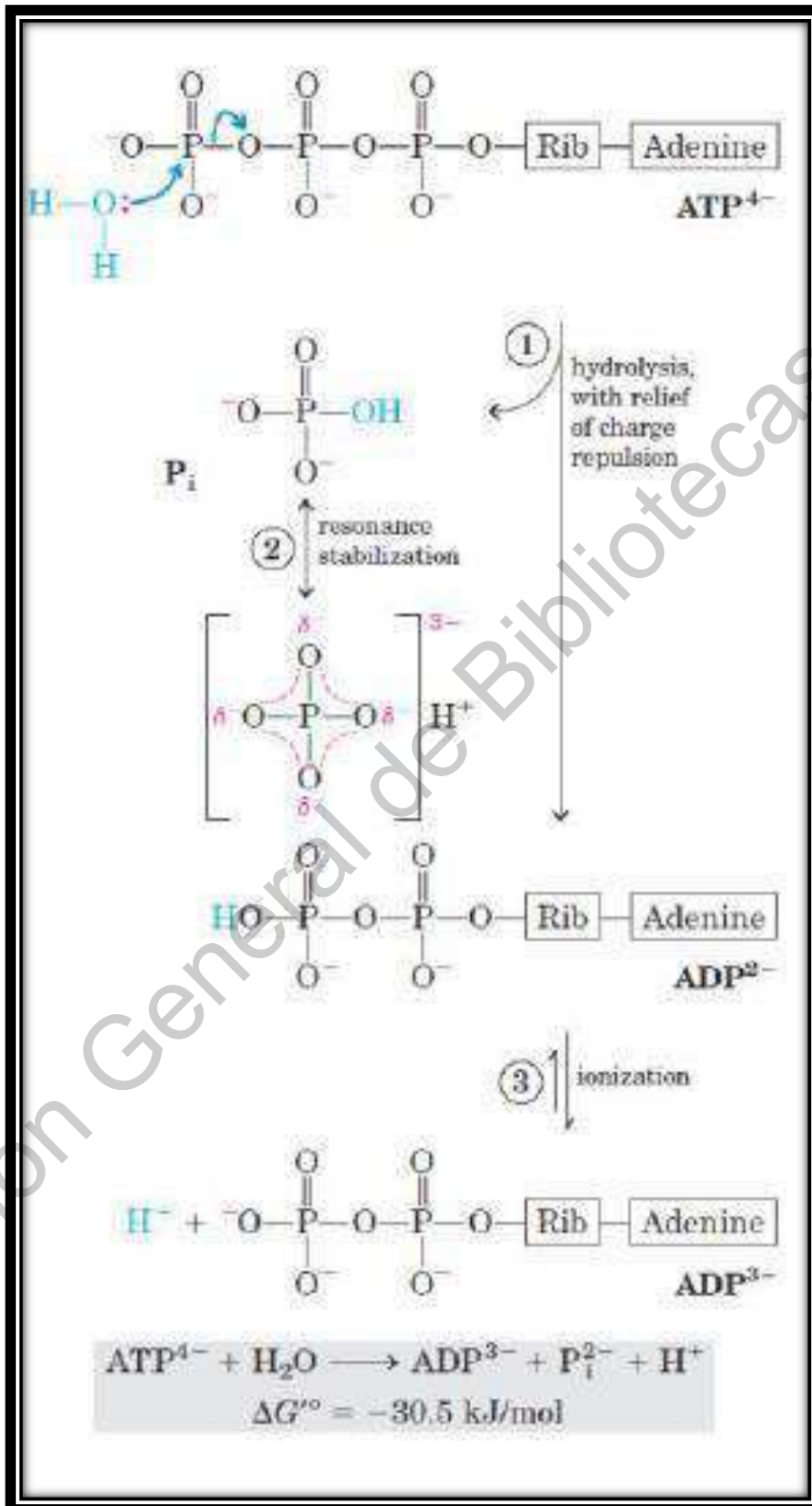


Figura 53. ΔG total de la hidrólisis de ATP (Wiley, 2008.)

Cuadro 6. Promedio de la energía libre de la hidrólisis de fosfato en algunos compuestos de interés biológico ATP (Wiley, 2008).

	ΔG°	
	(kJ/mol)	(kcal/mol)
Fosfoenolpiruvato	-61,9	-14,8
1,3-bisfosfoglicerato (\rightarrow 3-fosfoglicerato + P_i)	-49,3	-11,8
Fosfocreatina	-43,0	-10,3
ADP (\rightarrow AMP + P_i)	-32,8	-7,8
ATP (\rightarrow ADP + P_i)	-30,5	-7,3
ATP (\rightarrow AMP + PP_i)	-45,6	-10,9
AMP (\rightarrow adenosina + P_i)	-14,2	-3,4
PP_i (\rightarrow 2 P_i)	-19,2	-4,0
Glucosa 1-fosfato	-20,9	-5,0
Fructosa 6-fosfato	-15,9	-3,8
Glucosa 6-fosfato	-13,8	-3,3
Glicerol 1-fosfato	-9,2	-2,2
Acetil-CoA	-31,4	-7,5

4.5 Fosforilación oxidativa

Proceso de síntesis de ATP a partir de ADP y P_i acoplado a la oxidación de los componentes de la cadena respiratoria (Figuras 55-56).

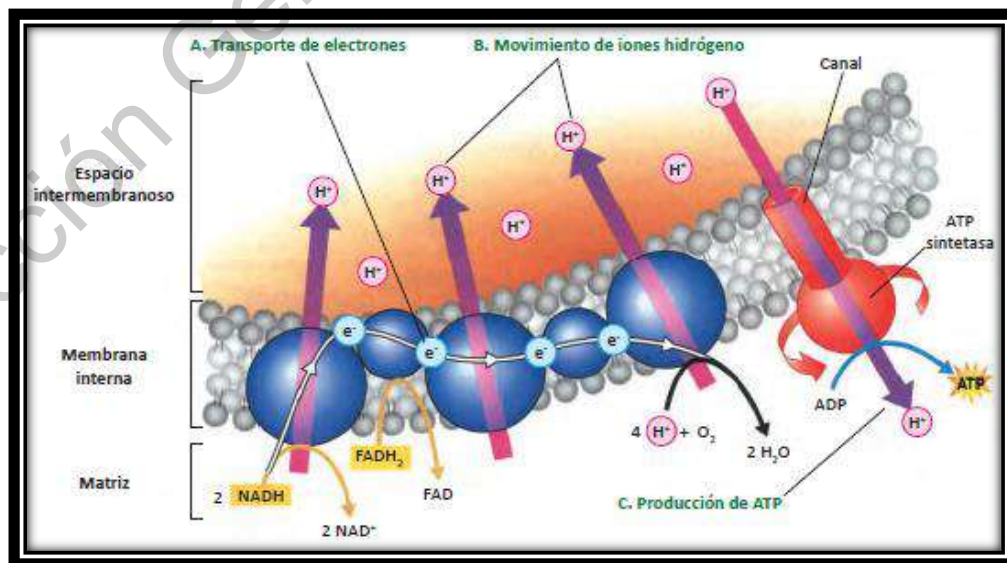


Figura 54. Cadena respiratoria.

A lo largo de esta serie de transportadores de electrones, los electrones de alta energía transportados por el NADH de la glucólisis y por el NADH y el FADH₂ del ciclo de Krebs van "cuesta abajo" hasta el oxígeno (González, 2004).

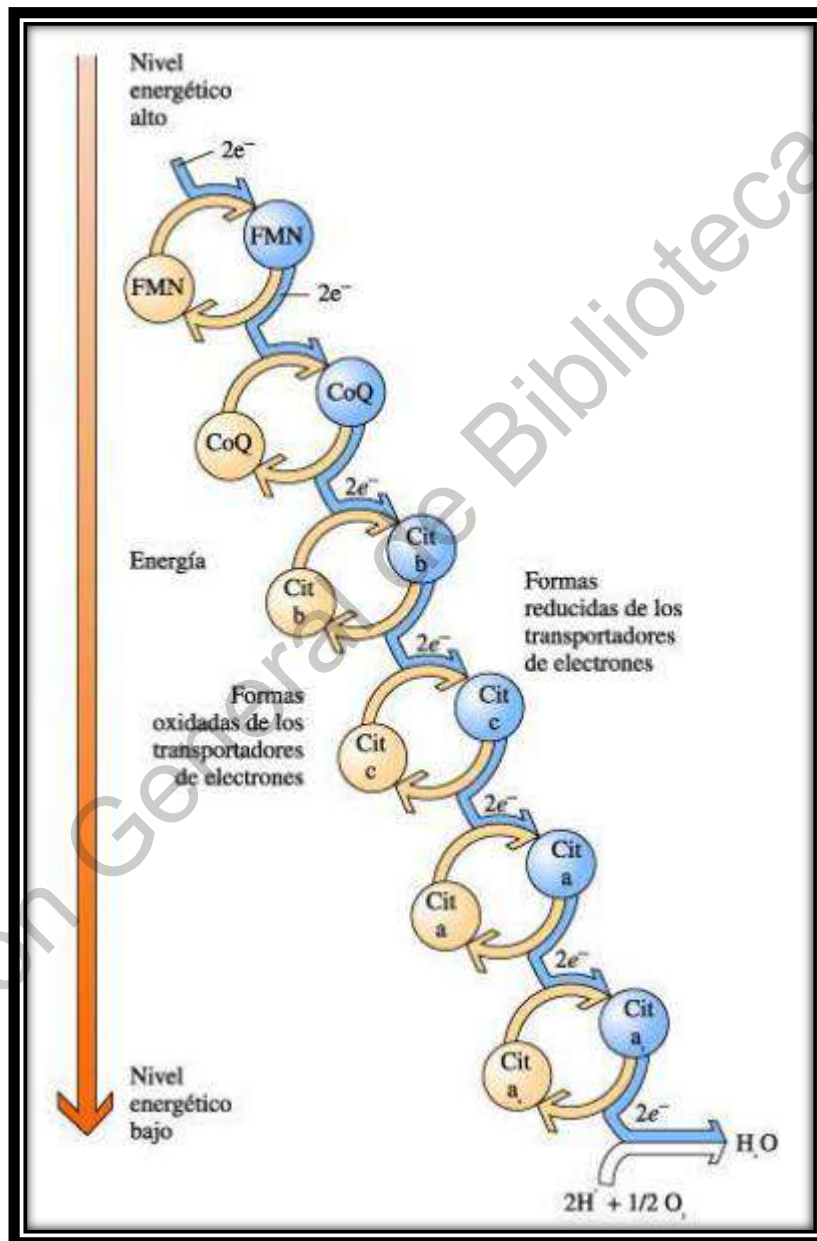


Figura 55. Cadena transportadora de electrones. Localizada entre la membrana mitocondrial interna y membrana plasmática (Prescott, 2002).

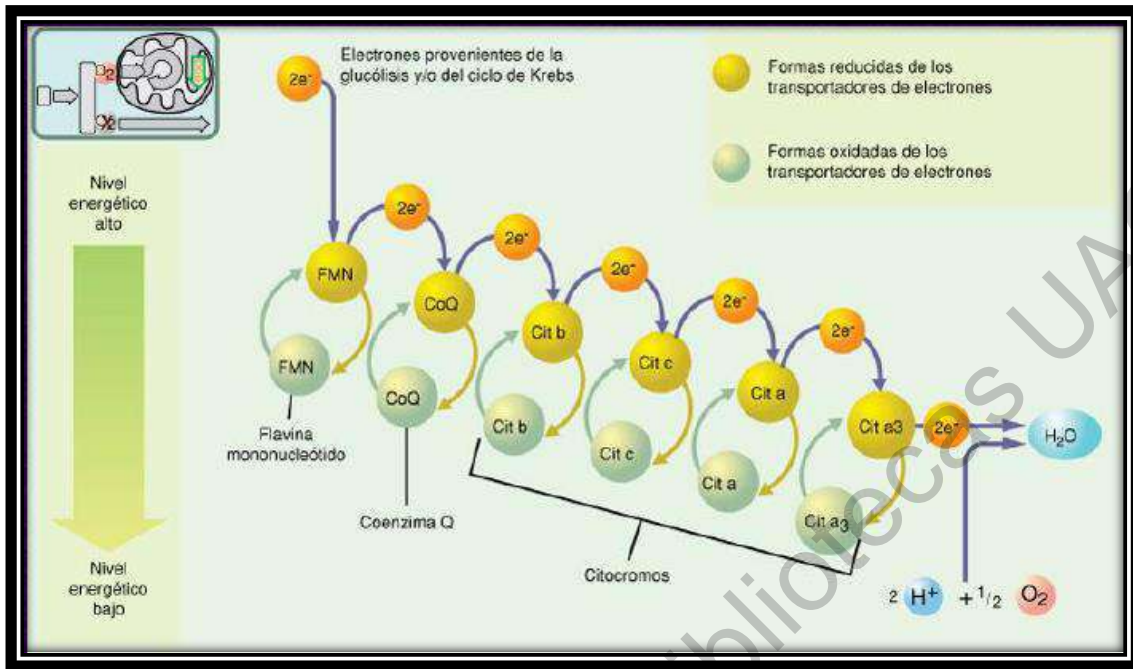


Figura 56. Generación de ATP en la cadena respiratoria. La tendencia de las cargas es moverse de la zona de alto potencial a la zona de bajo potencial (Prescott, 2002).

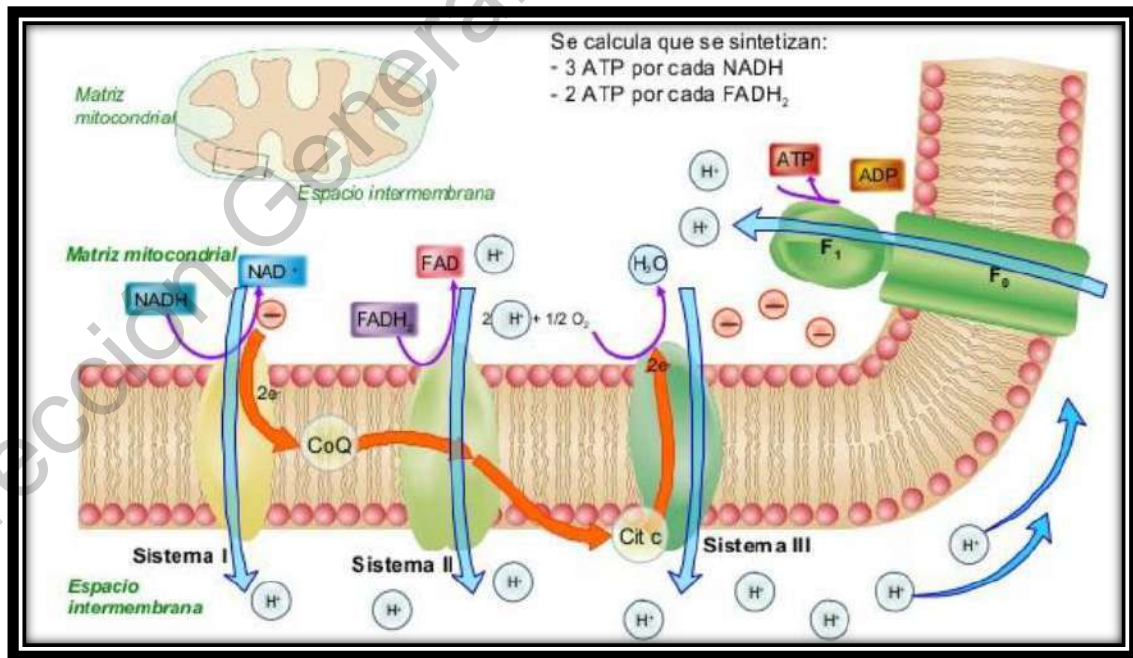


Figura 57. Fosforilación oxidativa (Prescott, 2002).

La fosforilación oxidativa consiste en convertir el ADP en ATP, a lo cual contribuye una gran molécula proteica que sobresale por toda la membrana mitocondrial interna. Se trata de una ATPasa llamada ATP sintetasa (Figura 57-60).

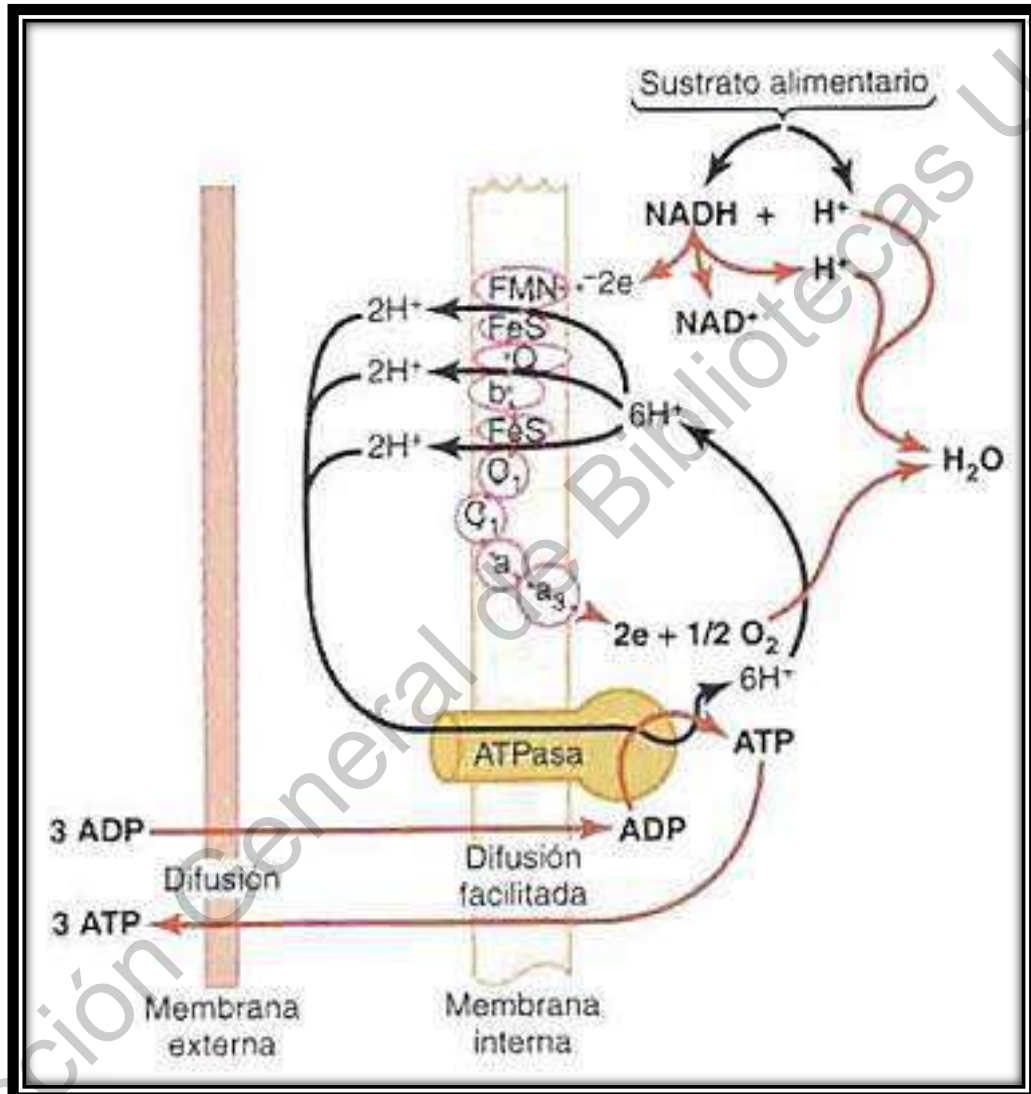


Figura 58. Fosforilación oxidativa y la ATPasa. El ATP sintetasa convierte el ADP en ATP (Prescott, 2002).

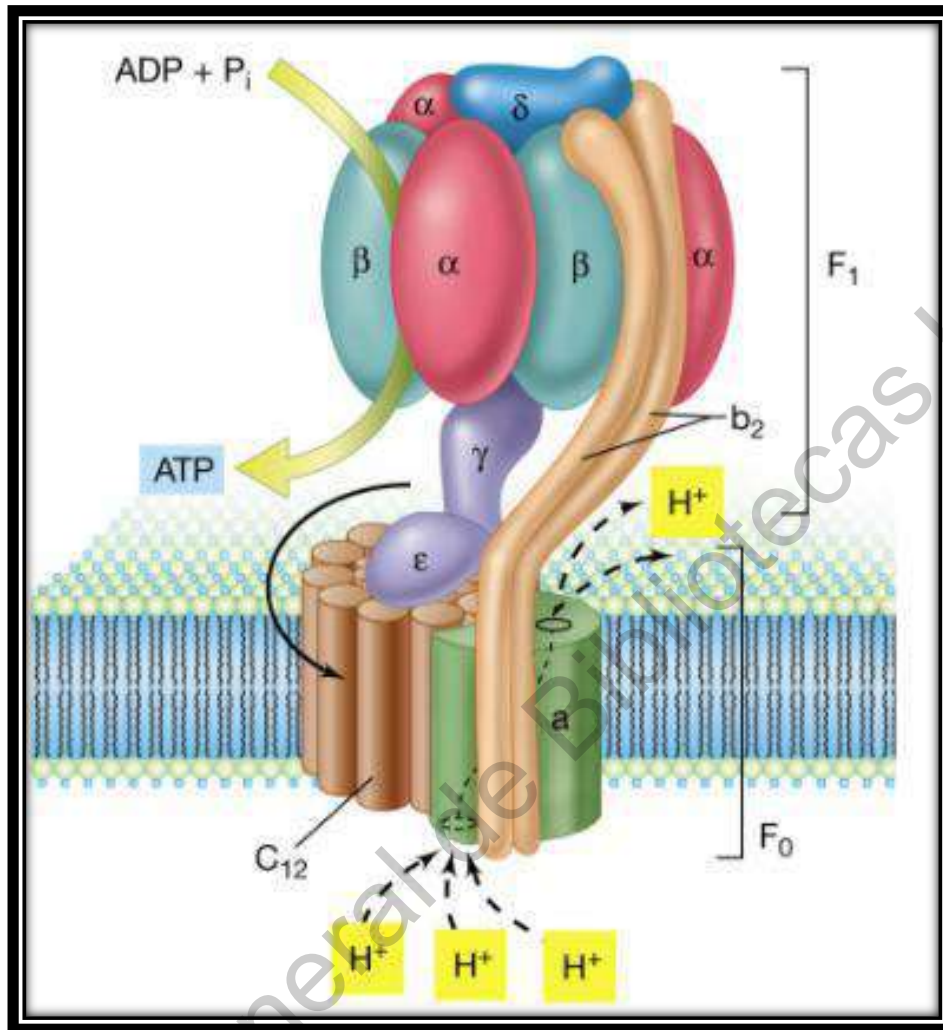


Figura 59. Esquema de la ATP sintetasa, anclada a la membrana celular. La elevada concentración de hidrogeniones con carga positiva creado entre las dos membranas mitocondriales y la gran diferencia de potencial a través de la membrana interna provoca que los hidrogeniones fluyan al interior de la matriz mitocondrial a través de la ATPasa. La energía liberada por este flujo de hidrogeniones es utilizada por la sintetasa para fosforilar el ADP en ATP que es transferido al citoplasma. Por cada 2 electrones que se introducen en la cadena transportadora, provenientes de la ionización de 2 átomos de H, se sintetizan 3 moléculas de ATP (Madigan, 2015).

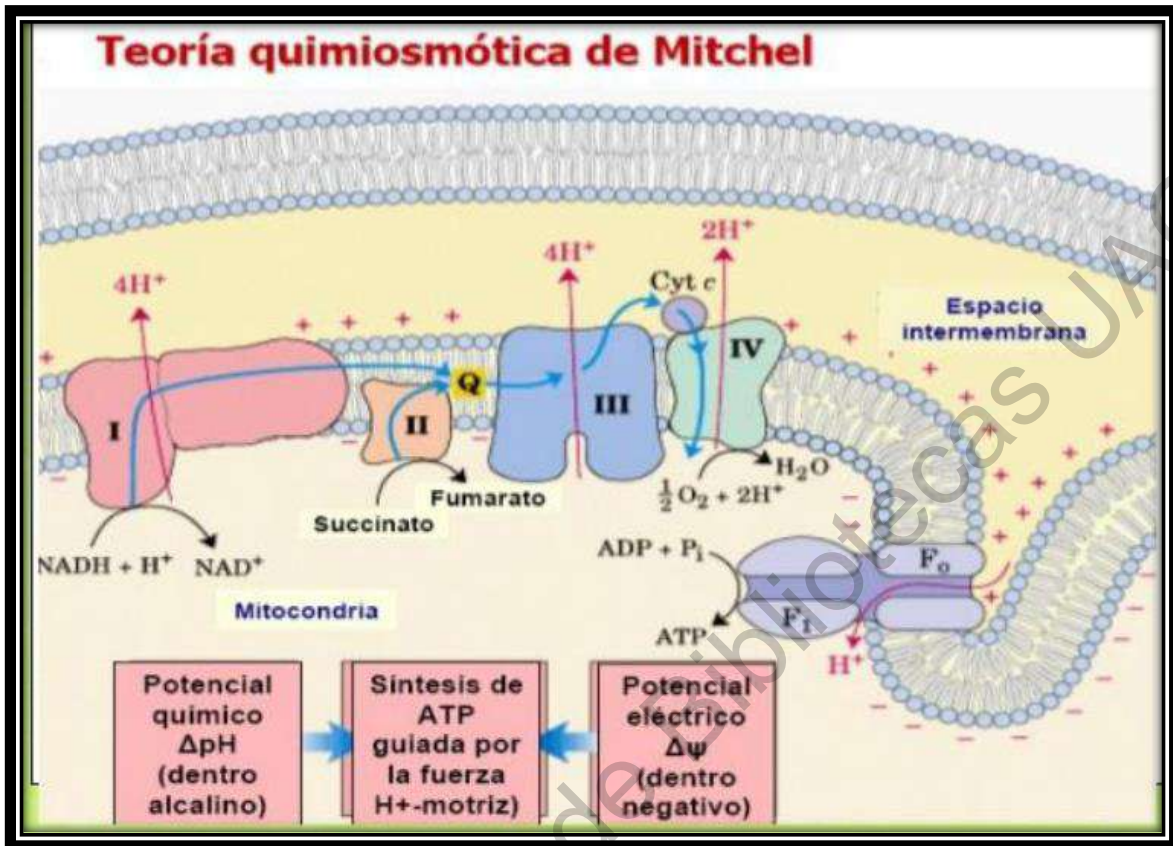


Figura 60. Gradiente de protones y fosforilación oxidativa (González, 2004).

Quando los protones descienden a lo largo del gradiente de energía, dicha energía se utiliza para sintetizar ATP. De esta manera, el gradiente protónico que existe a través de la membrana mitocondrial interna acopla la fosforilación con la oxidación (Figura 61 y 62, cuadro 7).

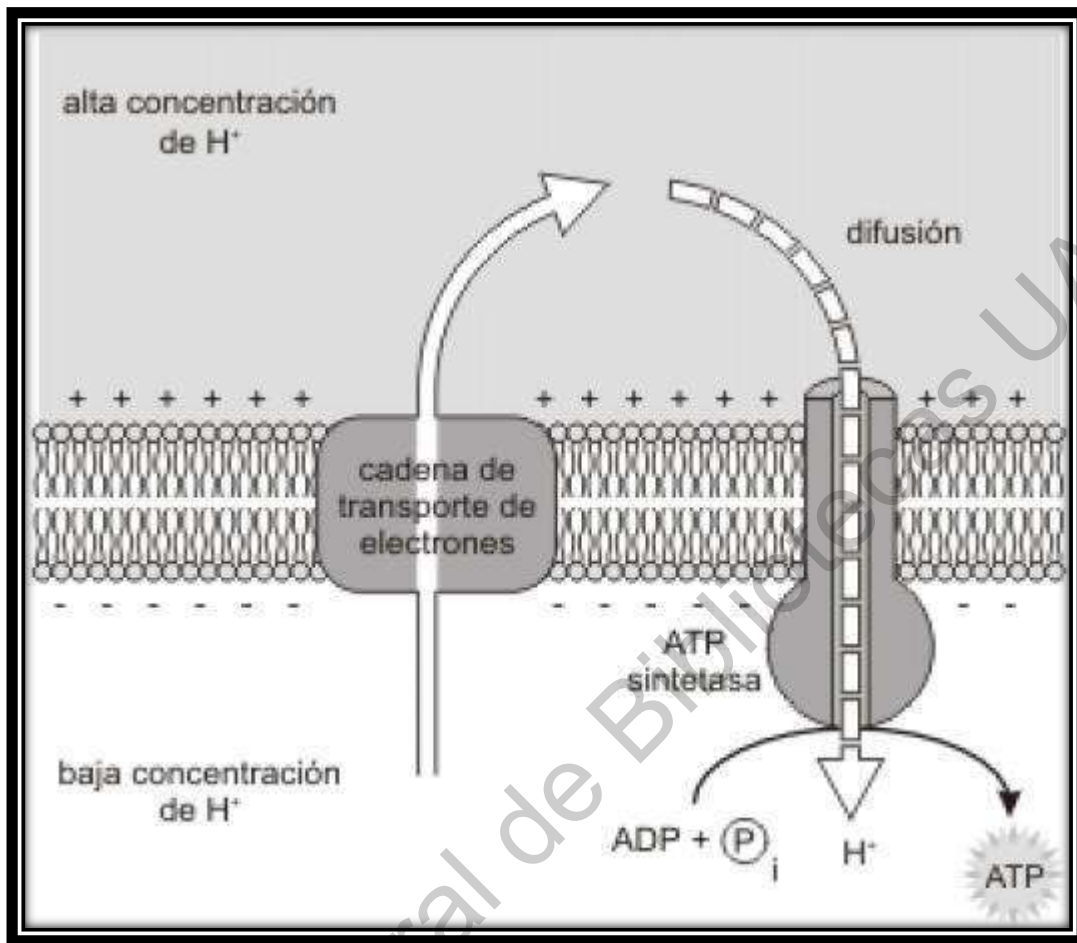


Figura 61: Esquema del gradiente de electrones en la membrana celular y formación de ATP (Prescott, 2002).

Cuadro 7. Resumen del rendimiento energético máximo obtenido por la oxidación completa de glucosa (González, 2004).

Rendimiento energético por cada molécula de glucosa en la respiración aerobia					
Proceso	Lugar	Sustancia inicial	Sustancia final	Coenzimas (poder reductor)	Moléculas de ATP producidos
Glucólisis	<i>Citoplasma</i>	Glucosa	2 piruvato	2 NADH	2 ATP ¹ 4 ATP ²
Formación de acetil-CoA	<i>Matriz mitocondrial</i>	2 piruvato	2 acetil-CoA	2 NADH	6 ATP
Ciclo de Krebs	<i>Matriz mitocondrial</i>	2 acetil-CoA	4 CO ₂	6 NADH 2 FADH ₂	2 GTP (= 2ATP) 18 ATP 4 ATP
TOTAL					36 ATP

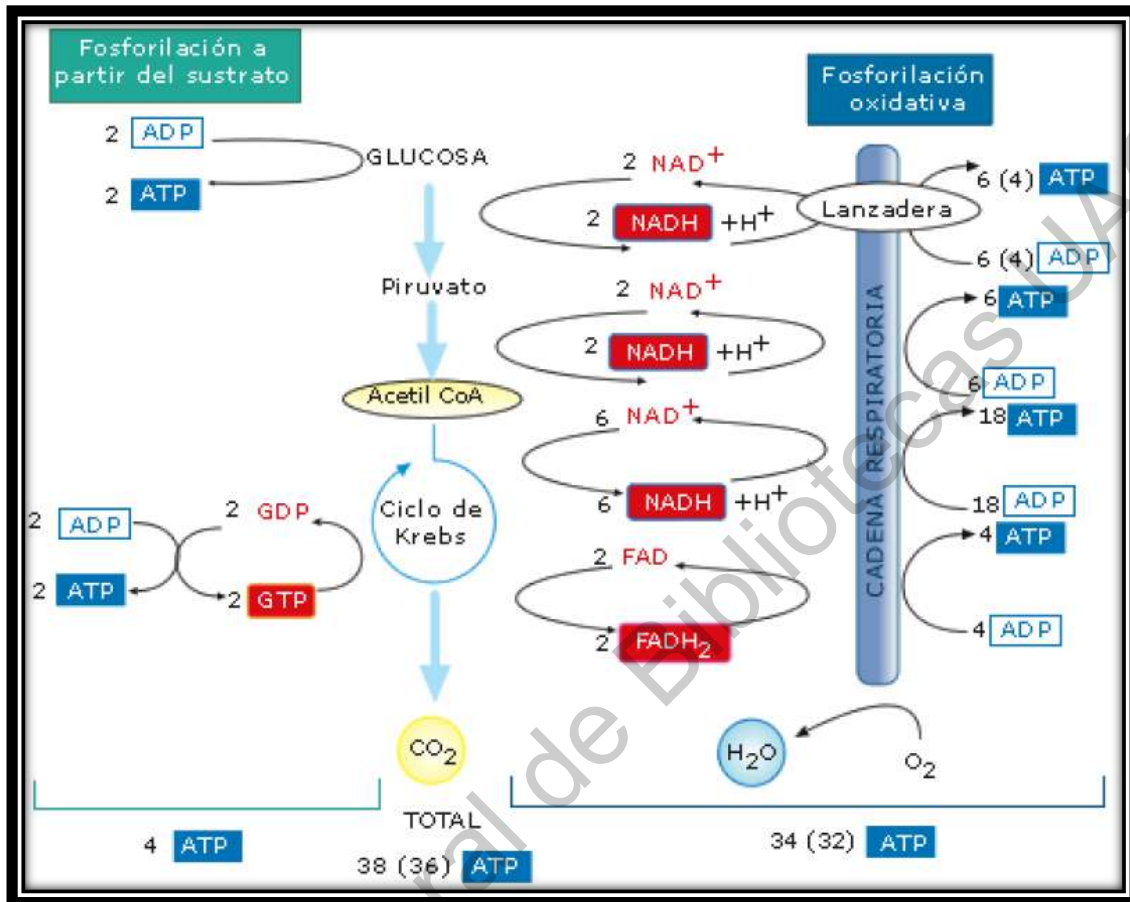


Figura 62. Balance energético en la cadena respiratoria y glucólisis (González, 2004).

5. METABOLISMO ENERGÉTICO (CATABOLISMO)

5.1 Metabolismo quimiorganotrofo

La mayoría de los microorganismos obtienen su energía de fuentes de carbono, llevando a cabo diversas reacciones catabólicas (Figura 63), para suministrar esqueletos de carbono y el ATP y NADPH requerido para las reacciones anabólicas (Figura 64 y 65).

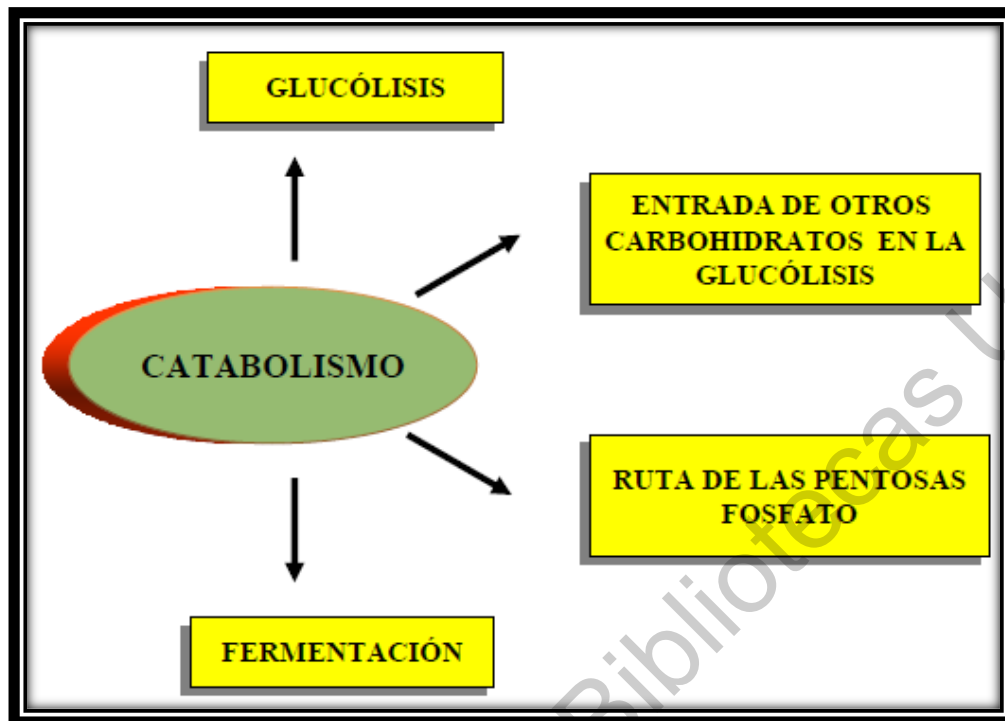


Figura 63. Catabolismo de los carbohidratos, vías de degradación (González, 2004).

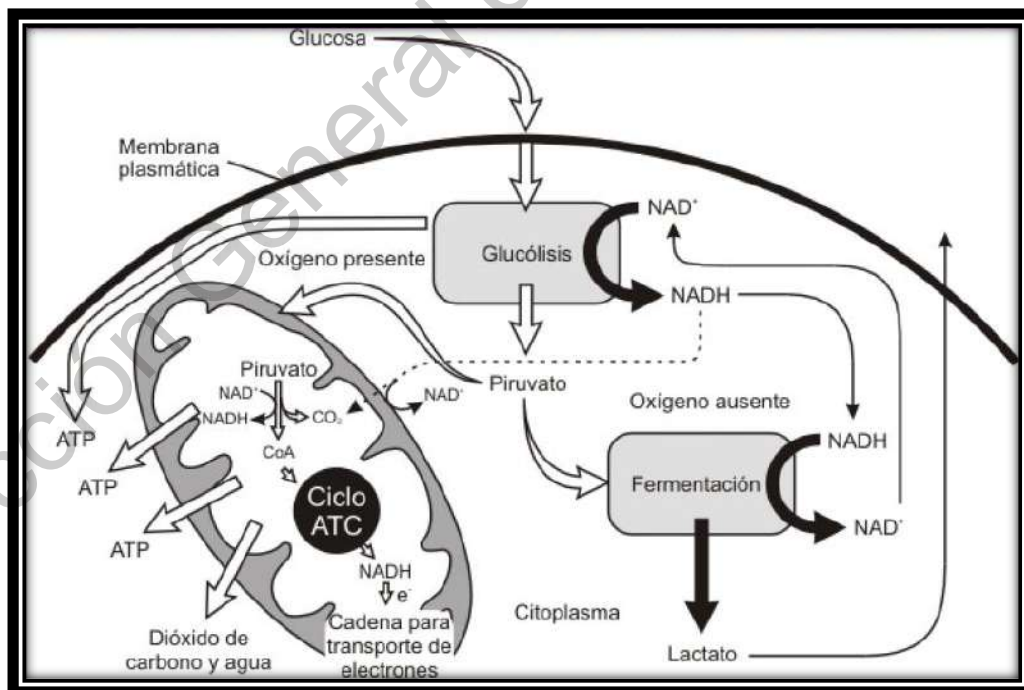


Figura 64. Esquema de las diversas vías que puede tomar la glucosa (Prescott, 2002).

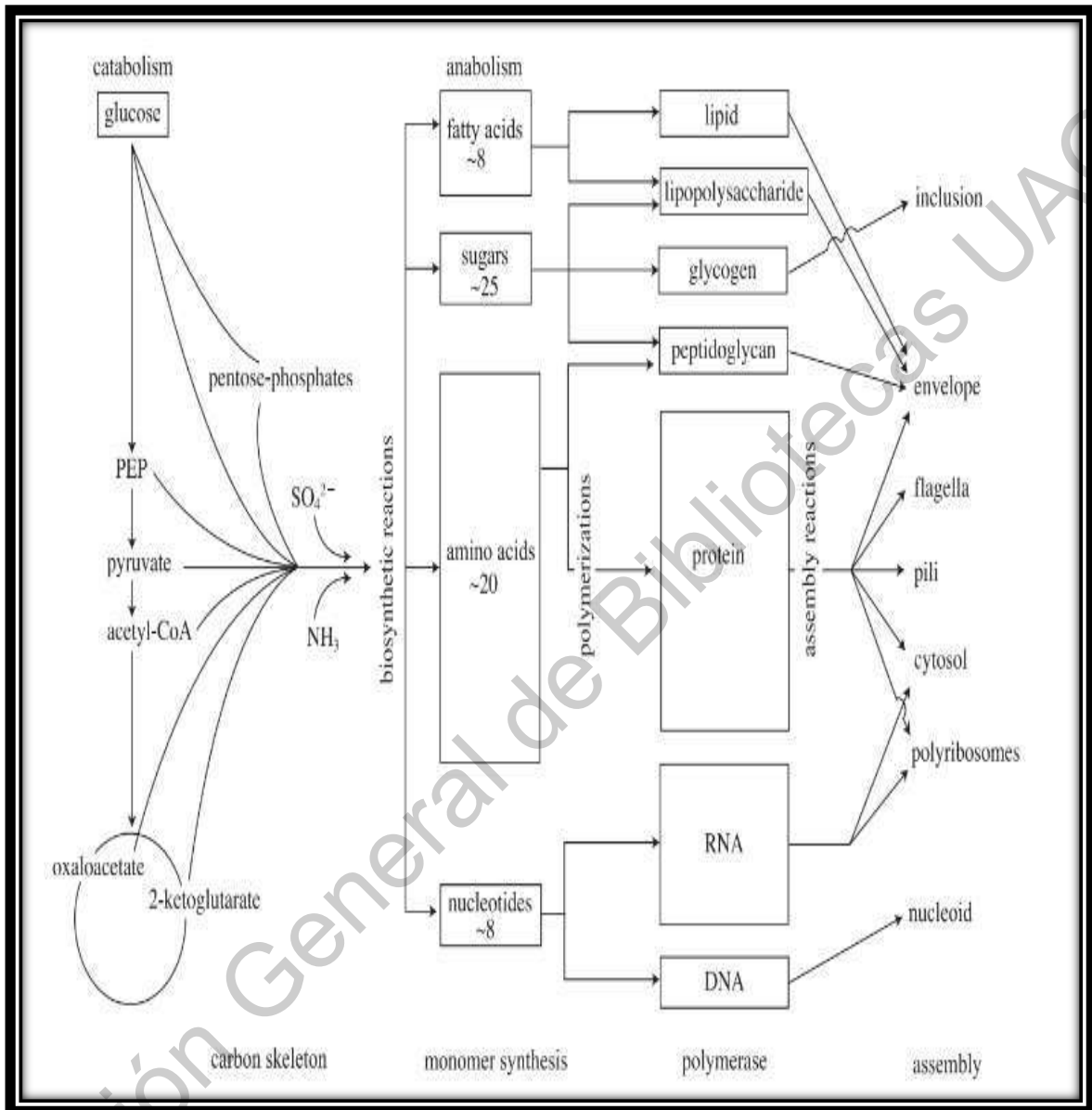


Figura 65. Catabolismo y anabolismo. Los monómeros son sintetizados a partir de esqueletos de carbono y sustancias inorgánicas como el amonio, sulfato y fosfato, que se obtiene del medio de crecimiento o del ambiente celular. Los monómeros son polimerizados en proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, fosfolípidos y otras macromoléculas (Kim, 2008).

5.1.1 Glucólisis (EMP)

La glucólisis es el primer paso en la degradación de la glucosa para extraer energía para el metabolismo celular (Figura 63).

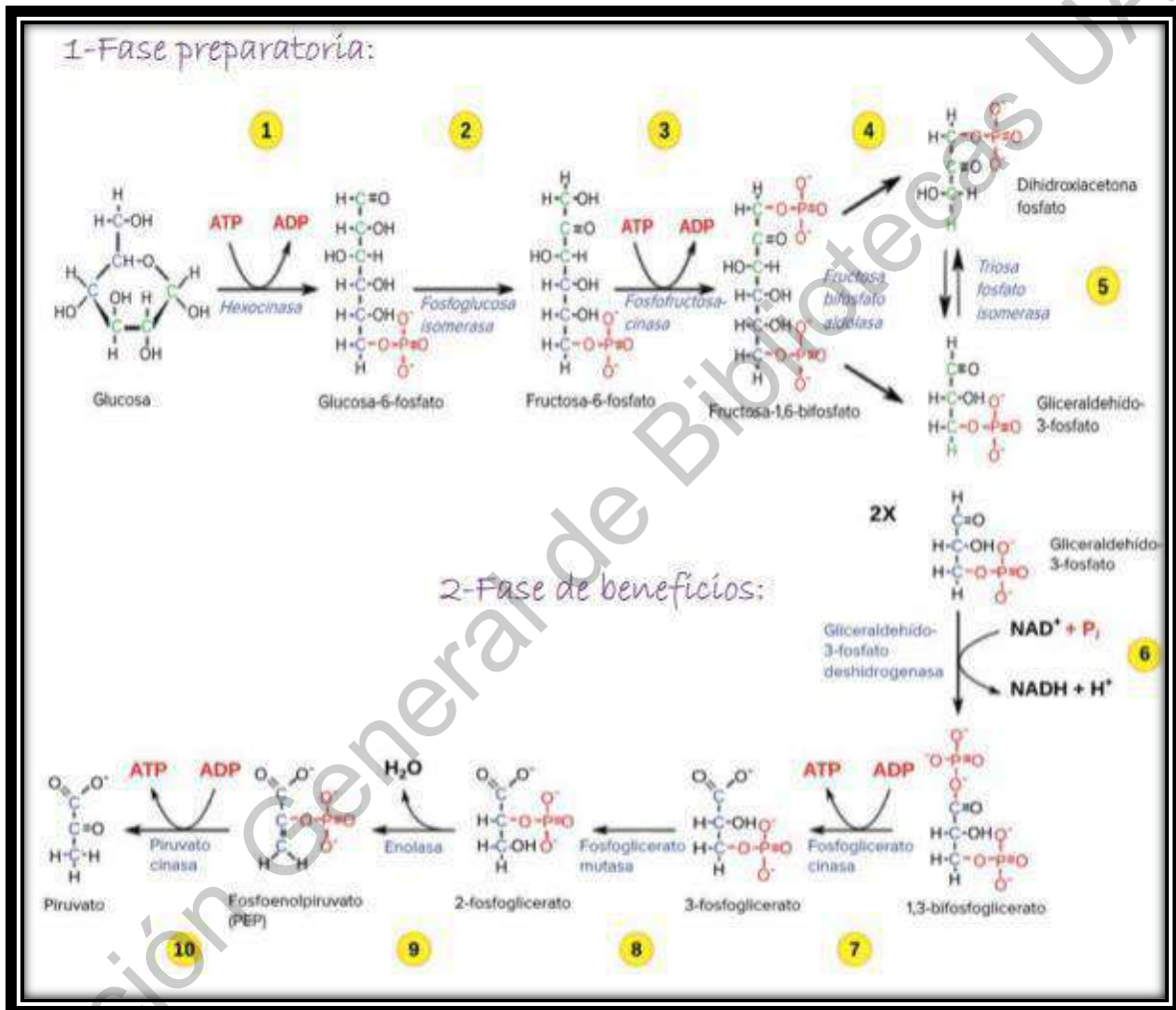
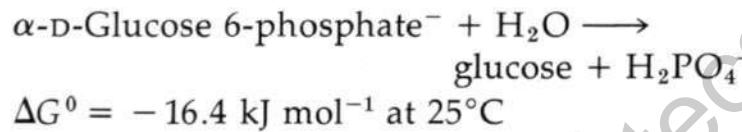
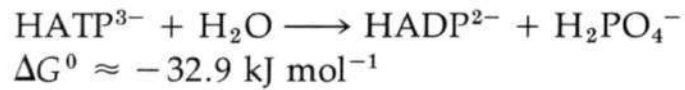
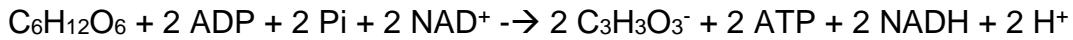
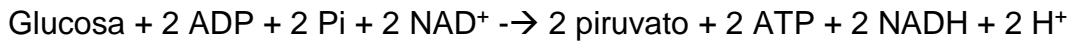


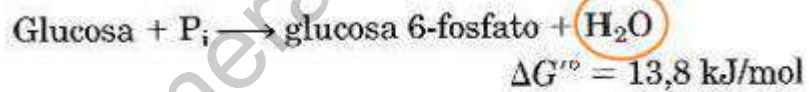
Figura 66. Glucólisis. Es una vía metabólica en ausencia de oxígeno que se realiza en Eucariontes y Procariontes (Doelle, 2010).

La glucólisis se compone de una fase que requiere energía (Figura 69), seguida de una fase que la libera (Figura 69), teniendo 10 reacciones. Ocurre en el citosol, es un proceso anaerobio, la glucosa se rompe en 2 piruvatos.



$$\Delta G^0_{\text{ATP}} - \Delta G^0_{\text{G6P}} = -16.5 \text{ kJ mol}^{-1}$$

La glucosa 6 fosfato es termodinámicamente estable, el grupo fosforil puede transferirse espontáneamente del ATP a la glucosa.



$$\Delta G'^{\circ} = 13,8 \text{ kJ/mol} + (-30,5 \text{ kJ/mol}) = -16,7 \text{ kJ/mol}$$

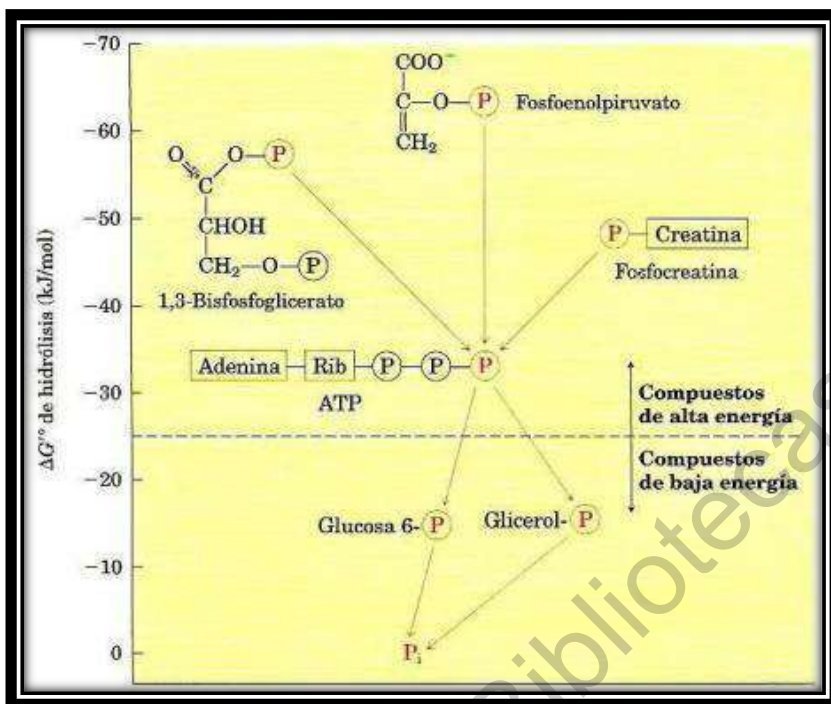
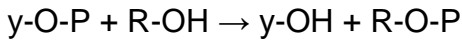


Figura 67. Intermediarios en la glucólisis. La ΔG de la hidrólisis permite apreciar los fosfatos de baja energía y fosfatos de alta energía (Lehninger, 2005).

Cuadro 8. Promedio de la energía libre de la hidrólisis de fosfato en algunos compuestos de interés biológico ATP (Wiley, 2008).

COMPUESTOS DE ALTA ENERGÍA	
Compuesto	Energía (kJ/mol) ΔG en hidrólisis
Fosfoenolpiruvato	(-61.9)
1,3-bifosfoglicerato	(-49.3)
Fosfocreatina	(-43.0)
ATP	(-30.5)
ADP	(-30.5)
Glucosa-1-fosfato	(-20.9)
Glucosa-6-fosfato	(-13.8)

También:



Si R-OH es agua, la reacción es hidrólisis.

El potencial de transferencia del enlace éster en y-O-P es de $-29.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. A cualquier enlace que tenga una energía libre mayor a $-29 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ se le denomina de alta energía.

Ácido fosfoenolpirúvico: La alta energía del PEP se debe a la dificultad para resonar en la molécula y que la formación de piruvato da una molécula más estable.

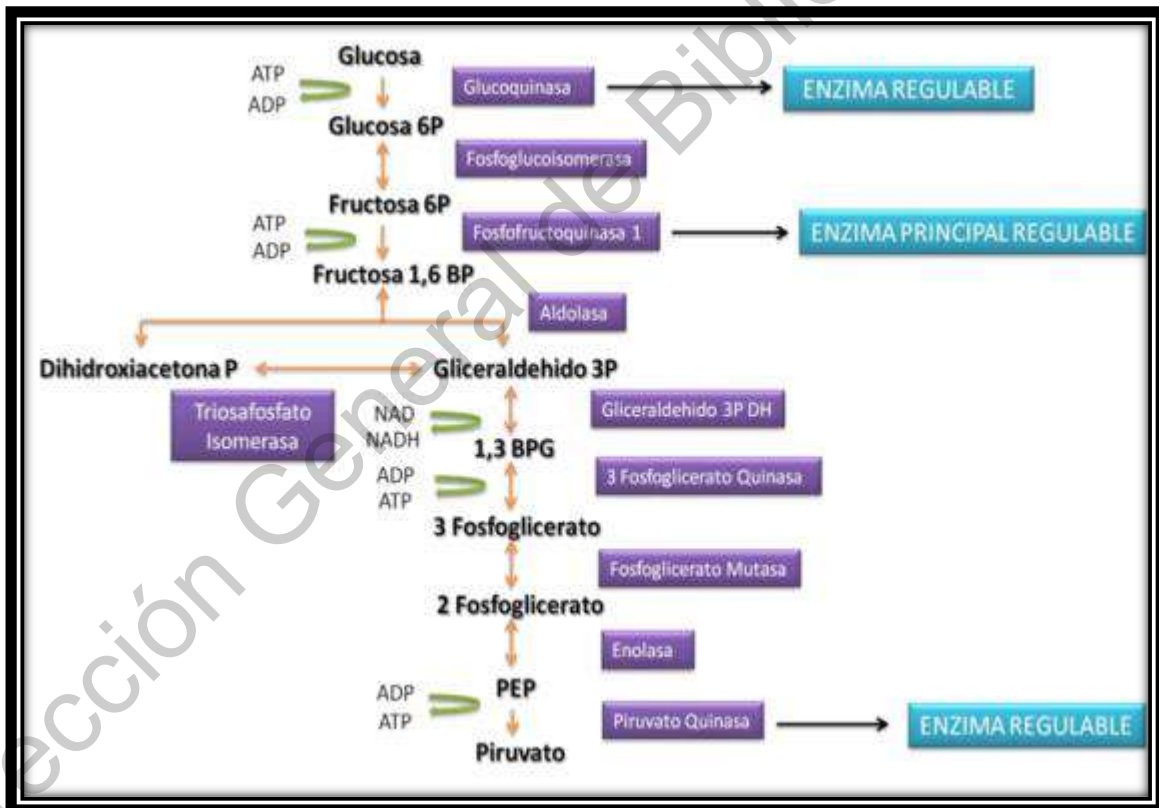


Figura 68. Glucólisis y las enzimas catalizadoras. Las siguientes enzimas sirven como catalizadoras: 1, Hexoquinasa; 2, Isomerasa; 3, Fosfofructoquinasa; 4, Fructosa-1,6-bifosfatoaldolasa; 5, Triosafosfato isomerasa; 6, Triosafosfato deshidrogenasa; 7, Fosfoglicerato quinasa; 8, Mutasa; 9, Enolasa; 10, Piruvato quinasa (White, 2007).

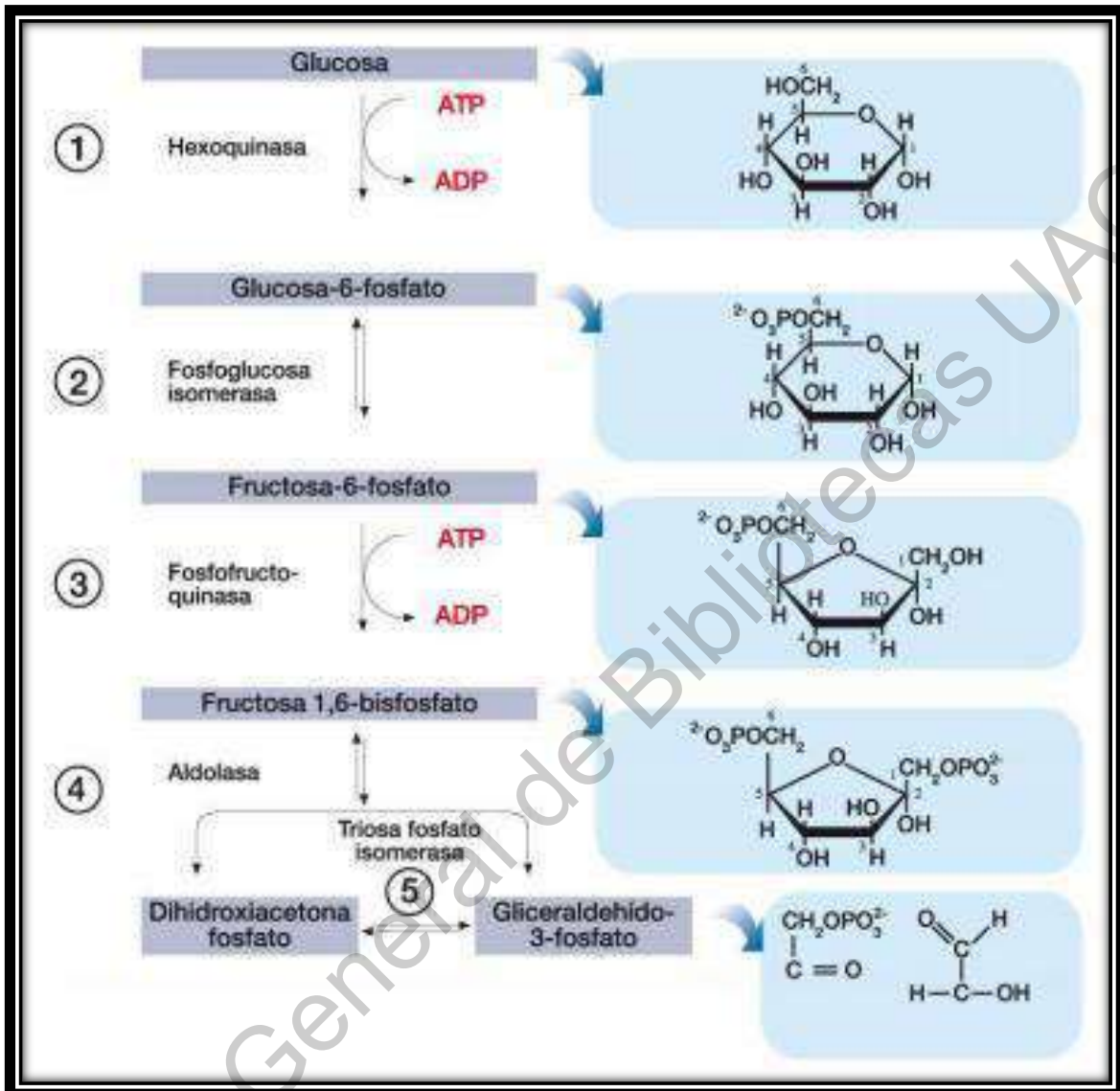


Figura 69. Parte 1 de la vía de la glucólisis. Adición de fosfato usando 2 ATP's (Lehninger, 2005).

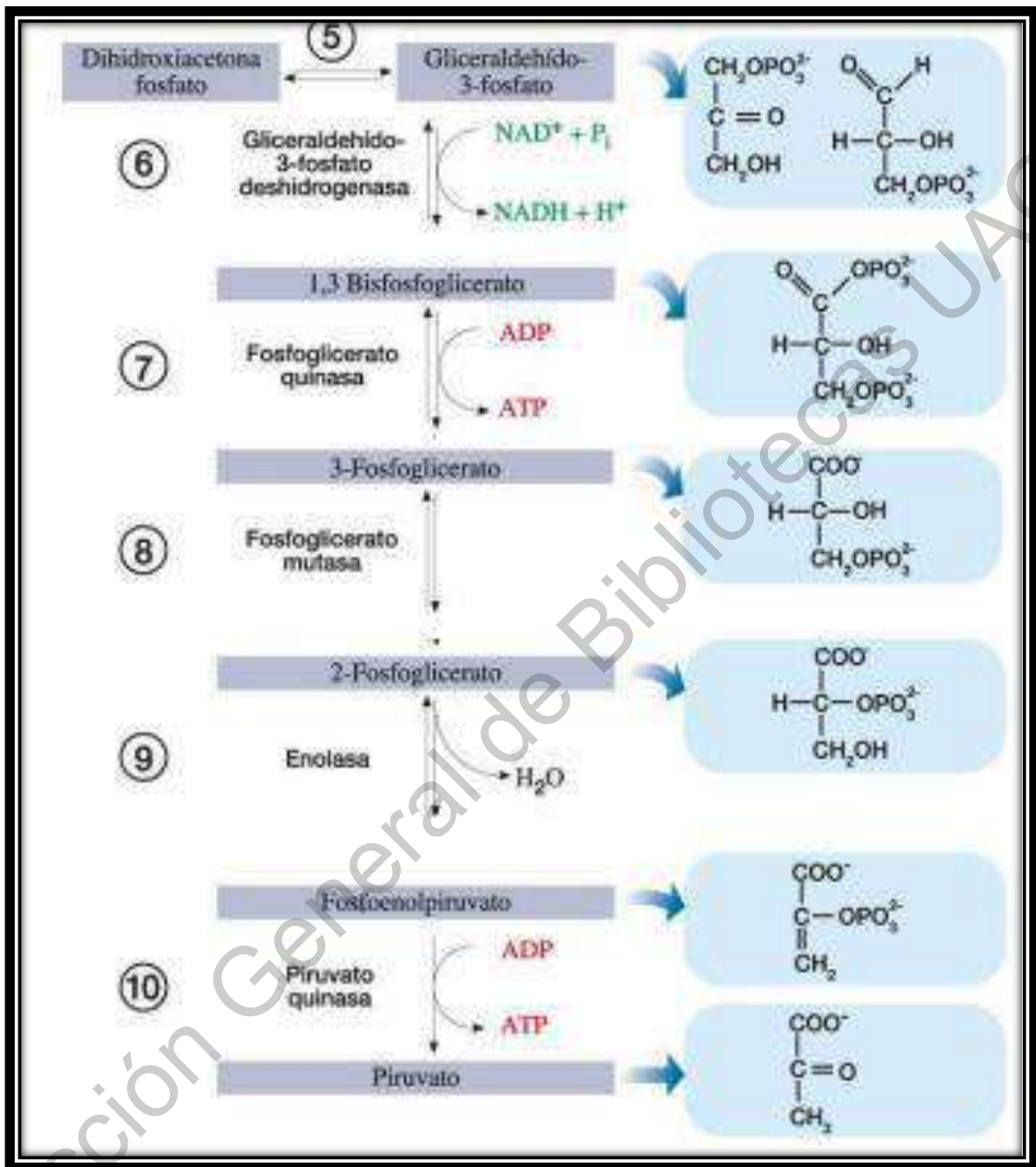


Figura 70. Parte 2 de la vía de la glucólisis. Transporte de electrones y remoción de fosfato, se forman 4 ATP'S y 2 NADH (Lehninger, 2005).

Cada una de las 10 reacciones de la glucólisis tiene una enzima propia y específica para catalizar (Figuras 71-80).

1.Reacción hexoquinasa

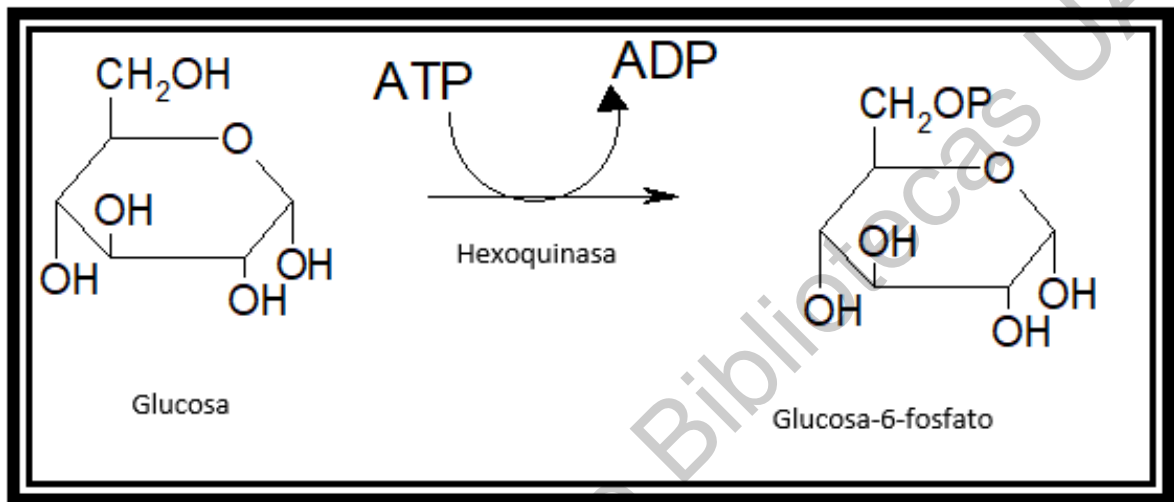


Figura 71. Reacción de hexoquinasa. Es una reacción irreversible, donde la hexoquinasa transfiere el fosfato. -16.7kJ (Kim, 2008).

2.Reacción hexosa fosfato isomerasa.

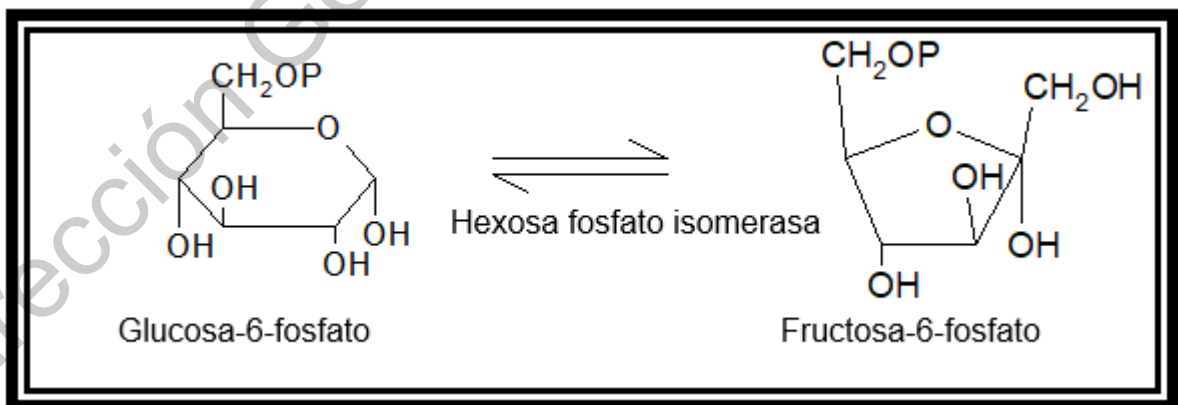


Figura 72. Reacción hexosa fosfato isomerasa. Se realiza una cetoaldol isomerización para convertir la glucosa en fructosa. 1.7kJ.ceto-aldol isomerización (Kim, 2008).

3.Reacción de la fosfofructocinasa

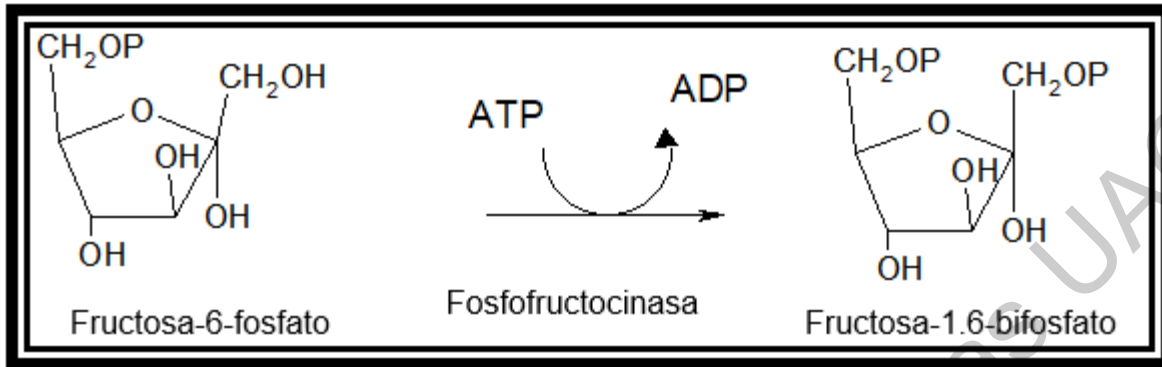


Figura 73. Reacción de la fosfofructocinasa. Un grupo fosfato se transfiere del ATP a la fructosa-6-fosfato y se produce fructosa-1,6-bisfosfato. Este paso lo cataliza la enzima fosfofructocinasa, que puede ser regulada para acelerar o frenar la vía de la glucólisis. Estimulado por ADP y AMP, Inhibido por ATP y ácidos grasos (Kim, 2008).

4.Reacción de la aldolasa

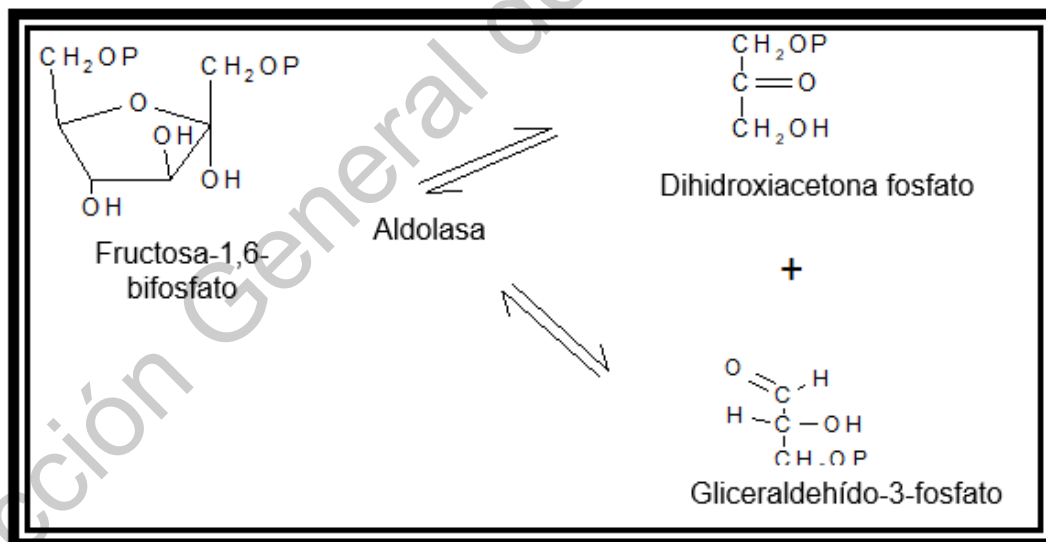


Figura 74. Reacción de aldolasa. La fructosa-1,6-bisfosfato se rompe para generar dos azúcares de tres carbonos: la dihidroxiacetona fosfato DHP y el gliceraldehído-3-fosfato. Estas moléculas son isómeros el uno del otro, pero solo el gliceraldehído-3-fosfato puede continuar directamente con los siguientes pasos de la glucólisis. 23.8kJ, (Kim, 2008).

5. Reacción triosa fosfato isomerasa.

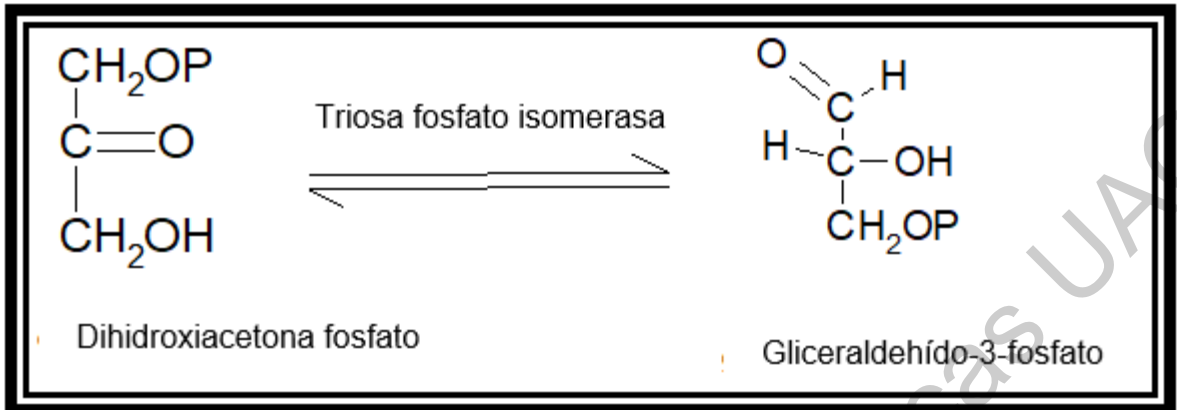


Figura 75. Reacción triosa fosfato isomerasa. La DHAP se convierte en gliceraldehído-3-fosfato. Ambas moléculas existen en equilibrio, pero dicho equilibrio "empuja" fuertemente hacia abajo, considerando el orden del diagrama anterior, conforme se va utilizando el gliceraldehído-3-fosfato. Es así que al final toda la DHAP se convierte en gliceraldehído-3-fosfato, (Kim, 2008).

6. Reacción gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

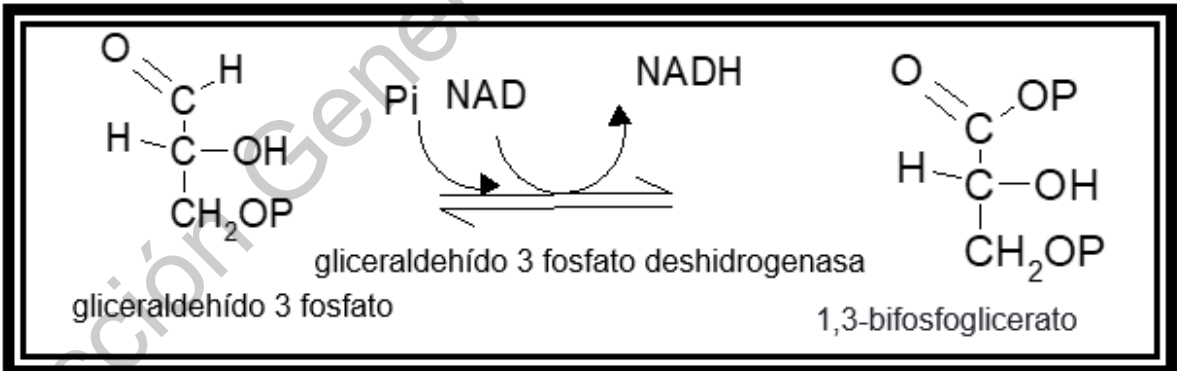


Figura 76. Reacción gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Dos semirreacciones ocurren simultáneamente: 1) la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato (uno de los azúcares de tres carbonos que se forma en la fase inicial), y 2) la reducción NAD^+ en NADH y H^+ . La reacción general es exergónica y libera la energía que luego se usa para fosforilar la molécula, lo que forma 1,3-bifosfoglicerato. 6.3kJ, (Kim, 2008).

7. Reacción fosfoglicerato cinasa

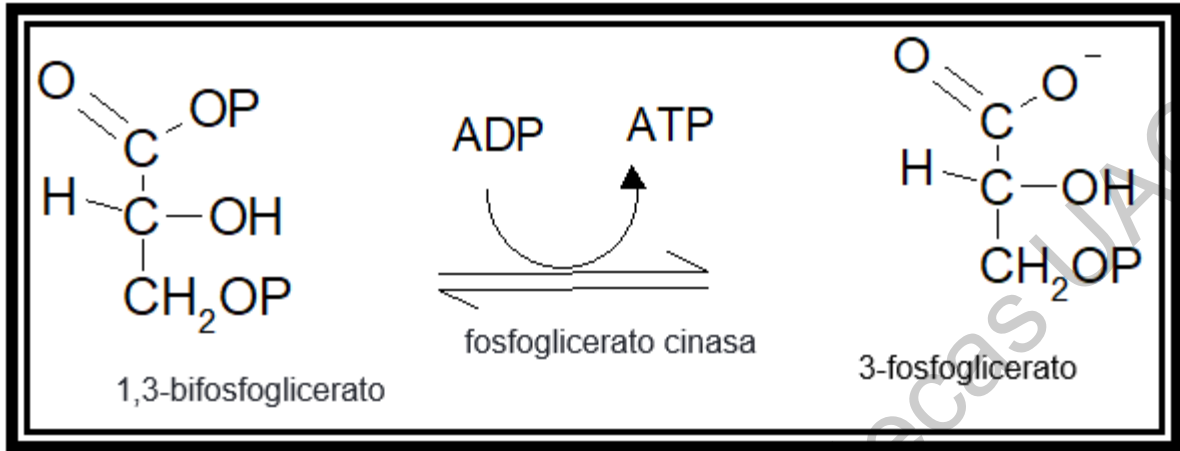


Figura 77. Reacción fosfoglicerato cinasa. El 1,3-bifosfoglicerato dona uno de sus grupos fosfato al ADP lo transforma en una molécula de ATP y en el proceso se convierte en 3-fosfoglicerato. 6.3kJ, (Kim, 2008).

8. Reacción fosfoglicerato mutasa



Figura 78. Reacción fosfoglicerato mutasa. El 3-fosfoglicerato se convierte en su isómero, el 2-fosfoglicerato. -18.5kJ, (Kim, 2008).

9. Reacción enolasa

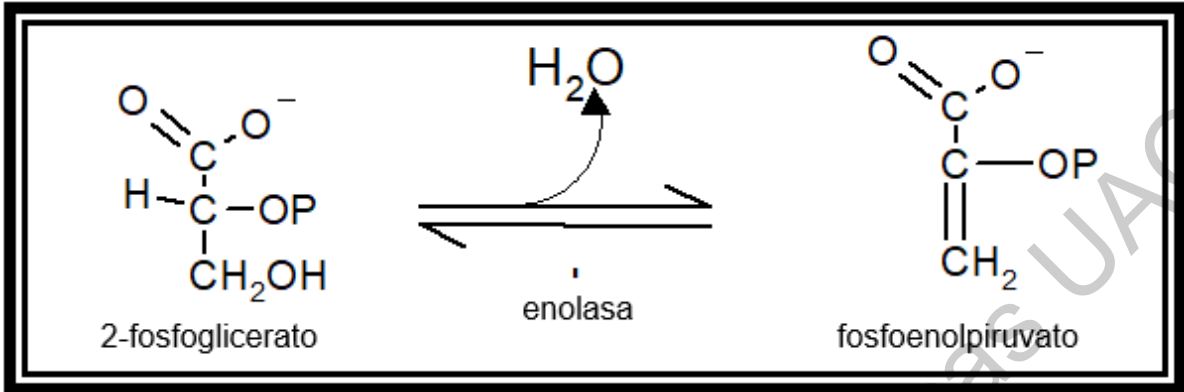


Figura 79. Reacción enolasa. El 2-fosfoglicerato pierde una molécula de agua y se transforma en fosfoenolpiruvato (PEP). El PEP es una molécula inestable, lista para perder su grupo fosfato en el paso final de la glucólisis. 7.5 kJ, (Kim, 2008).

10. Reacción piruvato cinasa

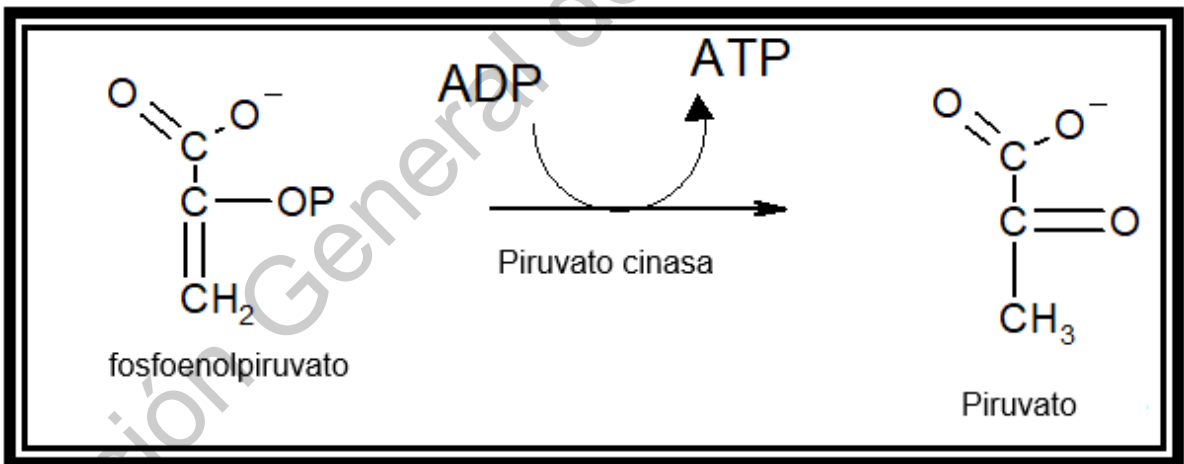


Figura 80. Reacción piruvato cinasa. PEP de inmediato dona su grupo fosfato al ADP, y se forma la segunda molécula de ATP. Al perder su fosfato, PEP se convierte en piruvato, el producto final de la glucólisis, (Kim, 2008).

Cuadro 9. Cambios en la energía libre de Gibbs en la glucólisis en el músculo del corazón ATP (Wiley, 2008).

Enzima	Tipo de reacción	ΔG° en kJ mol ⁻¹ (kcal mol ⁻¹)	ΔG en kJ mol ⁻¹ (kcal mol ⁻¹)
Hexoquinasa	Transferencia de fosforilo	-16,7 (-4,0)	-33,5 (-8,0)
Fosfoglucosa isomerasa	Isomerización	+1,7 (+0,4)	-2,5 (-0,6)
Fosfofructoquinasa	Transferencia de fosforilo	-14,2 (-3,4)	-22,2 (-5,3)
Aldolasa	Escisión aldólica	+23,8 (+5,7)	-1,3 (-0,3)
Triosa fosfato isomerasa	Isomerización	+7,5 (+1,8)	+2,5 (+0,6)
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Fosforilación acoplada a oxidación	+6,3 (+1,5)	-1,7 (-0,4)
Fosfoglicerato quinasa	Transferencia de fosforilo	-18,8 (-4,5)	+1,3 (+0,3)
Fosfoglicerato mutasa	Migración interna de fosforilo	+4,6 (+1,1)	+0,8 (+0,2)
Enolasa	Deshidratación	+1,7 (+0,4)	-3,3 (-0,8)
Piruvato quinasa	Transferencia de fosforilo	-31,4 (-7,5)	-16,7 (-4,0)

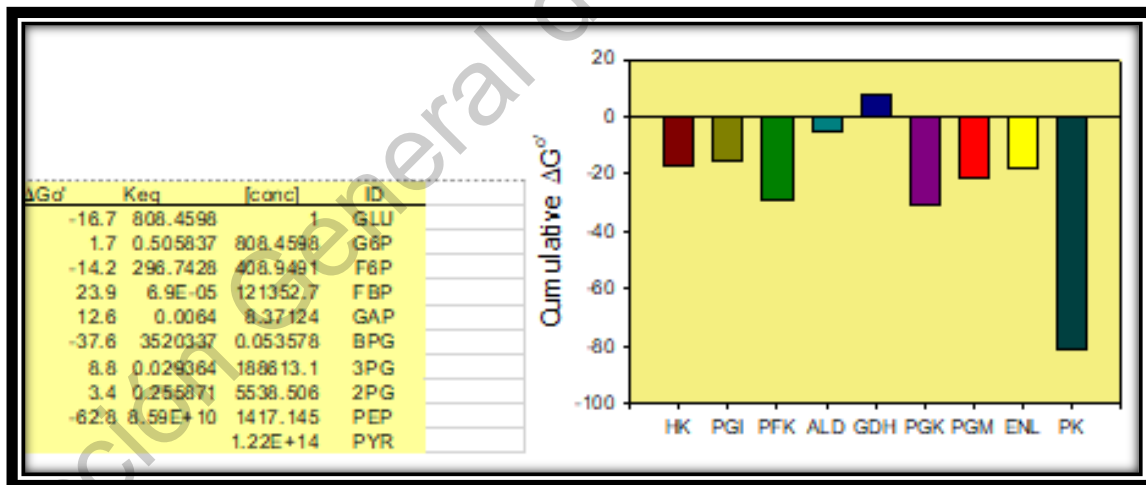


Figura 81. Cambios en la energía libre de Gibbs (Magidan, 2015).

Los productos netos de la glucólisis son, por cada glucosa: 2 piruvatos, 2 NADH, 2 ATP (Figura 82).

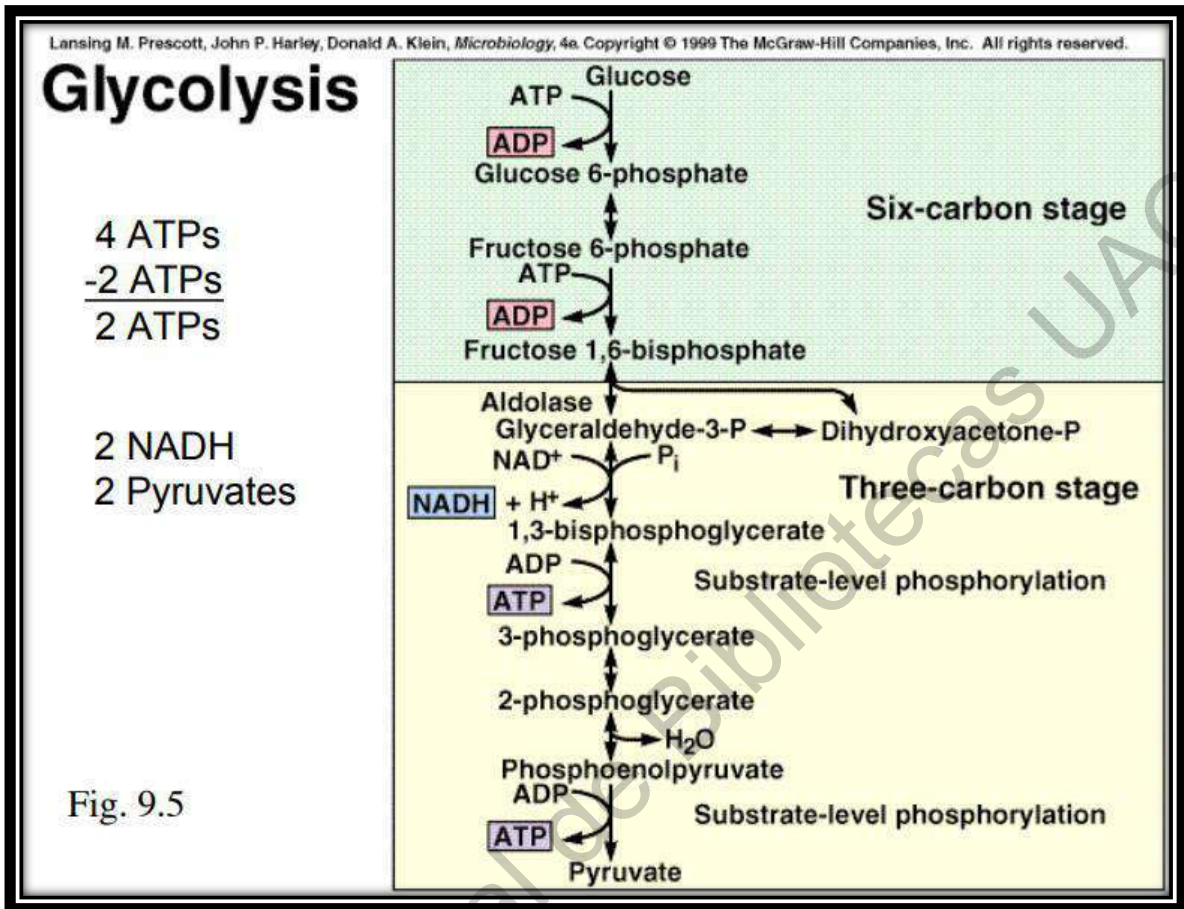


Figura 82. Glucólisis balance general (Prescott, 1999).

5.1.2 Vías alternas a la glucólisis

La vía de la glucólisis (EMP), se encuentra en todos los eucariontes y en muchas especies de bacterias. Sin embargo, muchos tipos de bacterias no poseen la enzima fosfofructocinasa-1 y no pueden convertir la glucosa-6P a fructosa 1,6 difosfato, por lo que existen en vías alternas: vía hexosa monofosfato, vía Entner-Doudoroff y la vía fosfocetolasa (Figura 83).

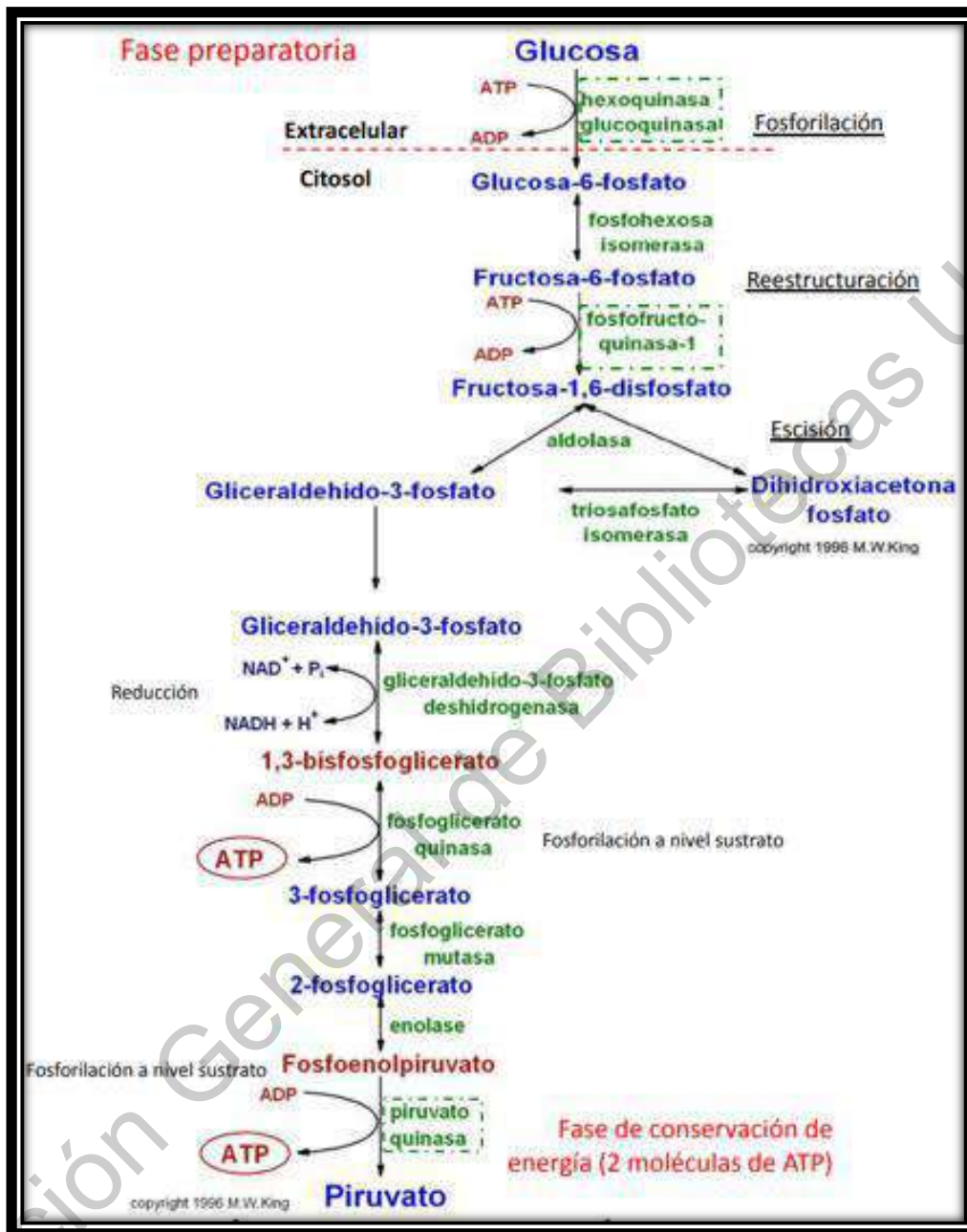


Figura 83. Oxidación de la glucosa por la vía de Embden-Mayerhof-Parnas. La glucosa es fosforilada a glucosa 6-fosfato por PEP: glucosa fosfotransferasa (1) durante la translocación grupal (Sistema fosfotransferasa, PTS) o por hexoquinasa (2) después de la absorción por vía transporte activo. 3, glucosa-6-fosfato-isomerasa; 4, fosfofructoquinasa; 5 fructosa difosfato aldosa; 6, triosa-fosfato isomerasa; 7, gliceraldehído-3-fosfotodhidrogenasa, 8, 3-fosfoglicerato cinasa; 9, fosfoglicerato mutasa; 10, enolasa; 11, piruvato cinasa, (White, 2007).

5.1.2.1 Vía hexosa monofosfato (HMP)

La vía hexosa monofosfato también conocida como vía de las pentosas (Figura 84) produce los precursores de la ribosarriosa en los ácidos nucleicos y provee de eritosa fosfato como precursor de aminoácidos aromáticos (Figura 85-87). Esta vía en la mayor fuente de electrones de la biosíntesis y varias reacciones las comparte con el ciclo de Calvin.

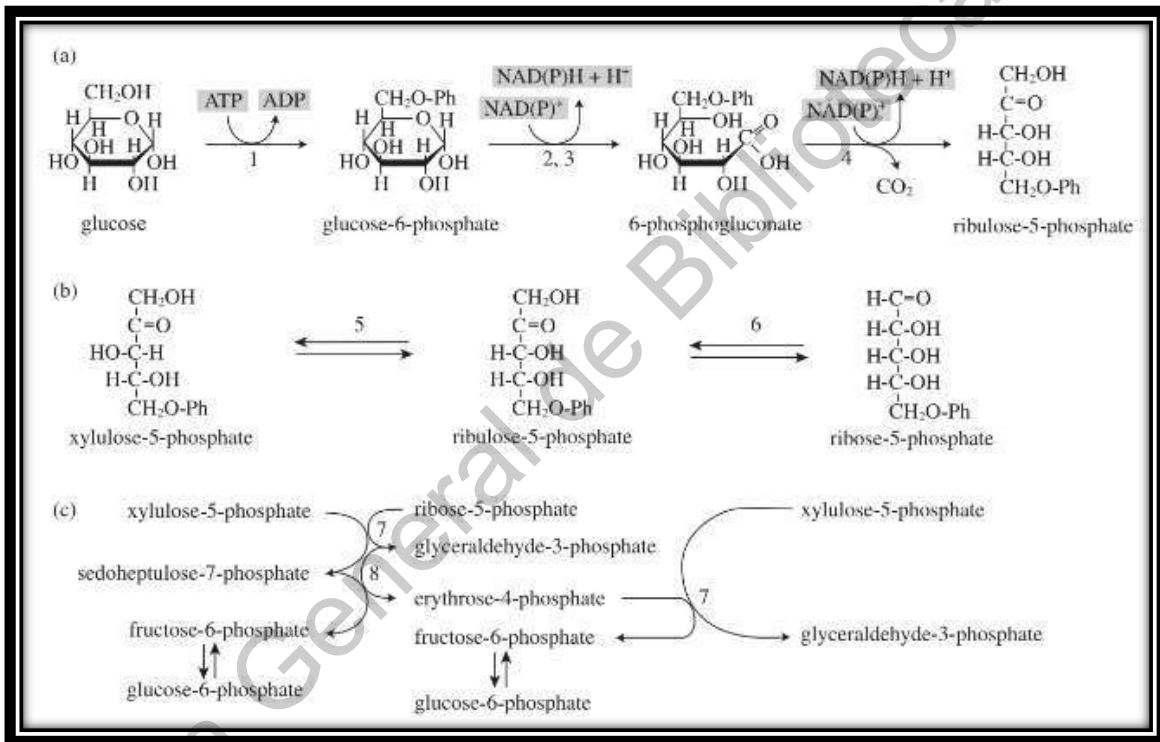


Figura 84. Vía Hexosa Monofosfato (Pentosa fosfato). La glucosa es oxidada a ribulosa-5-fosfato acoplada a la reducción del NADPH (a). La isomerasa y la epimerasa convierte la ribulosa-5-fosfato a ribosa-5-fosfato y Xilulosa-5-fosfato (b). La trasaldolasa y la transcetolasa reorganiza la pentosa-5-fosfato en glucosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato involucrando eritrosa-4-fosfato (c). La síntesis de nucleótidos comienza con ribosa-5-fosfato, los aminoácidos aromáticos son producidos a partir de eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato. NADPH producido es el suministro del poder reductor durante los procesos biosintéticos. 1, hexocinasa; 2, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa; 3, lactonasa; 4, 6-fosfogluconato

dehidrogenasa; 5, ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa; 6, ribosa-5-fosfato isomerasa; 7, transketolasa; 8, transaldolasa, (White, 2007).

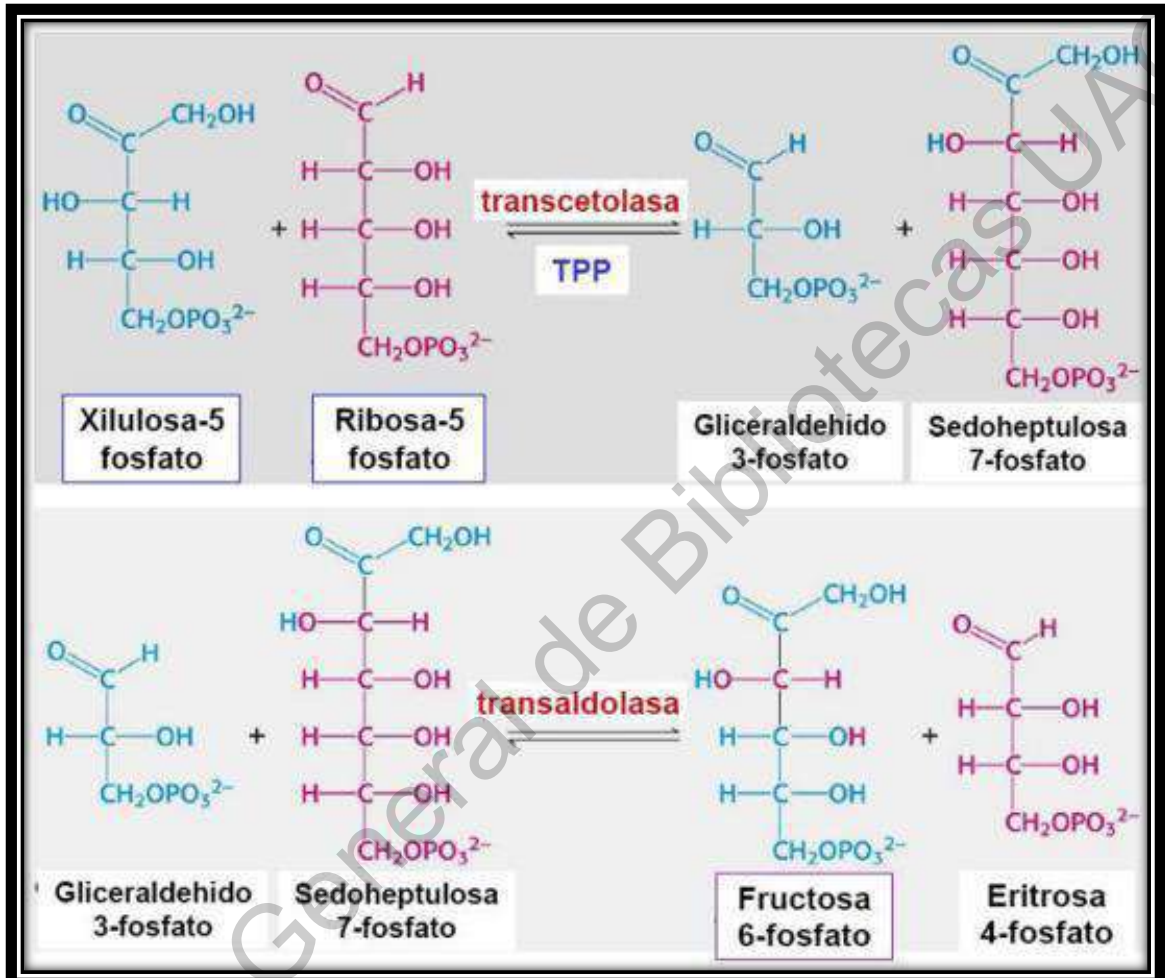


Figura 85. Reacción de la transketolasa y reacción transaldolasa (Prescott, 1999).

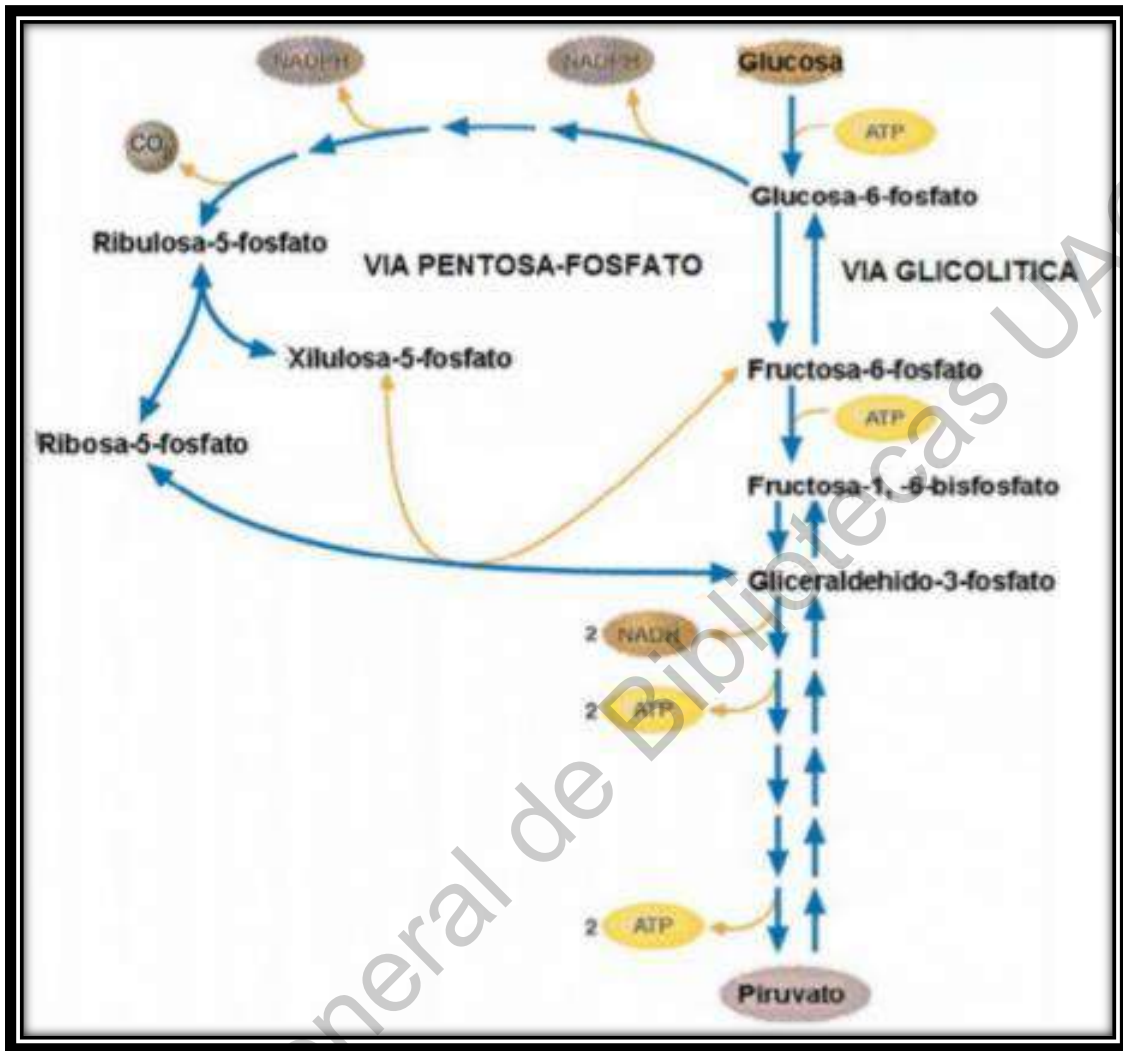


Figura 86. Relación glicolisis/pentosa fosfato. El balance global será: $6 \text{ G6P} + 12 \text{ NADP}^+ \rightarrow 5 \text{ F6P} + 6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ NADPH}$. En la fase no oxidativa se produce GAP y fructosa-6-P. Estos pueden ingresar a la ruta glicolítica, donde se producirá la síntesis de 2 ATP (Whiley, 2008).

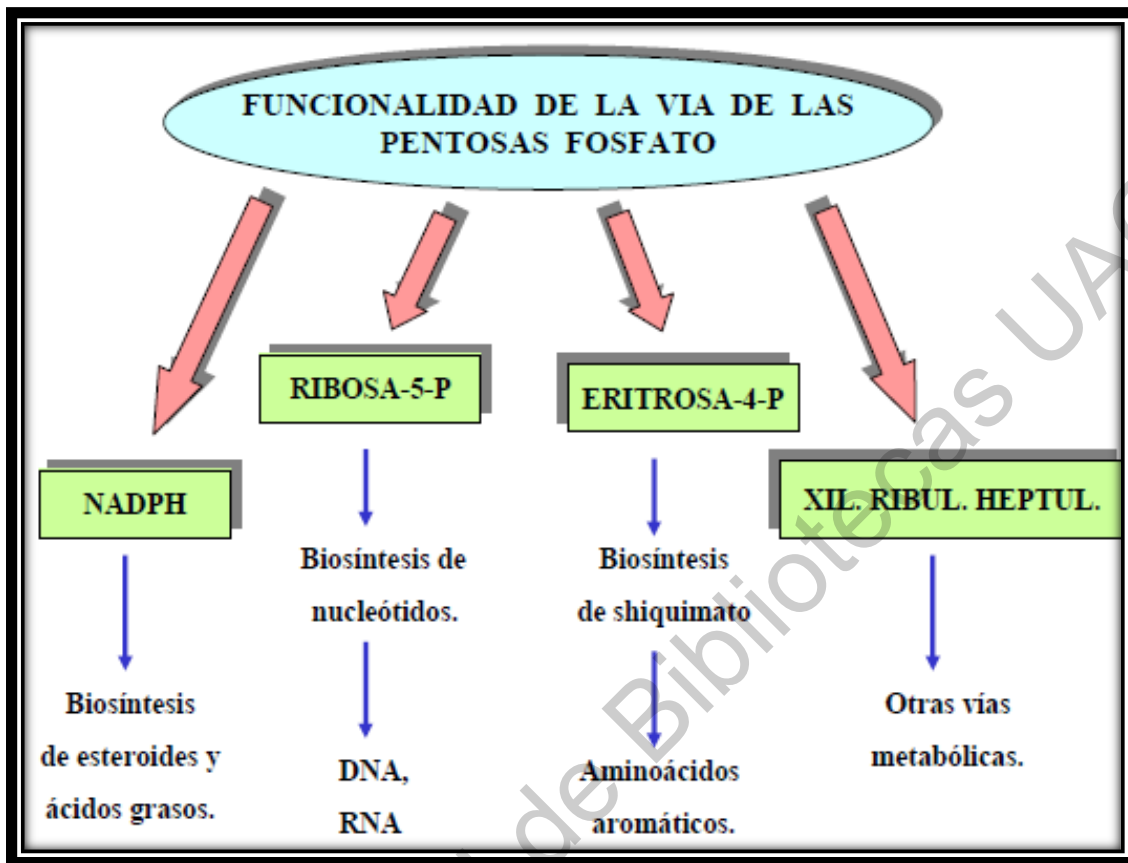


Figura 87. Puntos clave de la vía de la pentosa fosfato (González, 2004).

5.1.2.2 Vía Entner-Doudoroff (EDP)

En esta vía la glucosa-6-fosfato es convertida a piruvato y Gliceraldehído-3-fosfato por la deshidratación poco usual del 6-fosfogluconato para formar 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (Figuras 88 y 89).

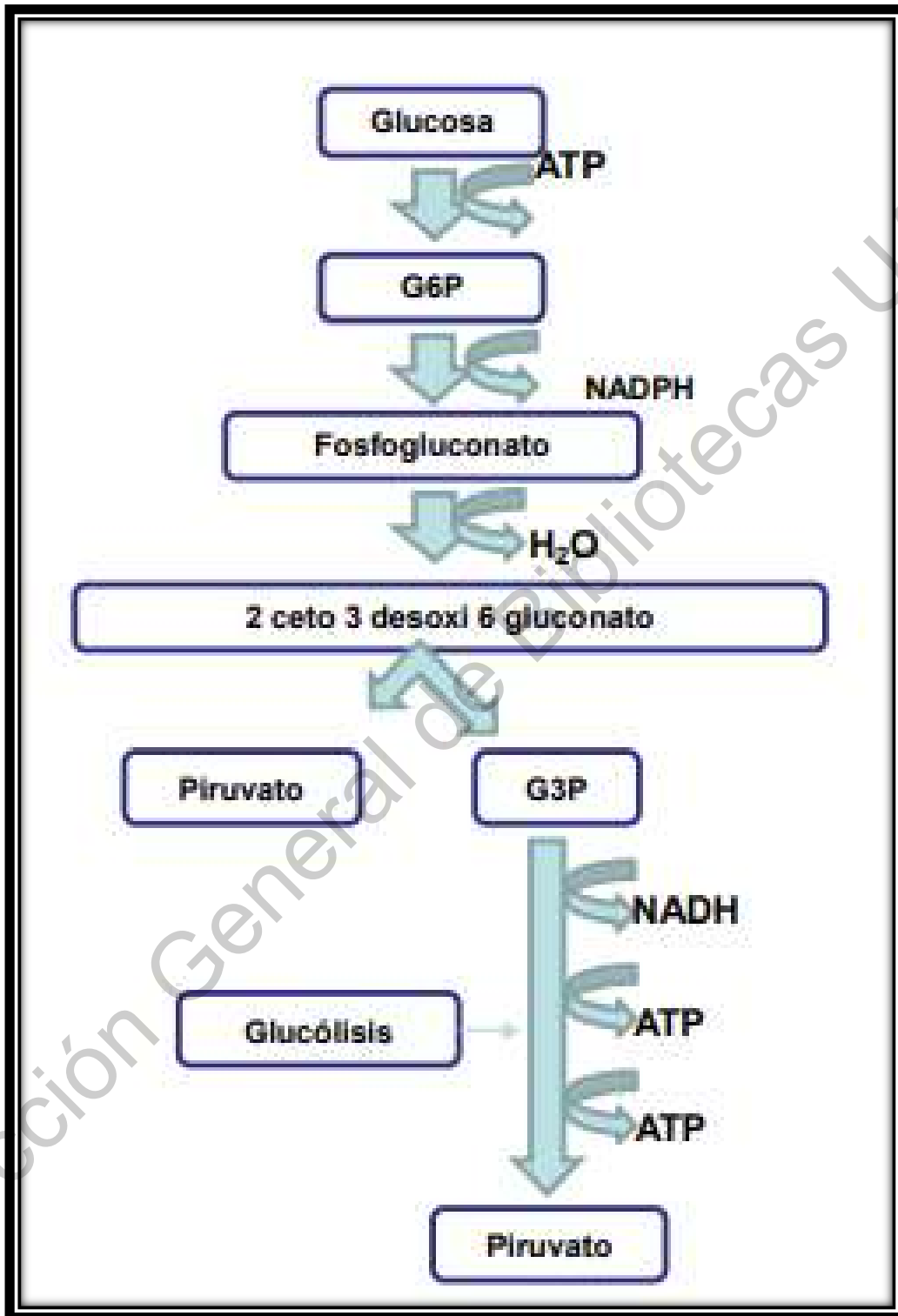


Figura 88. Vía Entner-Doudoroff (Prescott, 1999).

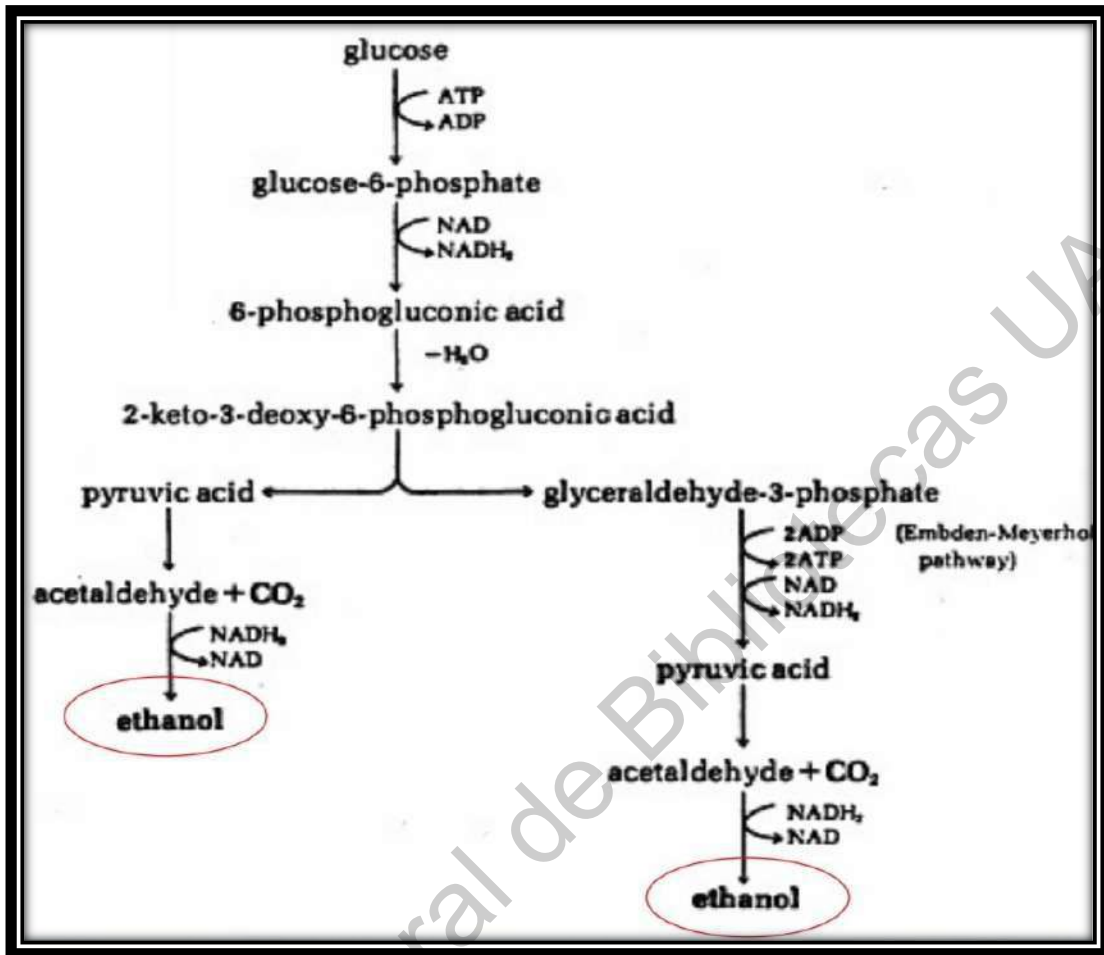


Figura 89. Productos de la Vía Entner-Doudoroff. Produce 1 piruvato, 1 gliceraldehido-3-fosfato por glucosa, 1 gliceraldehido-3-fosfato-piruvato y el producto neto son 2 etanol, 2 CO₂, 1 ATP por glucosa (Prescott, 1999).

5.1.2.2 Vía fosfoacetolasa

Vía de Warburg-Dickens o vía de la fosfoacetolasa. Se presenta en bacterias que no poseen la enzima fructosa-1,6-fosfato-aldolasa propia de la ruta de la glucólisis, y deben formar una pentosa, produciendo reacciones de deshidrogenación. Algunos microorganismos fermentadores como *Lactobacillus* spp utilizan la vía fosfoacetolasa o Heterolactato para producir ácido heteroláctico. En esta ruta, la fosfoacetolasa rompe a la pentosa y da lugar a dos ramas que llevan a la formación de lactato y etanol (Fermentación heteroláctica) (Figura 90).

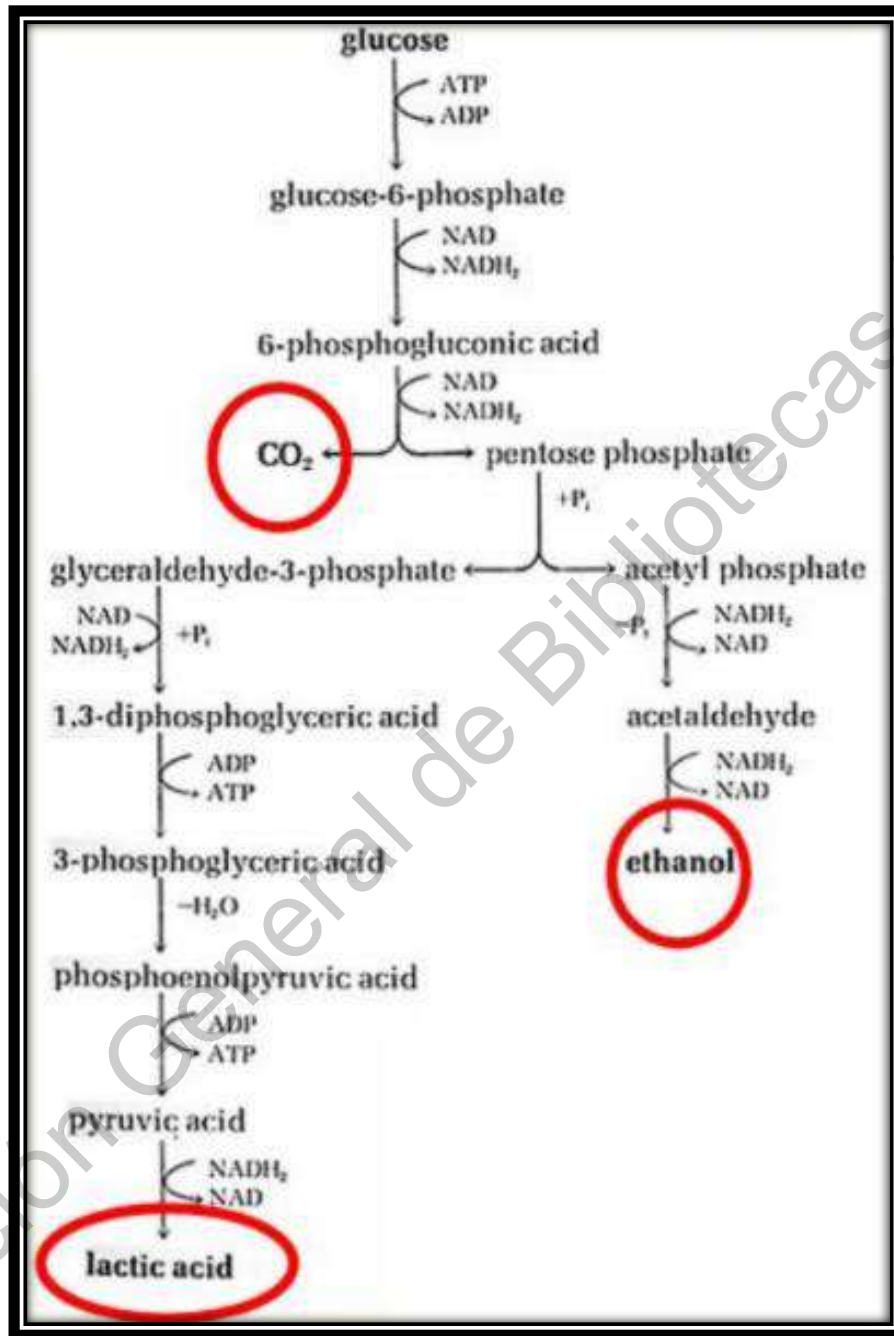


Figura 90. Vía fosfoacetolasa. La glucosa-6-fosfato se oxida a ácido-6-fosfogluconico que es descarboxilado para posteriormente generar la pentosa fosfato. La fosfoacetolasa corta a la pentosa fosfato para generar gliceraldehido-3-fosfato y acetil fosfato. El Gliceraldehído se convierte en ácido láctico por la acción de las enzimas de la glicólisis y el acetil fosfato se reduce a etanol (Prescott, 1999).

5.1.3 Fermentaciones

La relación de los productos formados y los sustratos consumidos es constante en algunas fermentaciones como la de etanol y la de homolactato. Las fermentaciones con proporciones constantes son llamadas lineales mientras que las otras vías de fermentación ramificada (Figura 91). Una vía ramificada produce más ATP y productos oxidantes que una vía lineal para producir más productos oxidantes una proporción de los portadores de electrones reducidos como el NAD(P)H debe oxidarse junto con la reducción de H_p a H_2 .

La formación de productos en una vía ramificada está dictada por las condiciones ambientales de crecimiento, especialmente el hidrógeno parcial presión (Figura 94-102).

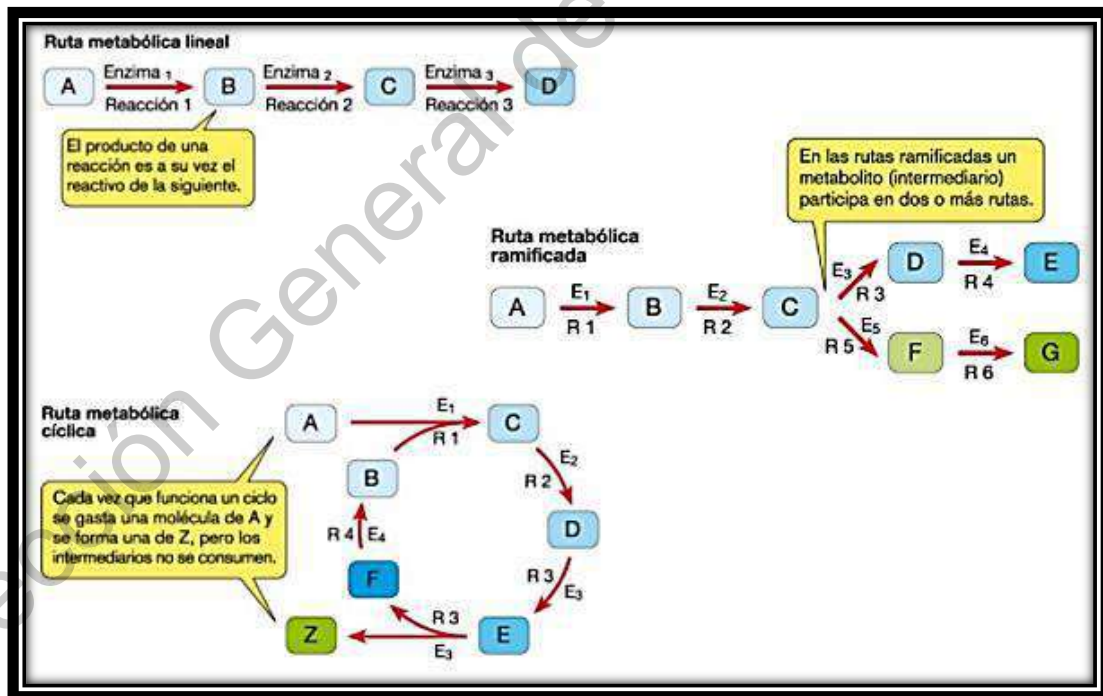


Figura 91. Catabolismo lineal y ramificado. Comparación de un catabolismo lineal que tiene una eficiencia termodinámica constante de la síntesis de ATP con un catabolismo ramificado que tiene una variable eficiencia, (Thauer, 1977).

5.1.3.1 Fermentación alcohólica

La fermentación de etanol es un ejemplo de una vía fermentativa lineal, y se forma más de un producto en la fermentación acetato-butirato por *Clostridium*. En una vía fermentativa ramificada, se puede generar más ATP cuando los protones se utilizan como receptor de electrones (Figuras 92 y 93).

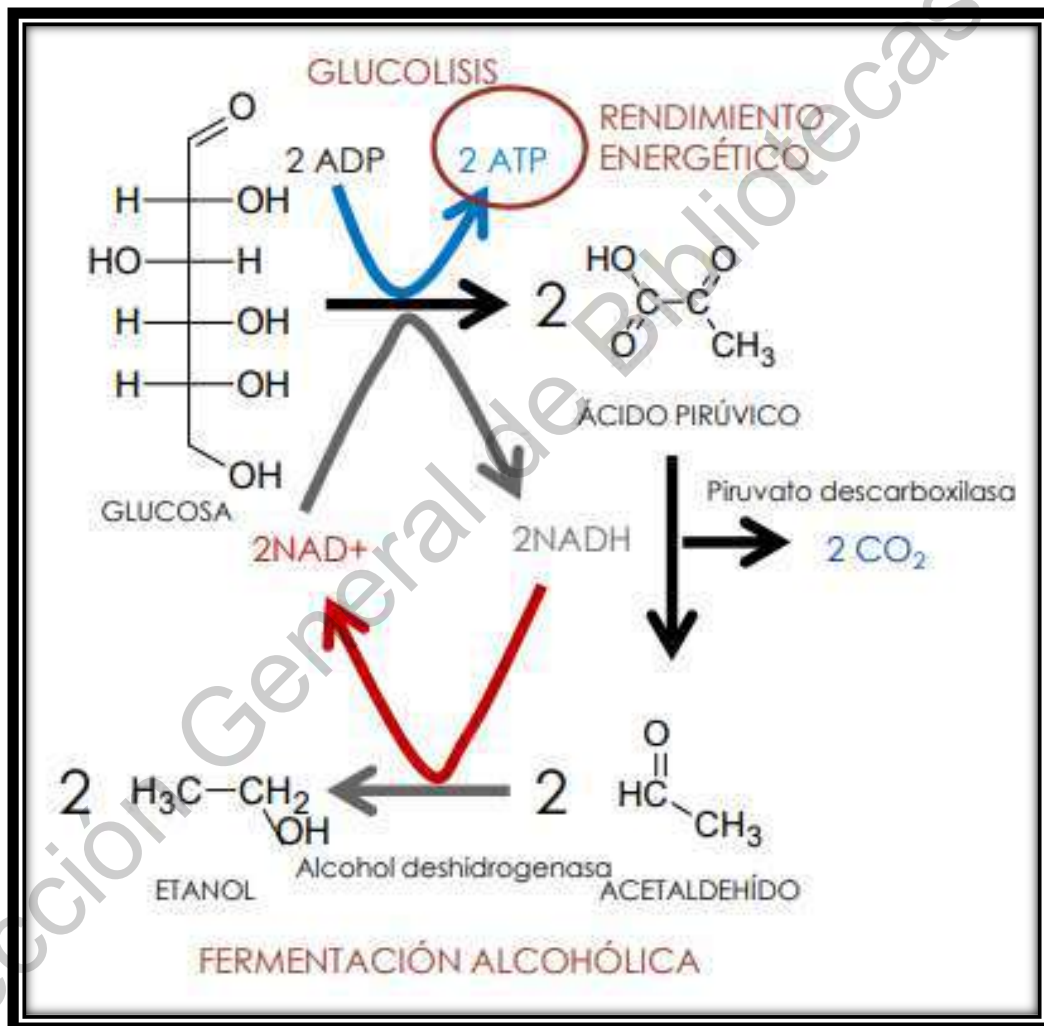


Figura 92. Fermentación etanólica en *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. 1–6, vía EMP; 7, piruvato descarboxilasa; 8, alcohol deshidrogenasa; 9, vía ED. *Saccharomyces cerevisiae* produce 2 ATP de 1 molécula de hexosa pero sólo 1 ATP en *Zymomonas mobilis*.

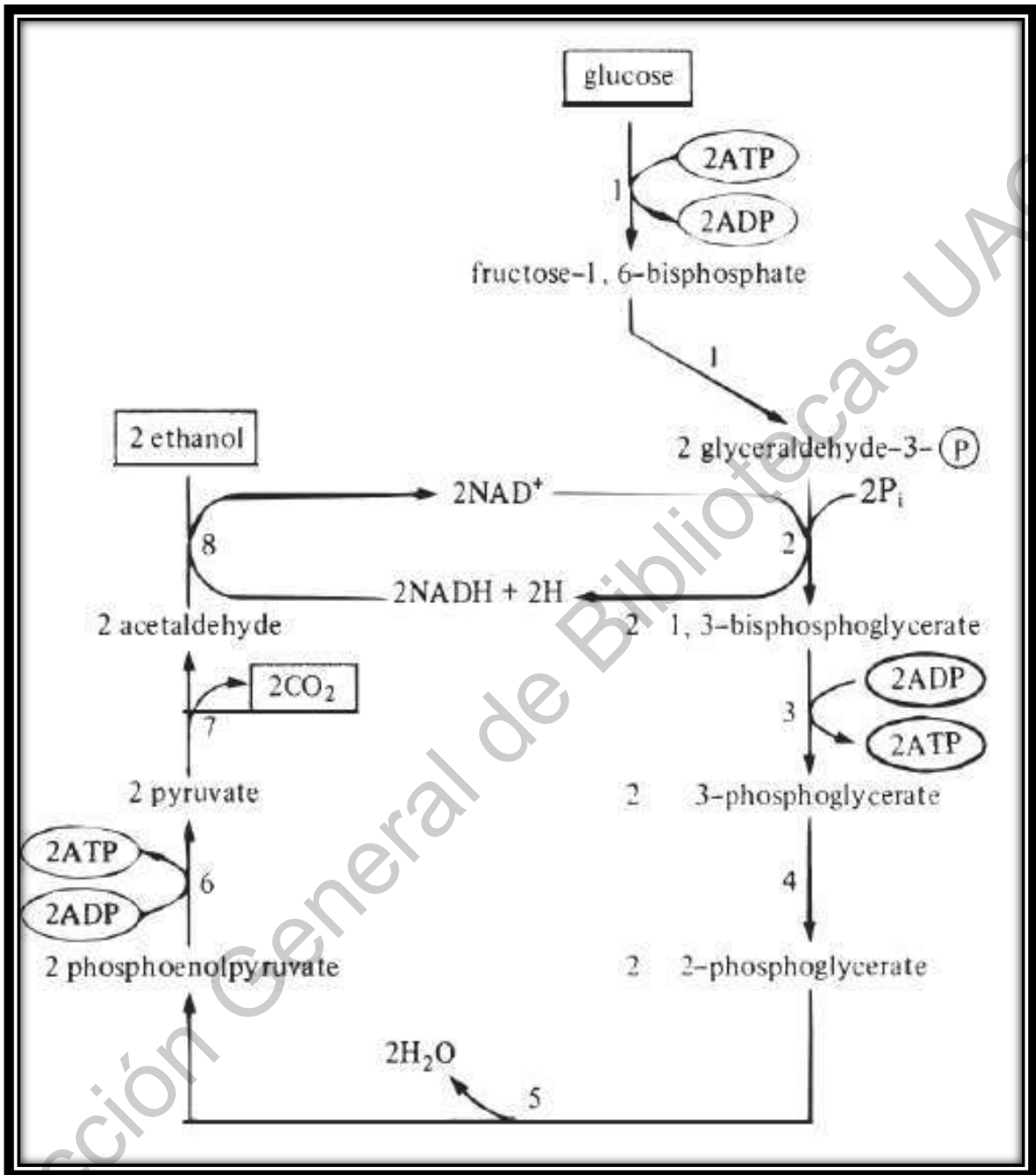


Figura 93. Fermentación de glucosa a etanol y CO₂ por levaduras. 1, Enzimas iniciales de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas; 2, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 3, 3-fosfoglicerato quinasa; 4, Fosfoglicerato mutasa; 5, Enolasa; 6, Piruvato quinasa; 7, Piruvato descarboxilasa; 8, Alcohol deshidrogenasa (Gottschalk, 1986).

5.1.3.2 Fermentación ácido láctica (homoláctica y heteroláctica)

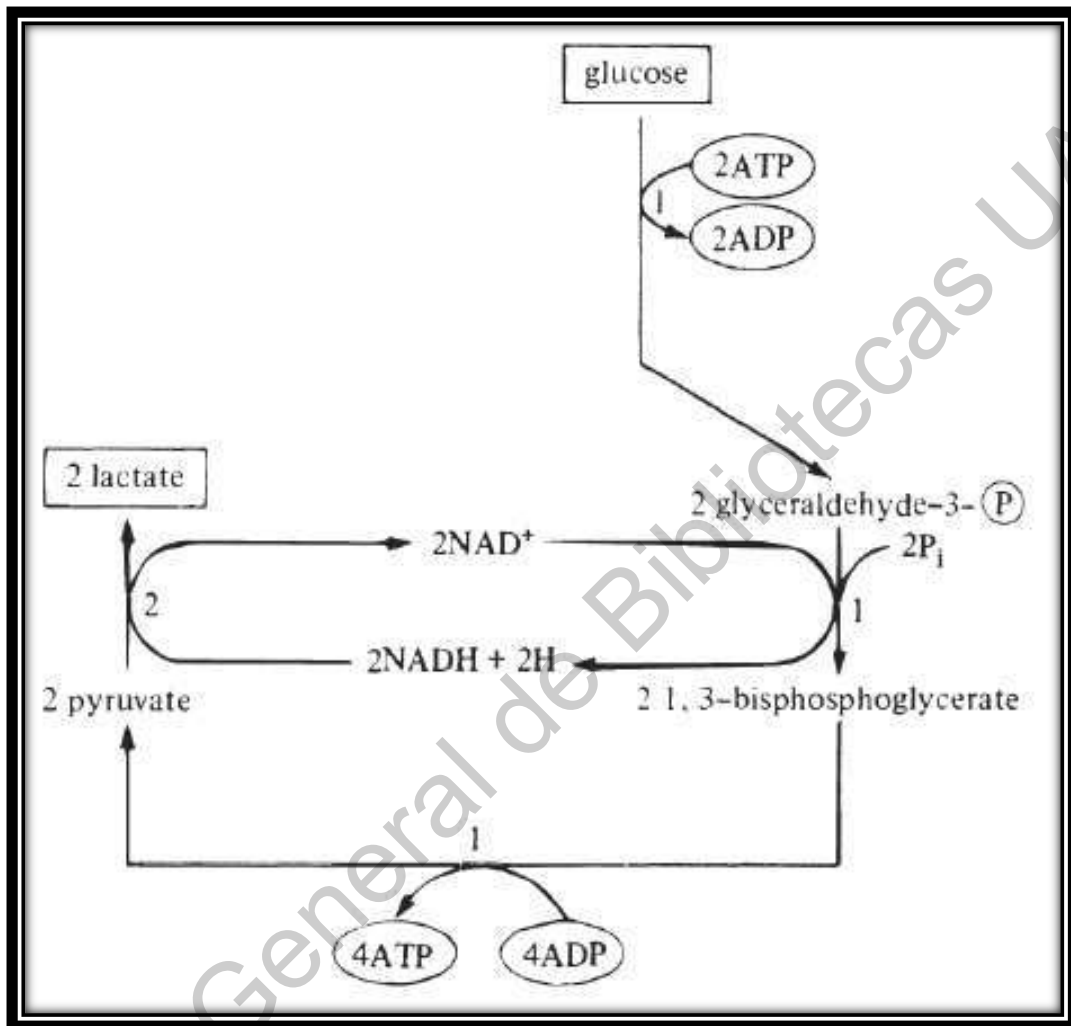


Figura 94. Formación de lactato a partir de glucosa por la vía homofermentativa. 1, Enzimas de la ruta Embden-Meyerhof-Parnas; 2, Lactato deshidrogenasa, (Gottschalk, 1986).

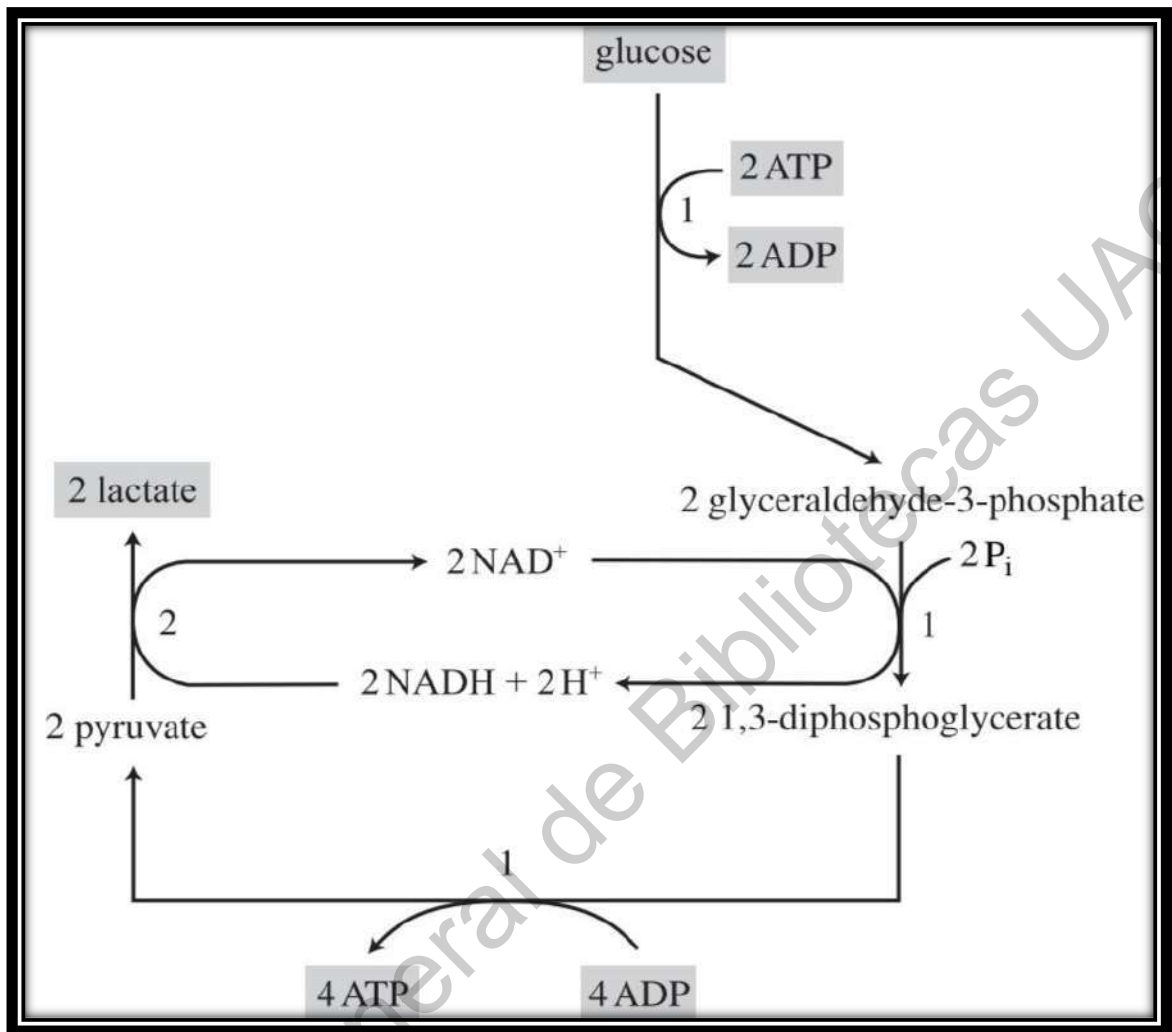


Figura 95. Fermentación ácido láctica, homofermentativa. 1, vía EMP; 2, lactato deshidrogenasa, (Gottschalk, 1986).

5.1.3.3 Fermentación butírica

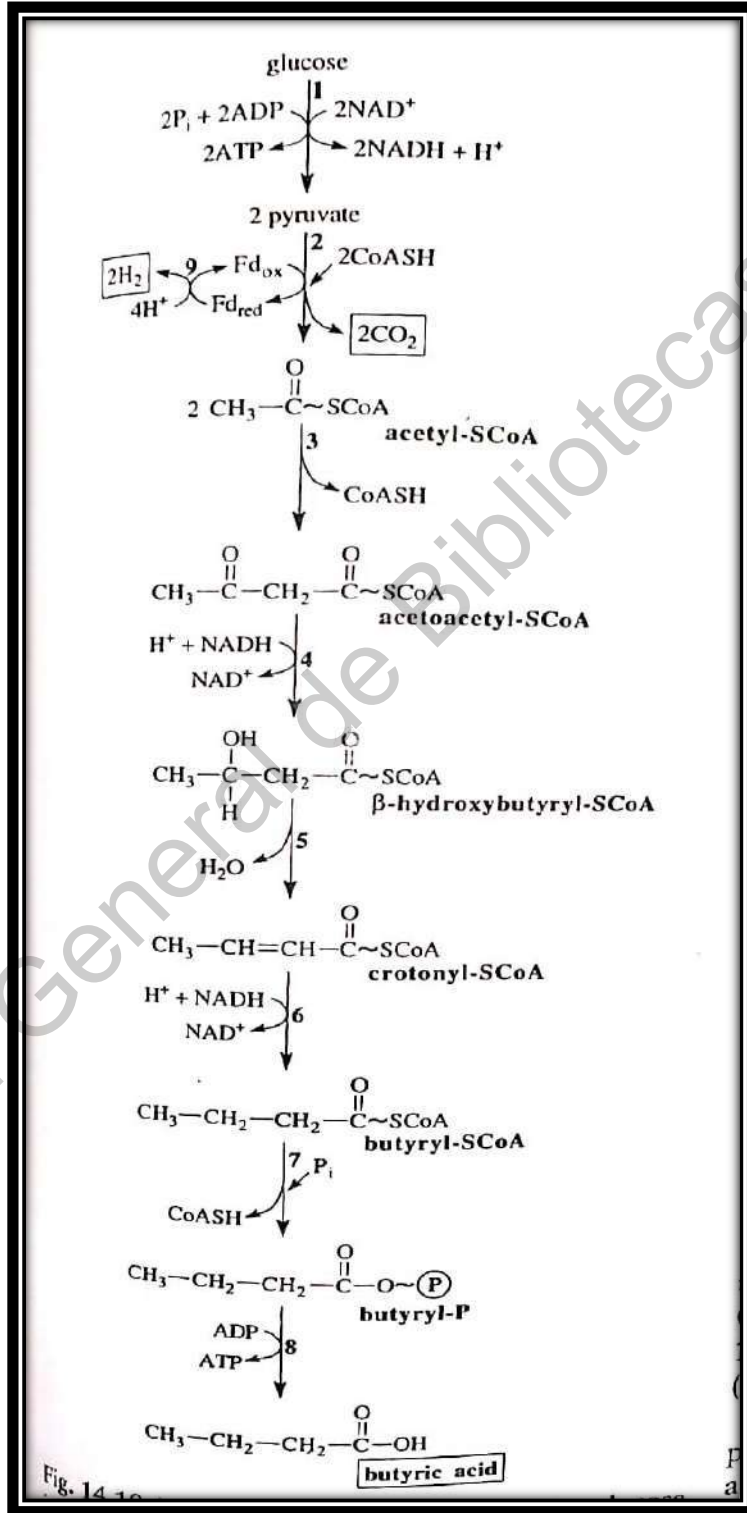


Figura 96. Fermentación butírica (White, 2007).

5.1.3.4 Fermentación butanediol

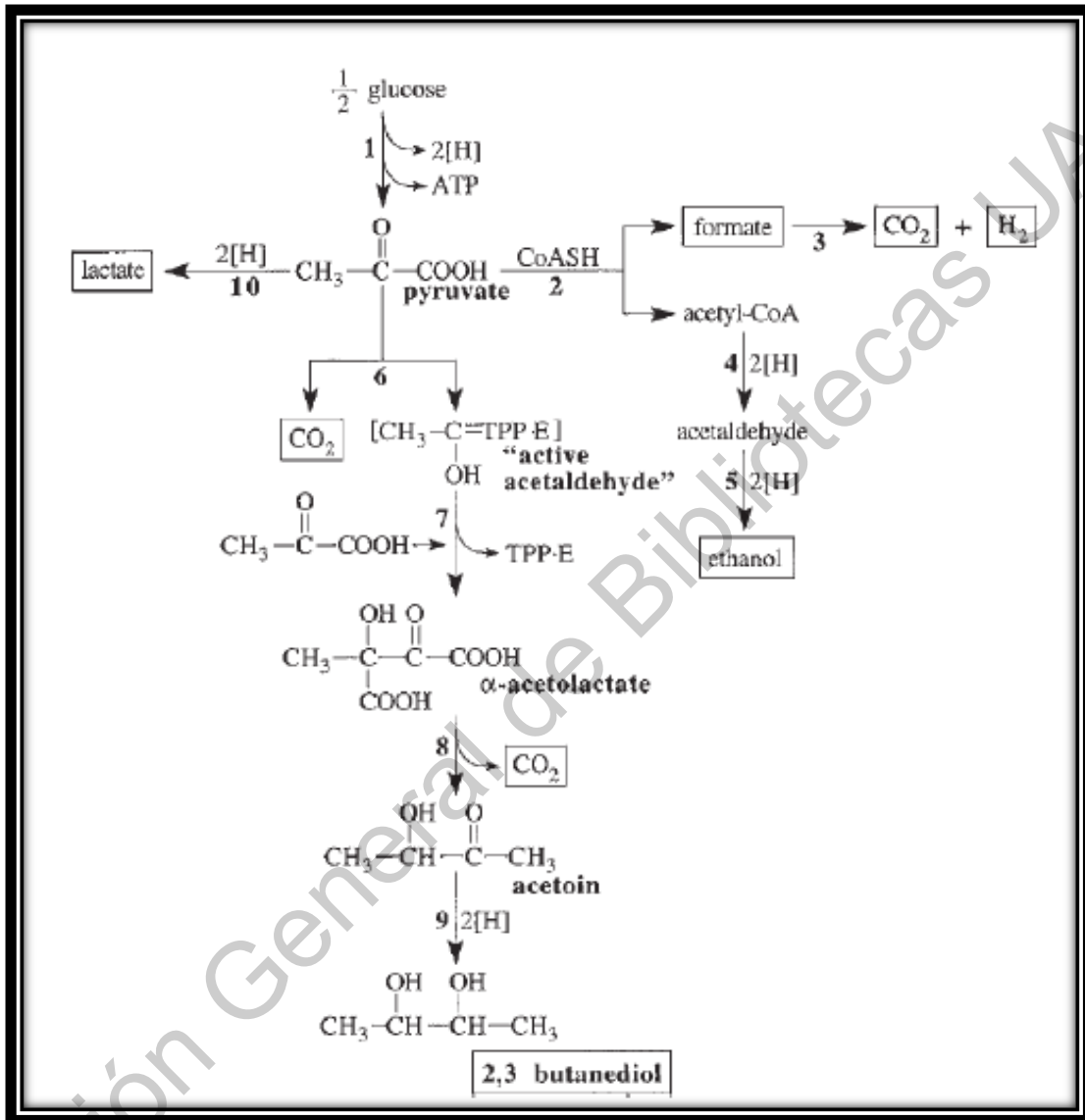


Figura 97. Formación de butanediol. Enzimas: 1, Enzimas glucolíticas; 2, Piruvato-formato liasa; 3, Formato-hidrógeno liasa; 4, Acetaldehído deshidrogenasa; 5, Alcohol deshidrogenasa; 6 y 7, α -acetolactato sintasa; 8, α -acetolactato descarboxilasa; 9, 2,3-butanediol deshidrogenasa; 10, Lactato deshidrogenasa. (White, 2007).

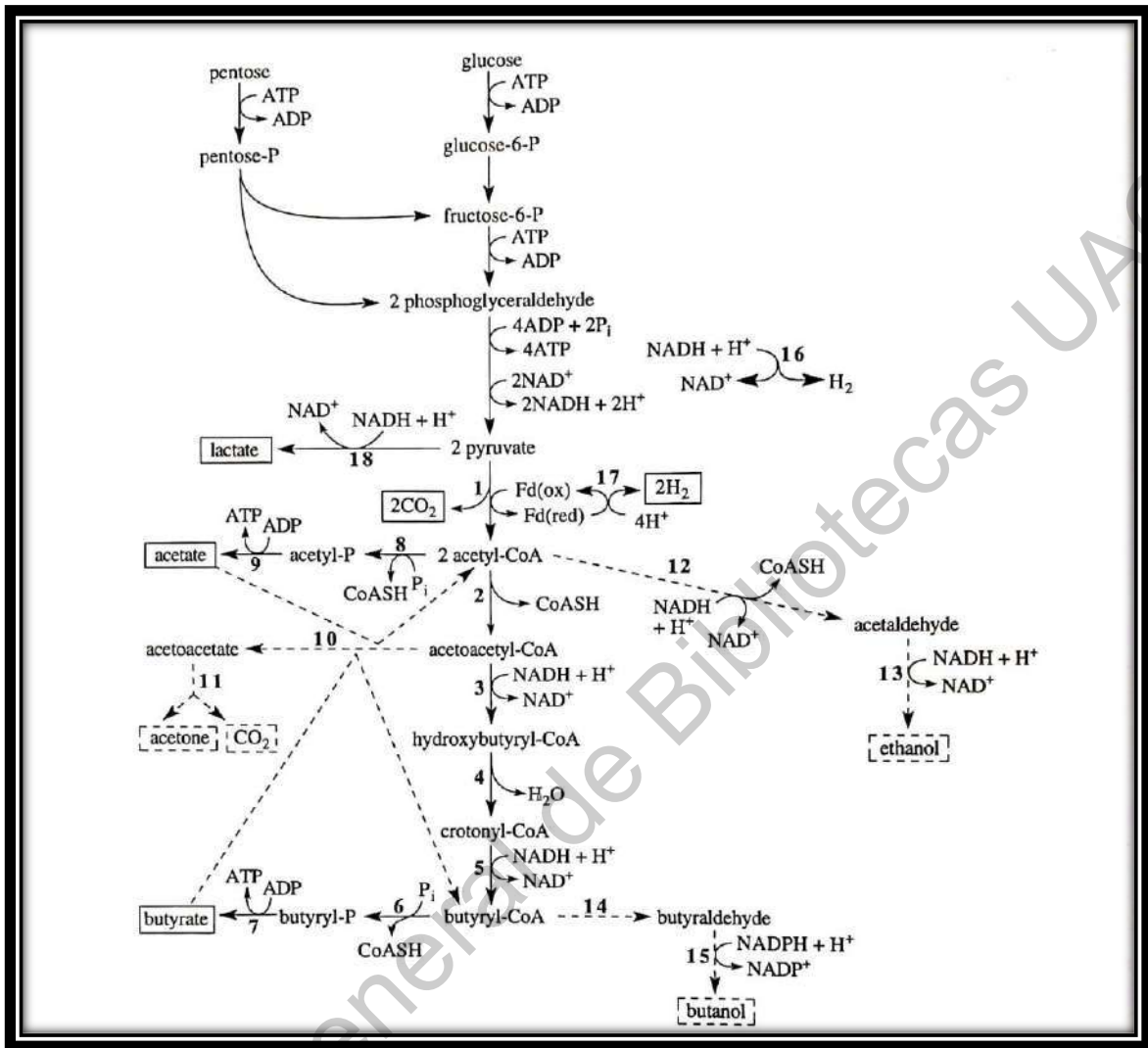


Figura 98. Fermentación ABE Acetona Butanol Etanol en *C. acetobutylicum* (White, 2007).

5.1.3.5 Fermentación propiónica

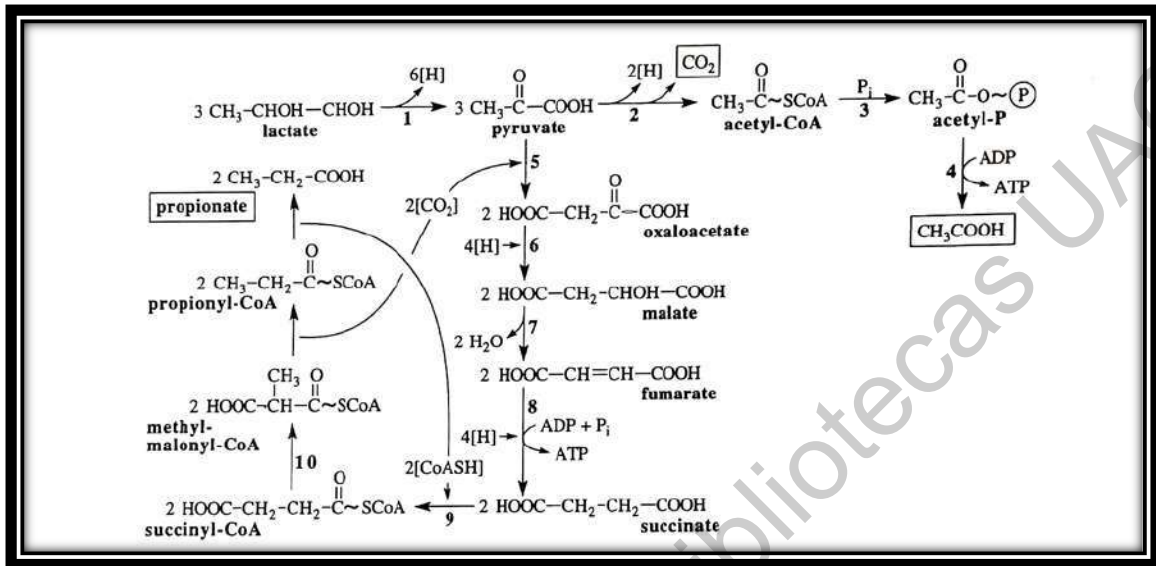


Figura 99. Fermentación propiónica por la vía del succinatopropionato, (White, 2007).

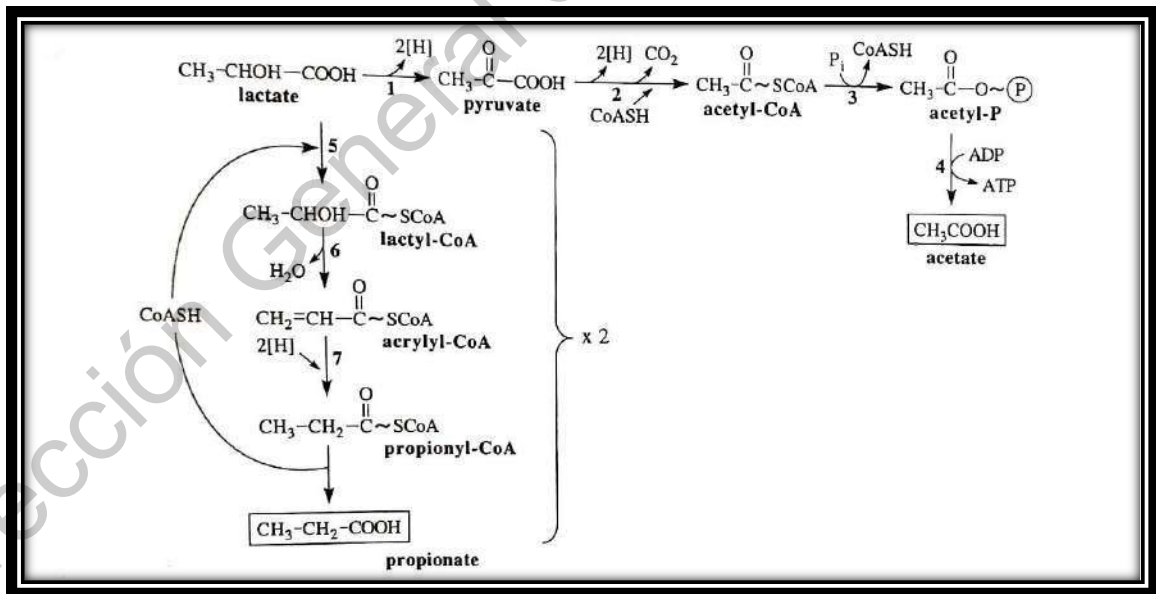


Figura 100. Fermentación propiónica por la vía del acrilato, (White, 2007).

5.1.3.6 Fermentación mezcla de ácidos

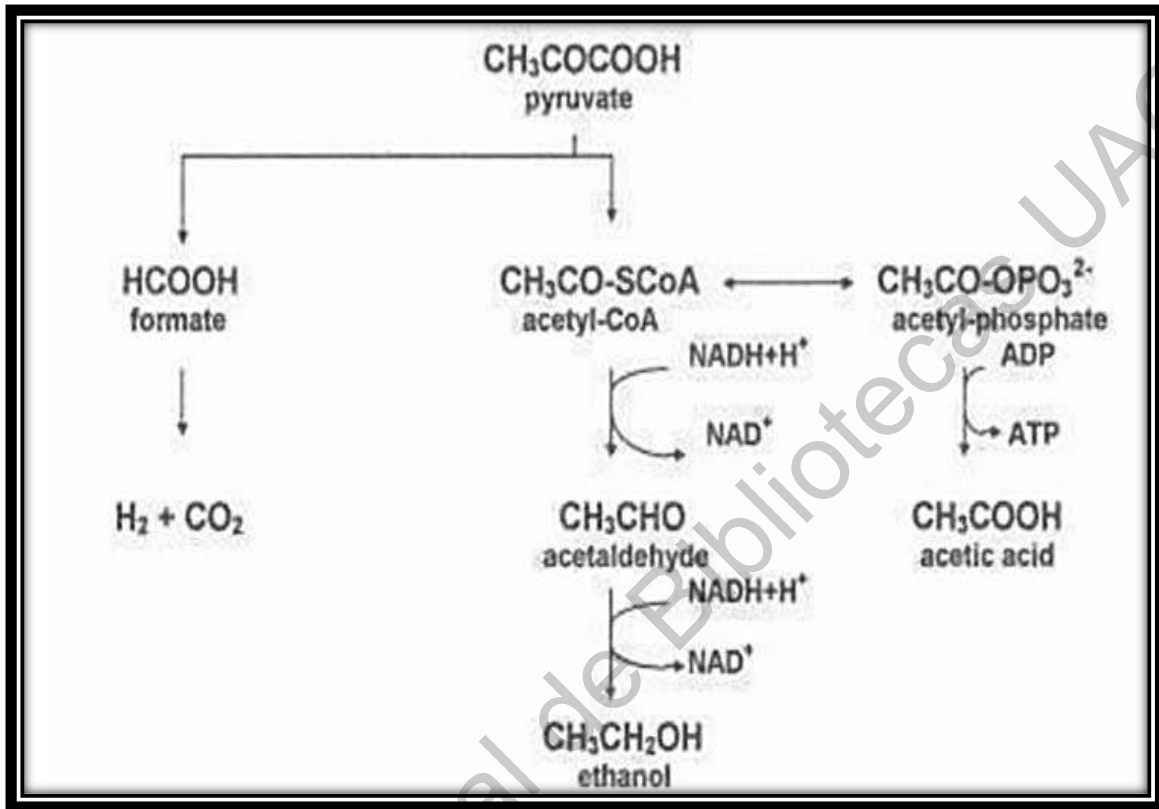


Figura 101. Mezcla de ácidos producto de la fermentación, (Doelle, 2010).

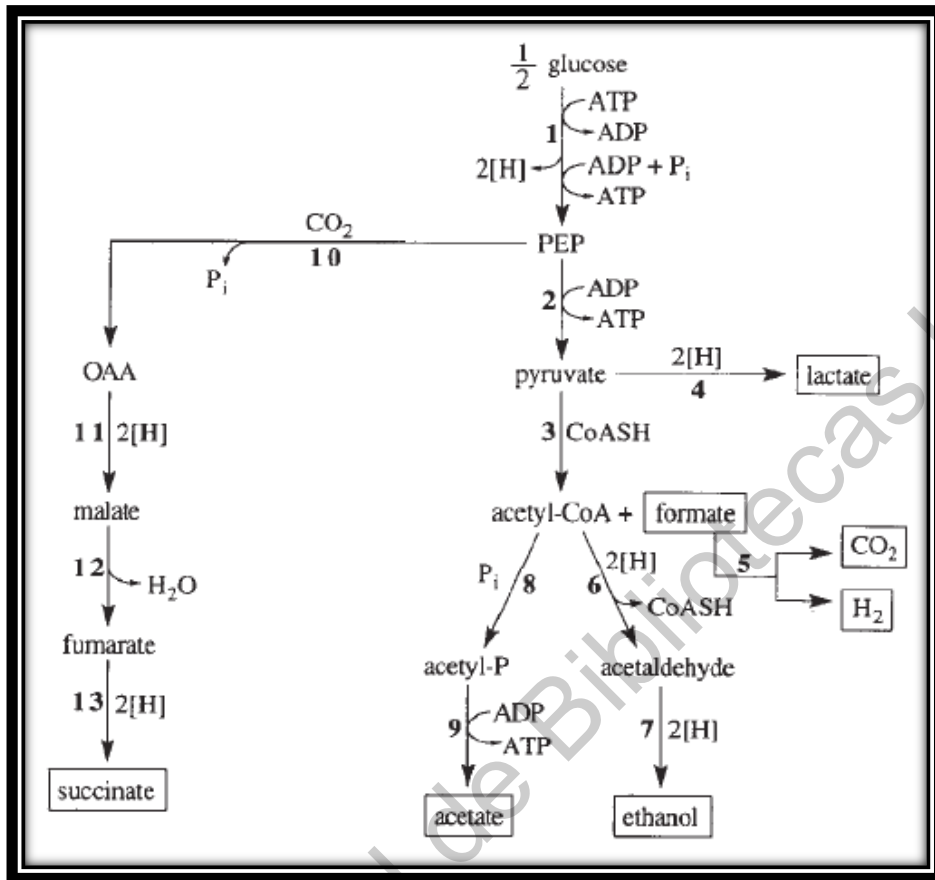


Figura 102. Fermentación ácido-mixta. Enzimas: 1, Enzimas glucolíticas; 2, Piruvato quinasa; 3, Piruvato-formato liasa; 4, Lactato deshidrogenasa; 5, Formato-hidrógeno liasa; 6, Acetaldehído quinasa; 7, alcohol deshidrogenasa; 8, Fosfototransacetilasa; 9, Acetato quinasa; 10, PEP carboxilasa; 11, Malato deshidrogenasa; 12, Fumarasa; 13, Fumarato reductasa. Nótese los rendimientos de ATP: por succinato, aproximadamente, 1; por etanol, 1; por acetato, 2; por formate, 1; por CO₂ and H₂, 1; por lactato, 1. La energía equivalente para 1 ATP es conservada por succinato formado debido a que la reacción fumarato reductasa se lleva a cabo en la membrana celular y genera un Δp . Nótese también los equivalentes de reducción utilizados en la producción de los productos finales: por succinato, 4; por etanol, 4; por acetato, 0; por lactato, 2; por formate, 0. El número de equivalentes de reducción utilizados debe ser igual al número producido durante la glucólisis. Por tanto, solo algunas proporciones de producto final son compatibles con una fermentación balanceada (White, 2007).

Una vía de fermentación completa inicia con un sustrato, incluye la glucólisis y termina con los varios productos finales. Las diferentes vías de fermentación son típicamente llamadas por los productos finales que forman (Cuadro 10 y figura 103).

Cuadro 10. Ejemplos de diferentes vías de fermentación. (White, 2007).

Ruta metabólica	Producto final	Ejemplos
Ácido láctico (Homoláctica)	ácido láctico (2 moléculas)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
Heteroláctica	Ácido láctico, etanol y CO ₂	La vía puede provocar el deterioro de alimentos. <i>Leuconostoc</i> . Usado en la producción de Sauerkraut
Alcohol	Etanol y CO ₂	<i>Saccharomyces</i> (levadura). Importante en la producción de pan, bebidas alcohólicas y gasahol.
Ácido propiónico	Ácido propiónico y CO ₂	<i>Propionibacterium</i> acnes: metaboliza los ácidos grasos en las glándulas sebáceas hacia ácido propiónico <i>Propionibacterium</i> <i>Freudenreichii</i> da el sabor y produce los hoyitos en el queso Suizo.
Ácido Butírico	Ácido butírico, butanol, acetona, alcohol isopropílico y CO ₂	Produce ácido butírico que causa el deterioro en el queso y la mantequilla. El butanol y la acetona, son importantes ácidos orgánicos.
Butanodiol	Butanodiol y CO ₂	Butanodiol producido por <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Klebsiella</i> . Los intermediarios acetona se pueden detectar por el test VP. Este test es usado en conjunto con test MR para diferenciar <i>Enterobacter</i> de <i>Escherichia coli</i> (-VP). <i>Escherichia coli</i> es un microorganismo indicador de contaminación fecal.
Mezcla de ácidos	Ácido acético, etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico y CO ₂ .	Variedad de productos ácidos son secretados por <i>Enterobacteriaceae</i> , incluyendo patógenos como <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> . Estos productos se detectan por reacción con el indicador de pH rojo de metilo.
Metanogénesis	Metano y CO ₂ .	Ciertas Arqueas. La producción de metano en la tierra proviene mayormente de aquí.

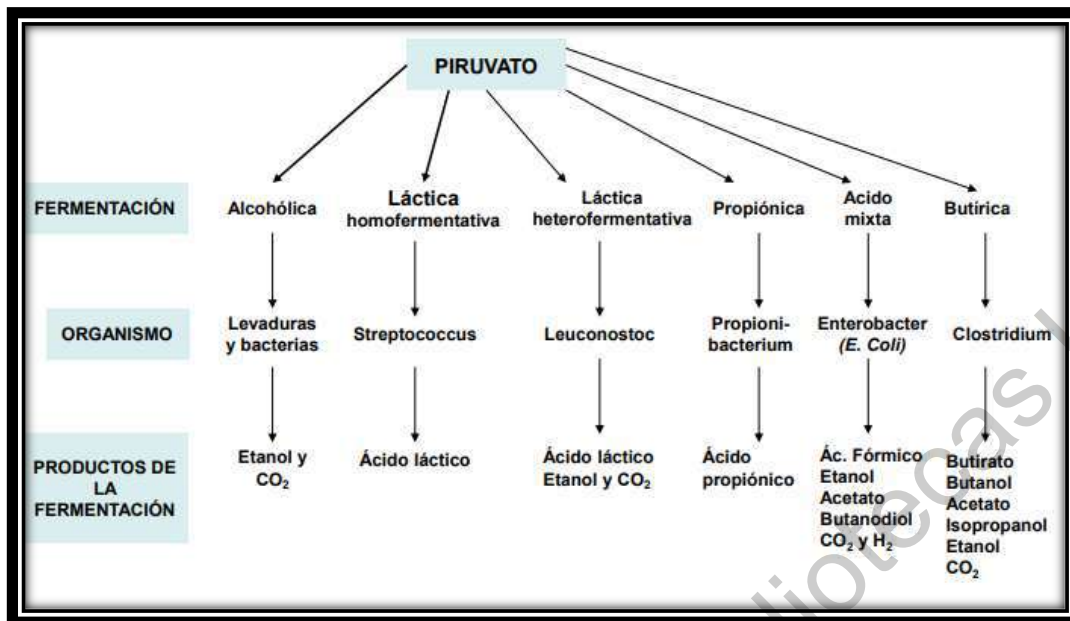


Figura 103. Esquema de fermentaciones. (Prescott, 2002).

5.1.3.7 Fermentación de ácidos dicarboxílicos

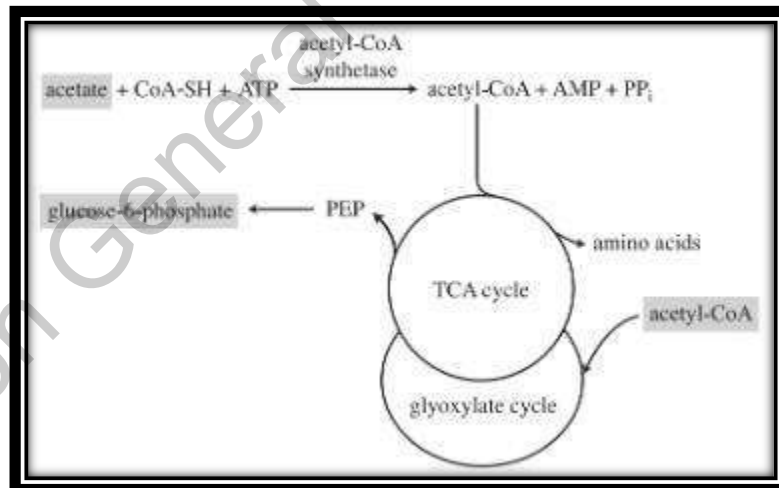


Figura 104. Conversión de acetato a intermediarios del metabolismo central a través del ciclo del glioxilato y de los ácidos tricarboxílicos. El Acetil-CoA es un intermediario en el metabolismo de muchos compuestos. Esta forma activa del acetato es metabolizada a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos para proveer energía y a través del ciclo del glioxilato para suministrar esqueletos de carbono para la biosíntesis.

5.1.3.8 Fermentación en *Archeas* hipertermofílicas

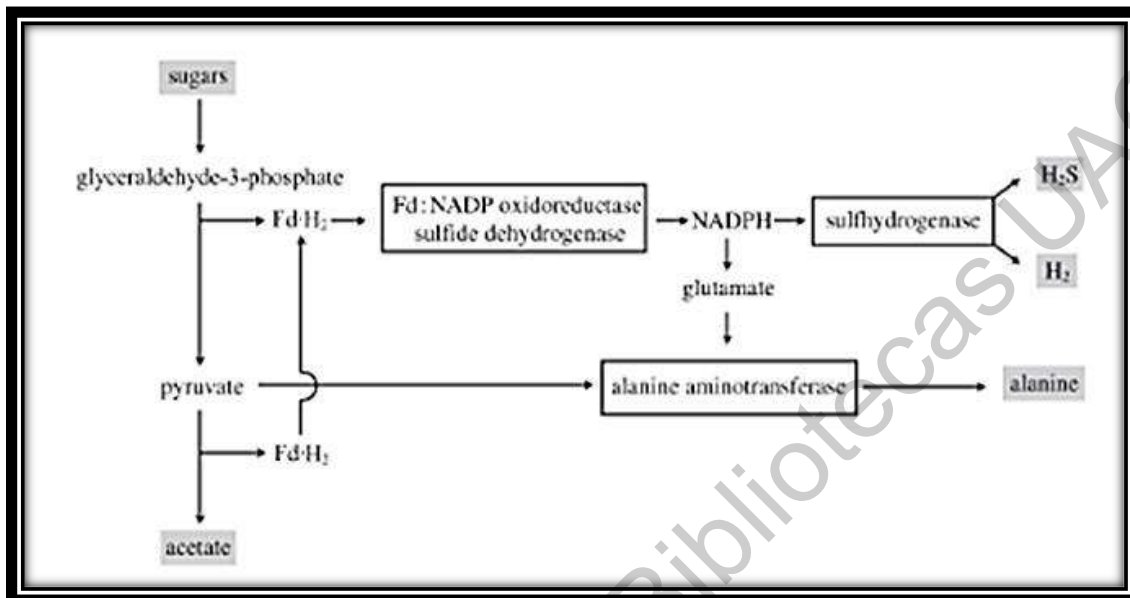


Figura 105. Fermentación de azúcar por *Pyrococcus furiosus*. Esta Archea metaboliza los carbohidratos a través de una modificación a vía EMP y tiene una enzima sulfhidrogenasa que reduce H^+ y S^0 . El piruvato o H^+ son usados como aceptores de electrones. S^0 es usado como un colector de electrones disponibles. El piruvato se reduce como un aceptor de electrones en una reacción de dos pasos, (Kim, 2008).

5.1.4 Ciclo de Krebs y vías anapleróticas

Las vías del metabolismo central, son vías que proveen los metabolitos precursores para todas las otras vías (Figura 106). Estas vías son las vías del metabolismo de carbohidratos y ácidos carboxílicos como el C_4 ácidos dicarboxílicos y el ácido acético. El ciclo de Krebs también conocido como ciclo del Ácido cítrico o TCA, proporciona los intermediarios metabólicos para la síntesis de aminoácidos y pirimidinas. Los microorganismos tienen reacciones anapleróticas que alimentan el ciclo para que pueda continuar activo durante la biosíntesis.

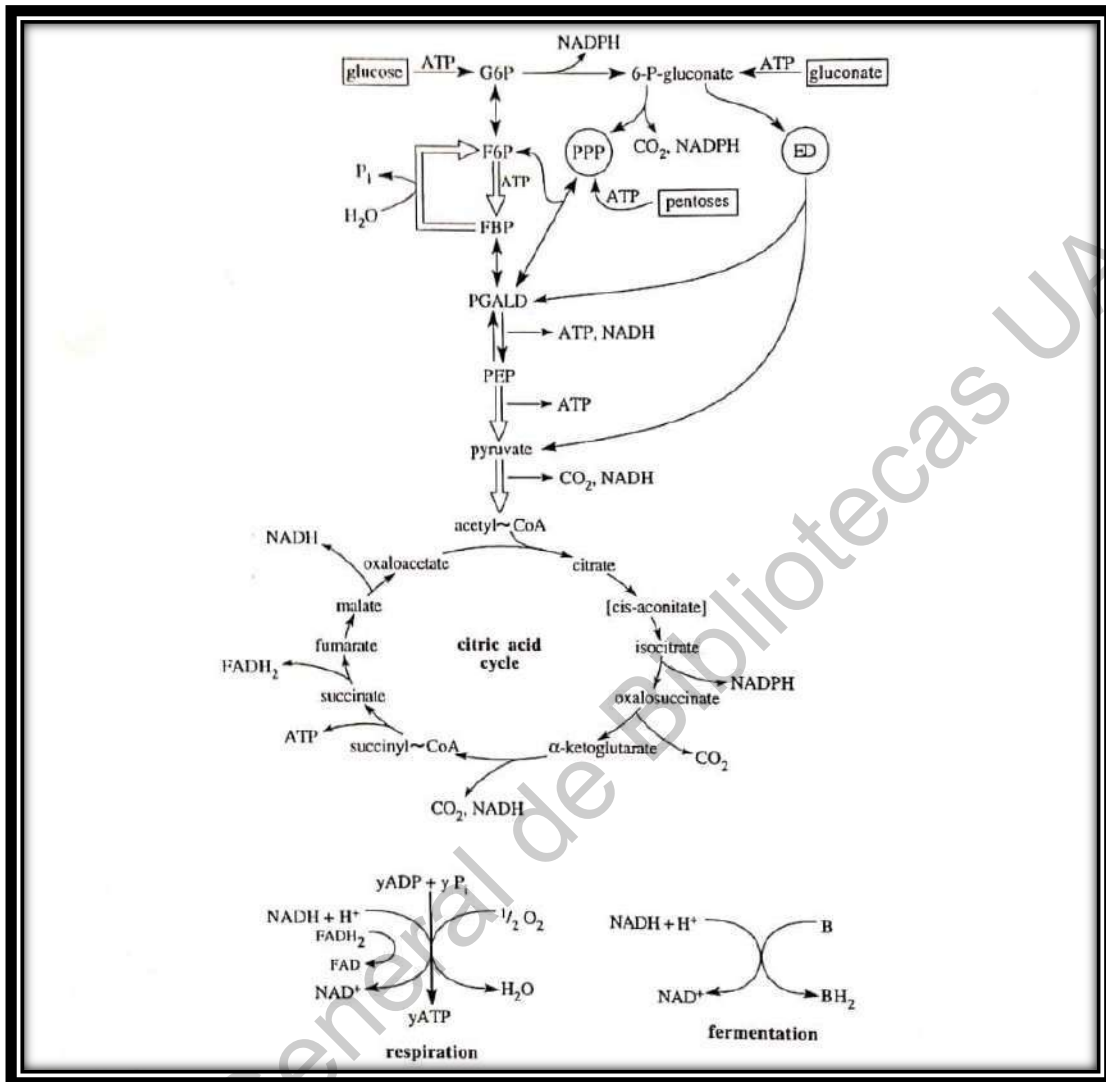


Figura 106. Relación entre las vías de los carbohidratos y el ciclo del ácido cítrico. La vía de la glucosa-6-fosfato a piruvato es la vía de Embden-Mayerhof-Parnas (Glucólisis). La vía pentosa fosfato (PPP) y la vía Entner-Doudoroff cada ambas ramas vienen del 6-fosfogluconato. Pero estas vías intersectan con la vía glicolítica y la vía del fosfogliceraldehído. Todas las vías de los carbohidratos producen piruvato, el cual oxida a Acetil CoA. Los organismos en crecimiento anaeróbico, el acetyl-CoA es oxidado a CO₂ en el ciclo del ácido cítrico. Los electrones del NAD(P)H FADH₂ son transportados a la cadena transportadora de electrones en organismos aerobios, con la formación del ATP. En células fermentativas el NADH es reoxidado por un aceptor orgánico (B), que se genera durante el catabolismo. El ciclo del ácido cítrico no opera como una vía oxidativa durante el crecimiento fermentativo.

Abreviaturas: G6P, Glucosa-6-Fosfato; F6P, Fructosa-6-Fosfato; FDP, fructosa 1, 6-bifosfato; PGALD, 3-fosfocliceraldehido; PEP, fosfoenolpiruvato; PPP, vía pentosa fosfato; ED, vía Entner-Doudoroff; FAD, dinucleótido de flavina y adenina; FADH₂, FAD reducido, (White, 2007).

5.1.4.1 Ciclo del glioxilato.

El ciclo del glioxilato es una ruta anaplerótica que alimenta al ciclo de Krebs, ocurre en anaerobios que crecen sobre acetato o ácidos grasos (Figura 107).

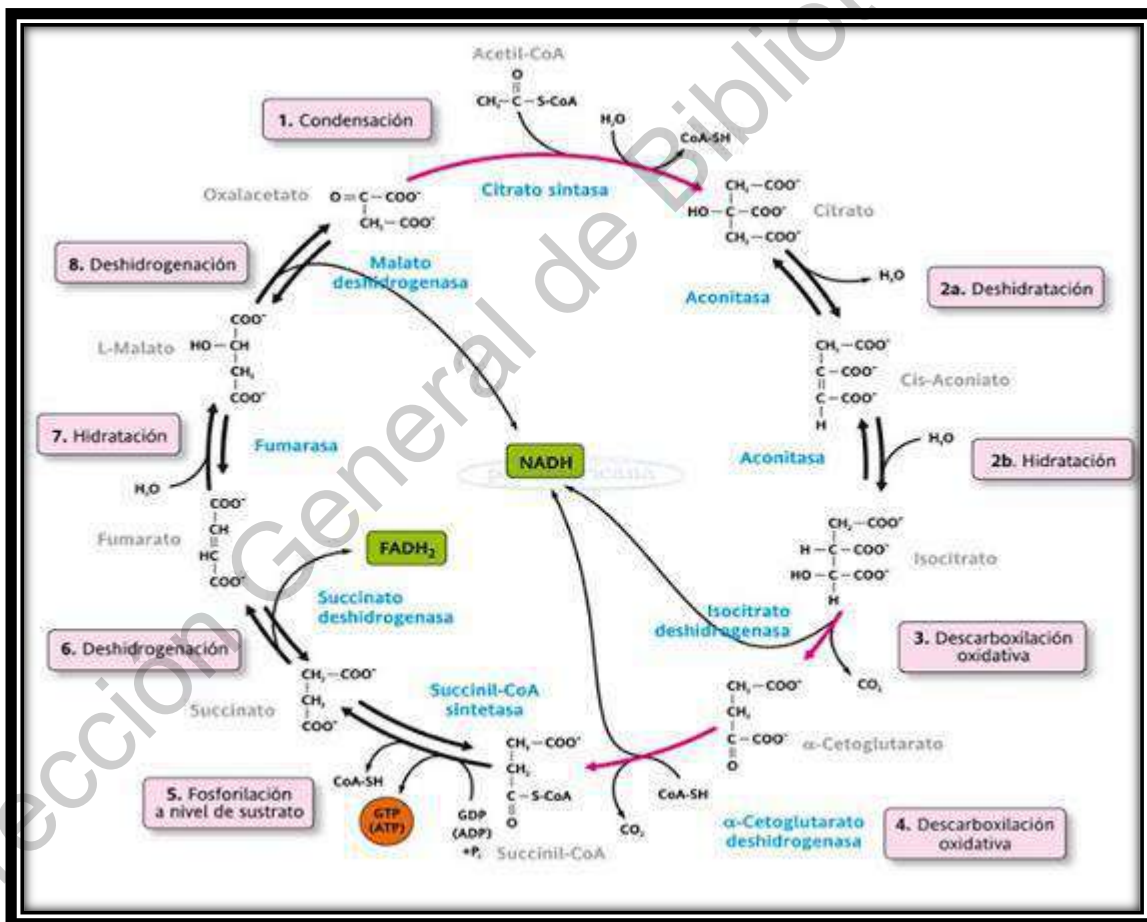


Figura 107. Ciclo del ácido cítrico. Enzimas: 1, citrato sintasa; 2 y 3, aconitasa; 4 y 5, isocitrato deshidrogenasa; 6, α-cetoglutarato deshidrogenasa; 7, succinato tioquinasa; 8, succinato deshidrogenasa; 9, fumarasa; 10, malto deshidrogenasa, el

cis-aconitato se rompe porque es una enzima enlazada a un intermediario, (White, 2007).

5.1.4.2 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Algunos microorganismos pueden realimentar intermediarios del TCA mediante la fijación del CO₂. Algunos microorganismos utilizan piruvato carboxilasa para sintetizar oxalacetato.



Algunos microorganismos utilizan fosfoenolpiruvato para realimentar oxalacetato en el TCA.



5.1.4.3 Ciclo reductivo de los ácidos carboxílicos.

En presencia del aire, el ciclo del ácido cítrico opera como una vía oxidativa acoplada a la respiración aeróbica (Figura 108).

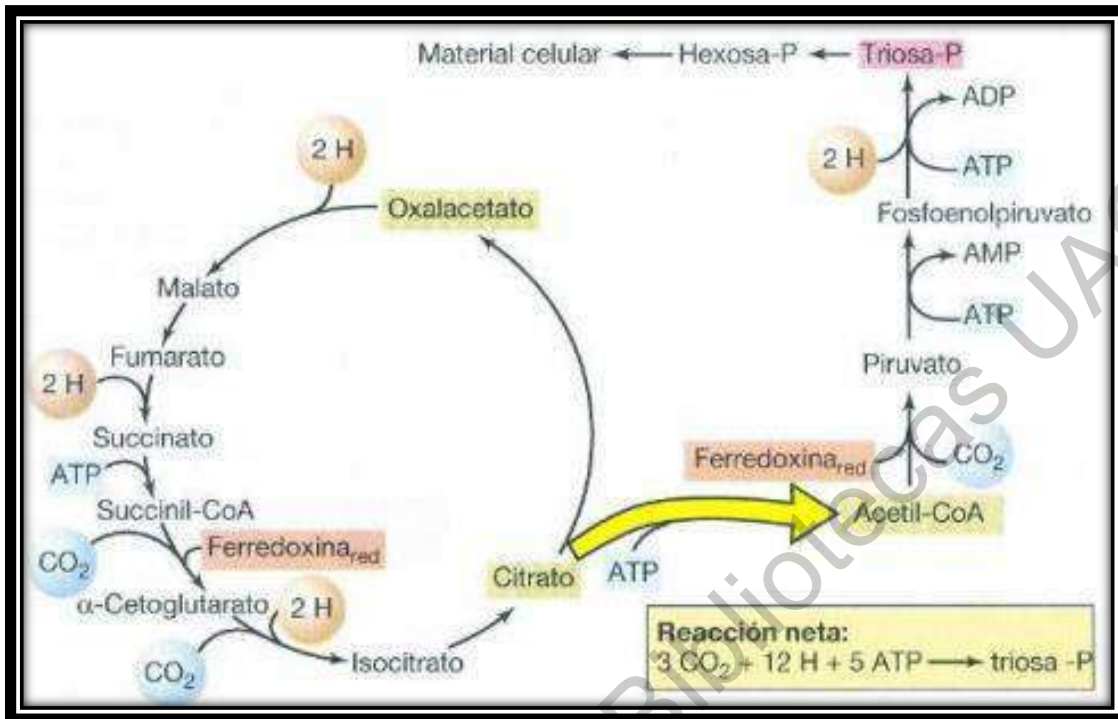


Figura 108. La vía del ácido cítrico reductiva en bacterias fermentativas. Tiene dos ramas. Una rama oxida el citrato a α -cetoglutarato y la segunda reduce el oxalacetato a succinil-S-CoA. Enzimas: 1, citrato sintasa; 2 y 3, aconitasa; 4 y 5 isocitrato deshidrogenasa; 6, succinatotiocinasa; 7, fumarato reductasa; 8, fumarasa; 9 malato deshidrogenasa; 10, PEP carboxilasa; 11, piruvato carboxilasa, (White, 2007).

5.1.4.4 Fijación anaplerótica del CO_2

La fijación del CO_2 simplemente reemplaza a los intermediarios de TCA y mantiene así el balance metabólico (Figura 109).

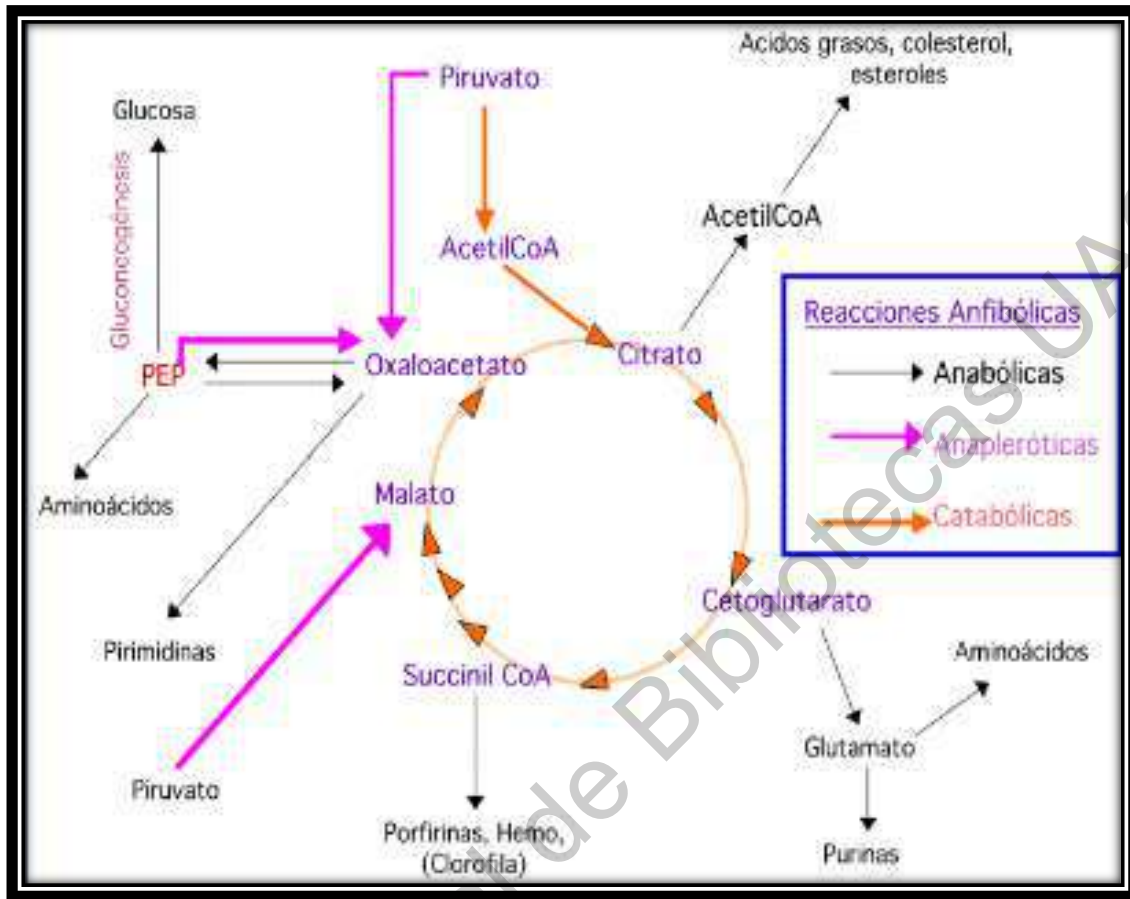


Figura 109. Fijación del CO₂, (Whiley, 2008).

5.2 Metabolismo quimiolitotrófico

Son organismos que obtienen energía de la oxidación de compuestos inorgánicos como el azufre, hierro, hidrógeno o nitrógeno o que pueden usar como fuente de carbono el CO₂ (Figuras 110 y 111, cuadro 11).



Figura 110. Interacción microorganismo-ambiente, (Prescott, 2002).

Cuadro 11. Tipo de reacción dependiendo la fuente de energía, (Prescott, 2002).

Reacción de oxidación	Tipo de quimiolitótrofo
$\text{H}_2 + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	Bacterias del hidrógeno
$\text{HS}^- + \text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$	Bacterias del azufre
$\text{S}^0 + 1\frac{1}{2}\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$	Bacterias del azufre
$\text{NH}_4^+ + 1\frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	Bacterias nitrosantes
$\text{NO}_2^- + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$	Bacterias nitrificantes
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \frac{1}{4}\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	Bacterias del hierro

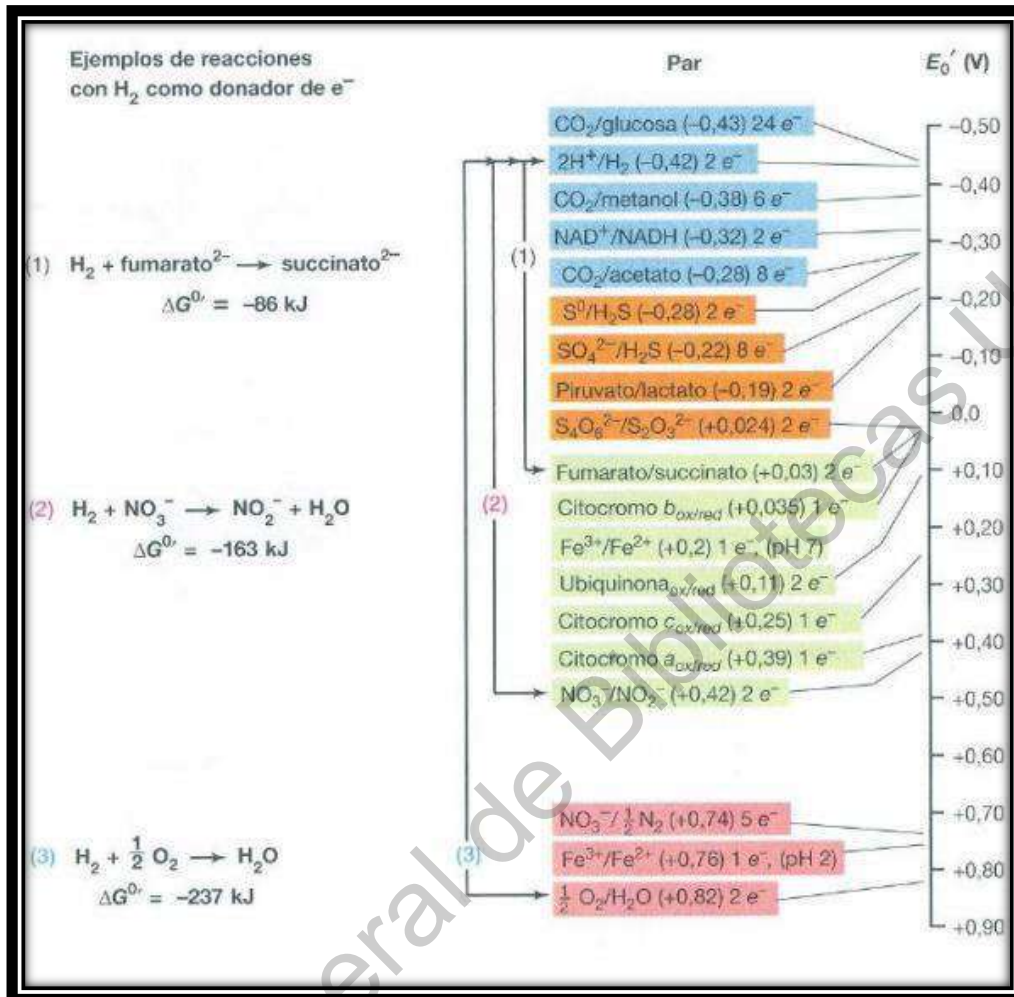


Figura 111. Reacción oxido reducción, (Prescott, 2002).



5.2.1 Bacterias Nitrificantes

Las bacterias nitrificantes emplean el ciclo de Calvin para fijar el CO₂ y las oxidantes de nitrito pueden crecer heterotróficamente con glucosa y otros compuestos orgánicos (Figuras 112-118, Cuadros 12-14).

Bacterias del nitrógeno

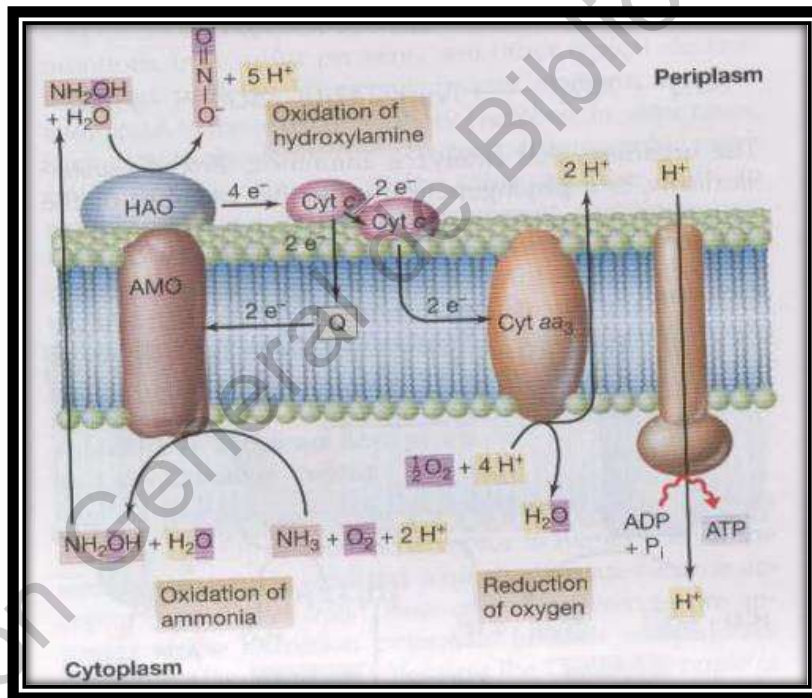
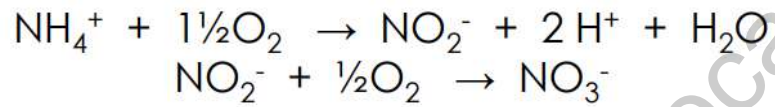


Figura 112. Nitrificación paso 1: Oxidan el amonio a nitritos. Fijan CO₂ por el ciclo de Calvin, (Prescott, 2002).

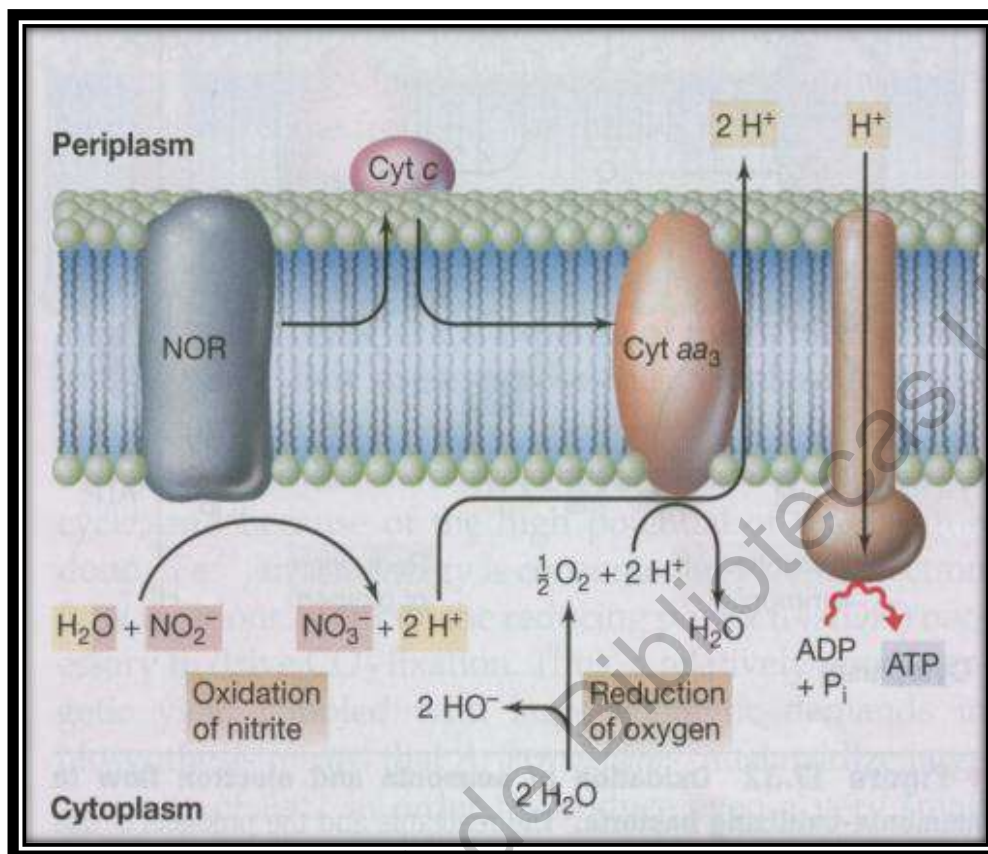


Figura 113. Nitrificación paso 2. Oxidan los nitritos a nitratos, (Prescott, 2002).

Cuadro 12. Bacterias del nitrógeno que oxidan el amonio, (Prescott, 2002).

Género	Características	Hábitat
<i>Nitrosomonas</i>	Bacterias Gram negativas con sistema de membranas periféricas.	Suelo, aguas residuales, agua dulce y mares.
<i>Nitrosococcus</i>	Cocos móviles con membrana vesiculares o periféricas.	Agua dulce y mares.
<i>Nitrospira</i>	Espirales móviles con sistema membranar no determinado.	Suelo.
<i>Nitrosolobus</i>	Pleomorficos, lobulares, móviles.	Suelo.

Cuadro 13. Bacterias del nitrógeno que oxidan los nitritos, (Prescott, 2002).

Género	Características	Hábitat
<i>Nitrobacter</i>	Bacilos cortos, sistema membranal polar.	Suelo, agua dulce y mares.
<i>Nitrospina</i>	Bacilos no móviles con sistema membranal no determinado.	Marino.
<i>Nitrococcus</i>	Cocos móviles, sistema membrana organizado en tubos.	Marino.
<i>Nitrospira</i>	Vibrioides o espirales, no móviles, sin membranas internas.	Suelo y mar.

Ciclo del nitrógeno (Anamox)

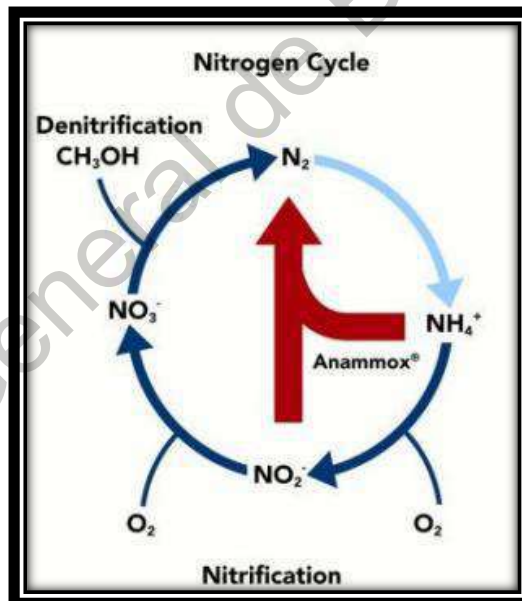
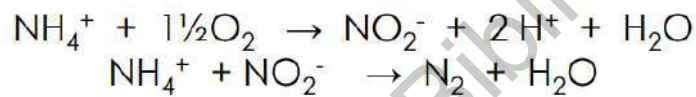


Figura 114. Oxidación del amonio con nitritos como aceptor de electrones en condiciones anaerobias, (Prescott, 2012).

Cuadro 14. Ejemplos de procariotas fijadoras de nitrógeno, (Kim, 2008).

<i>Bacteria</i>	
Cianobacterias	<i>Anabaena azollae</i> <i>Glaeocapsa</i> spp. <i>Mastigocladus laminosus</i> <i>Chroocidium viscosum</i>
Bacteria fotosintética	<i>Rhodospseudomonas viridis</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Heliobacterium chlorum</i> <i>Acetobacterium woodii</i>
Anaerobios estrictos	<i>Clostridium pasteurianum</i> <i>Desulfotribria vulgaris</i> <i>Desulfotomaculum ruminis</i>
Aerobios y anaerobios facultativos	<i>Azotobacter paspali</i> <i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Beijerinckia indica</i> <i>Denxia gummosa</i> <i>Frankia alni</i> <i>Halobacterium halobium</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Methylococcus capsulatus</i> <i>Methylosinus trichosporium</i> <i>Mycobacterium flavum</i> <i>Pseudomonas azotogenis</i> <i>Rhizobium japonicum</i> <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
Archaea metanógenos	<i>Methanosarcina barkeri</i> <i>Methanococcus marpaludis</i> <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>

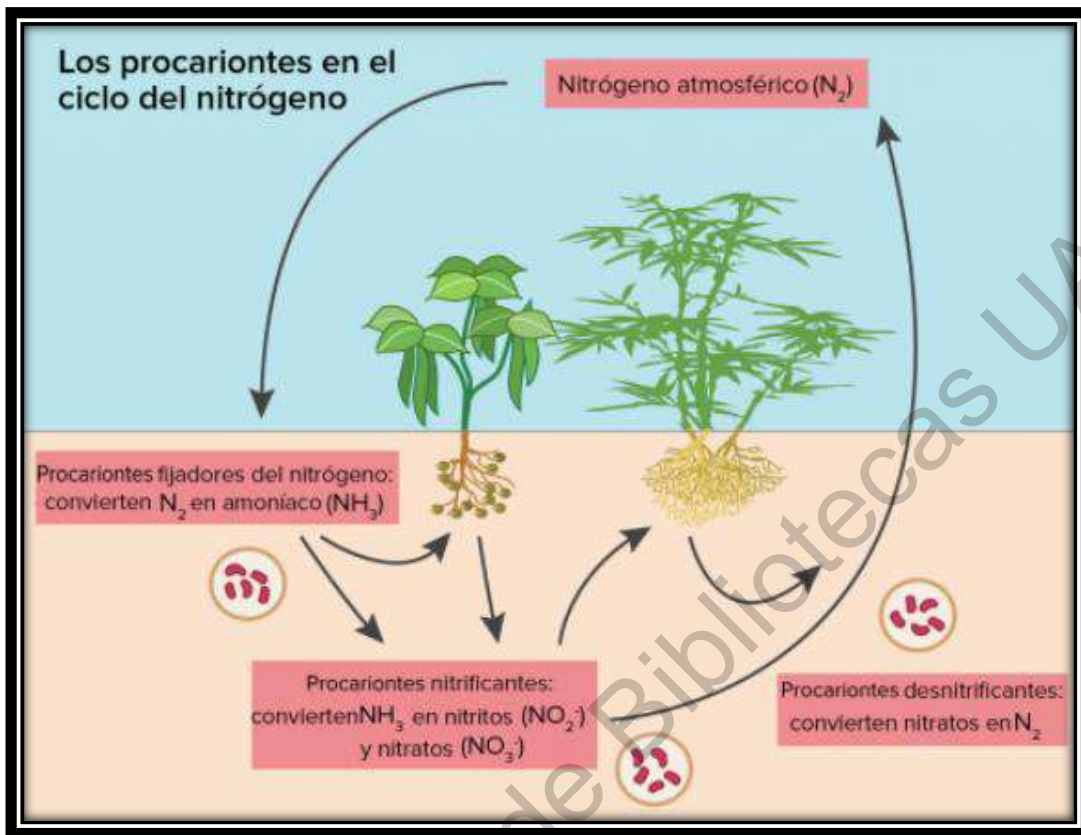


Figura 115. Ciclo del nitrógeno, (Kim, 2008).

Cuadro 15. Complejo nitrogenasa de *Rhizobium spp*, (Kim, 2008).

Características	Azoferredoxin(Dihidrogenasa reductasa)	Molibdoferredoxin (Dihidrogenasa)
Peso molecular	70 000	
Subunidades	2	4
Hierro	8	28
Molibdeno	0	2
Acido sulfúrico lábil	8	28

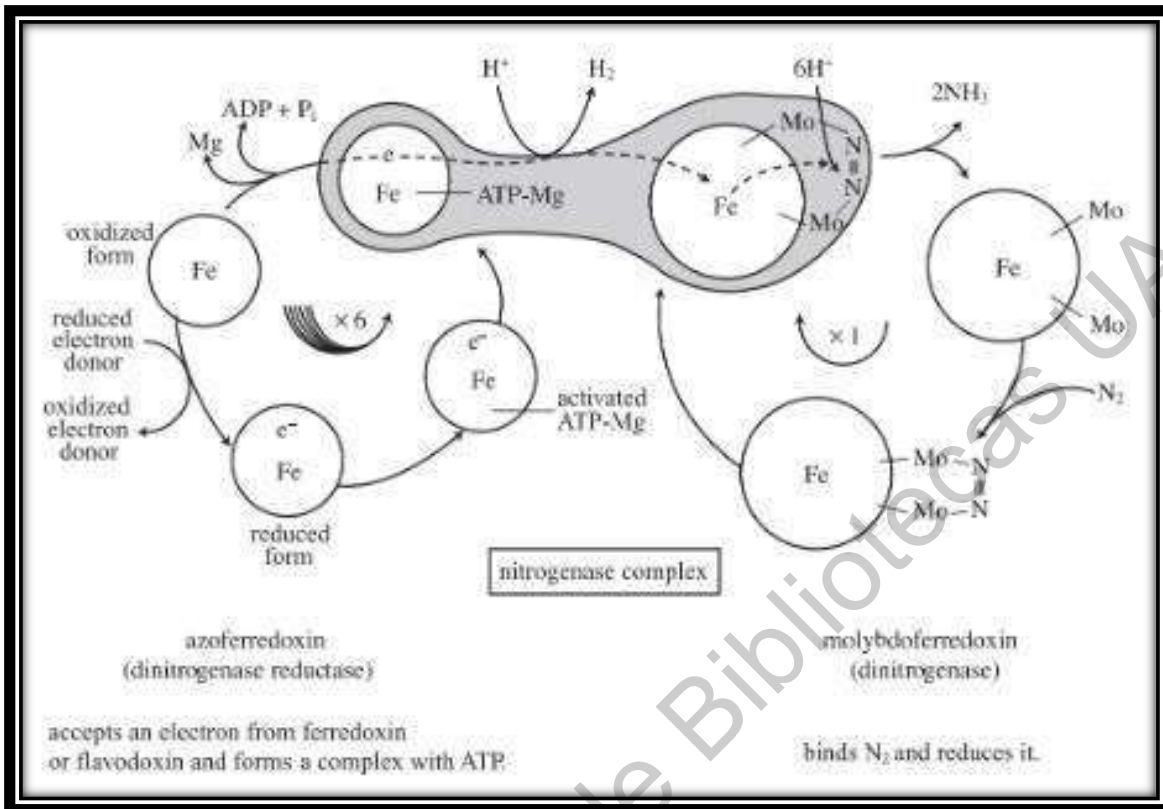


Figura 116. Reducción de N_2 por el complejo nitrogenasa. La Azoferredoxina (dinitrogenasa reductasa) es reducida, se acopla al ATP con la oxidación del ferredoxin o flavodoxin. El molibdenoferredoxin (dinitrogenasa) unido a N_2 forma el complejo nitrogenasa con la reducción del azoferredoxin-ATP complejo. Los electrones necesarios para reducir el N_2 son trasferidos del azoferredoxin al molibdenoferredoxin, la reacción se repite 6 veces para reducir una molécula de N_2 , (Kim, 2008).

Tabla 16. Sustancias reducidas por el complejo nitrogenasa, (Kim, 2008).

Sustrato	Producto
N_2	$2NH_4^+$
N_2^-	N_2, NH_4^+
N_2O	N_2
HCN	CH_4, NH_4^+, CH_3NH_2
CH_3CN	C_2H_6, NH_4^+
CH_3CHCN	C_3H_8, NH_4^+, C_3H_6
C_2H_2	C_2H_4
$2H^+$	H_2

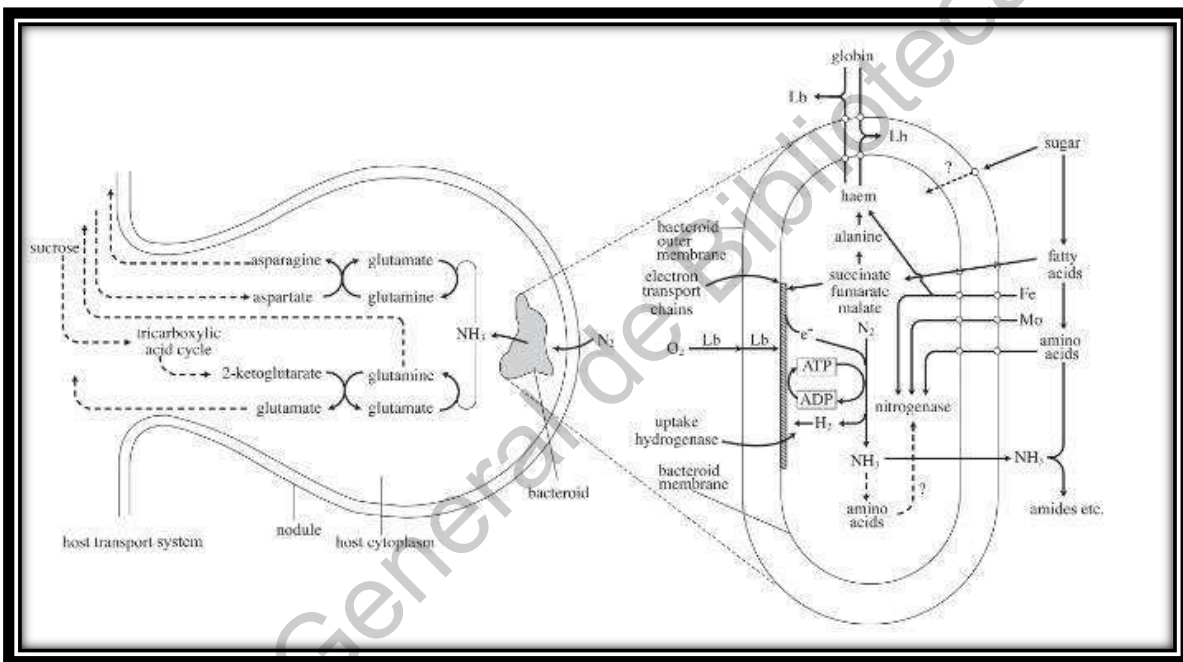


Figura 117. Roles de la planta hospedera y *Rhizobium* en la fijación simbiótica del N_2 . Cuando *Rhizobium* infecta una planta leguminosa, las células de las raíces de la planta hospedera forma nódulos y las células bacterianas se convierten en bacterioides. El hospedero provee fuentes de energía y carbono y el O_2 unido a la leghaemoglobina (Lb). Las bacterias fijan y proveen nitrógeno a la planta hospedera, (Kim, 2008).

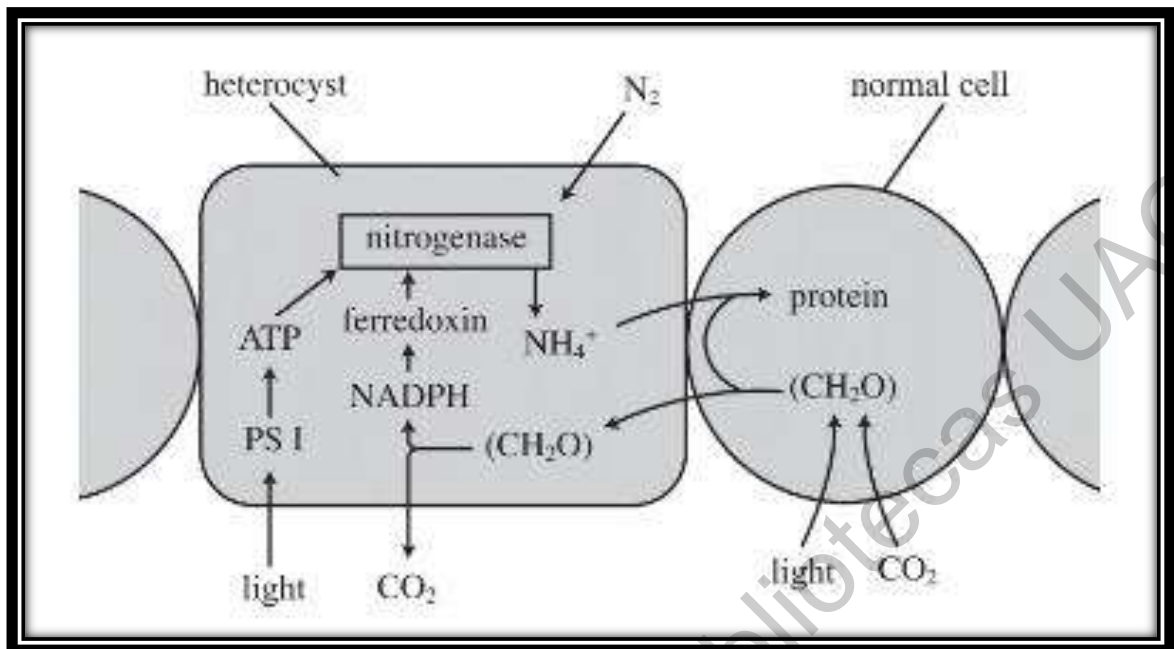
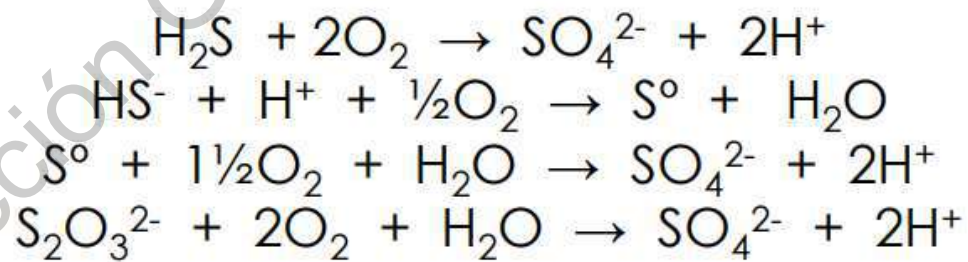


Figura 118. Fijación de N₂ en heteroquistes de Cyanobacterias heterocísticas, (Kim, 2008).

5.2.2 Bacterias del azufre

Bacterias oxidantes de azufre (Figuras 118-121)



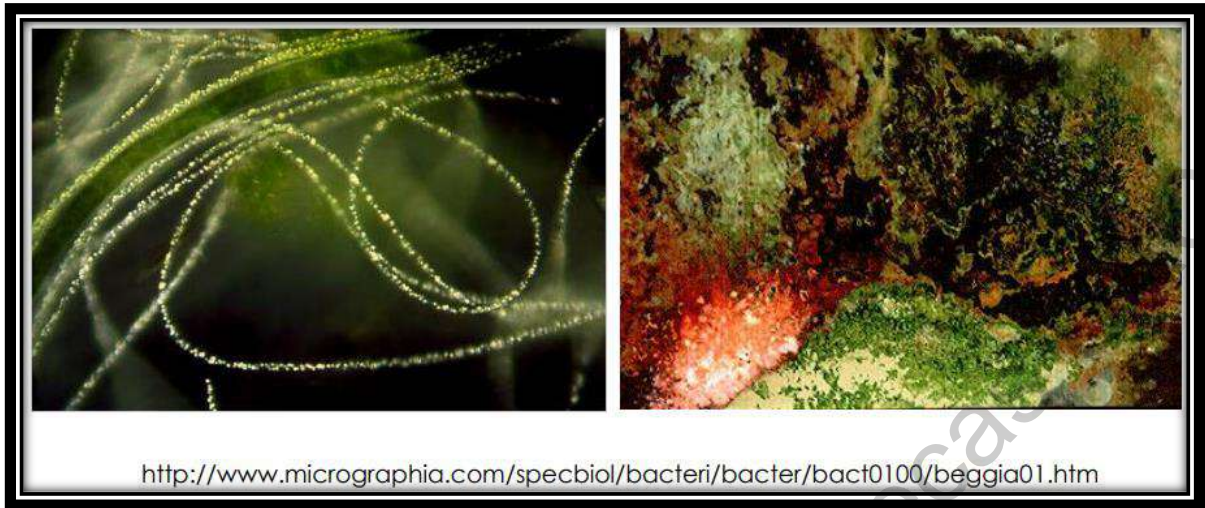


Figura 119. Micrografía de bacterias oxidantes de azufre.

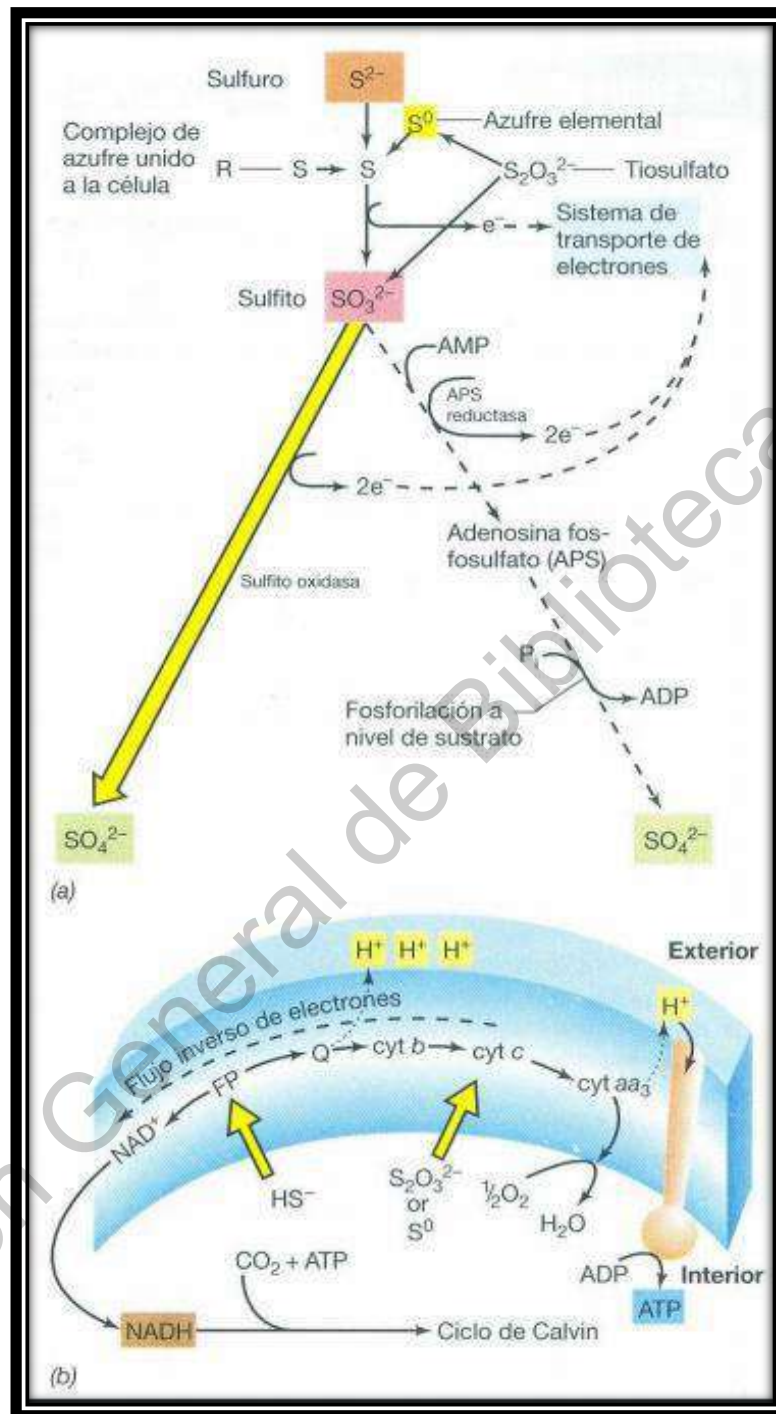


Figura 120. Vía Sulfito oxidasa. La adenosina fosfosulfato reductasa (APS) la emplean pocos microorganismos que oxidan el sulfito. Los electrones liberados entran a nivel del citocromo C, para formar ATP. El NADH es producido por un flujo reverso de electrones para producir NADH necesario para la fijación del CO_2 en el ciclo de Calvin, (Prescott, 2002).

Cuadro 17. Bacterias oxidantes de azufre, (Prescott, 2002).

Géneros y especies	Donador inorgánico de electrones	Rango de pH de crecimiento
<i>Thiobacillus thioparus</i>	H ₂ S, sulfuros, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6 - 8
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6 - 8
<i>Halothiobacillus neapolitanus</i>	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6 - 8
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	S ⁰	2 - 4
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> *	S ⁰ , sulfuros metálicos, Fe ²⁺	2 - 4
<i>Starkeya movella</i> *	S ₂ O ₃ ²⁻	6 - 8
<i>Thiomomas intermedia</i> *	S ₂ O ₃ ²⁻	3 - 7

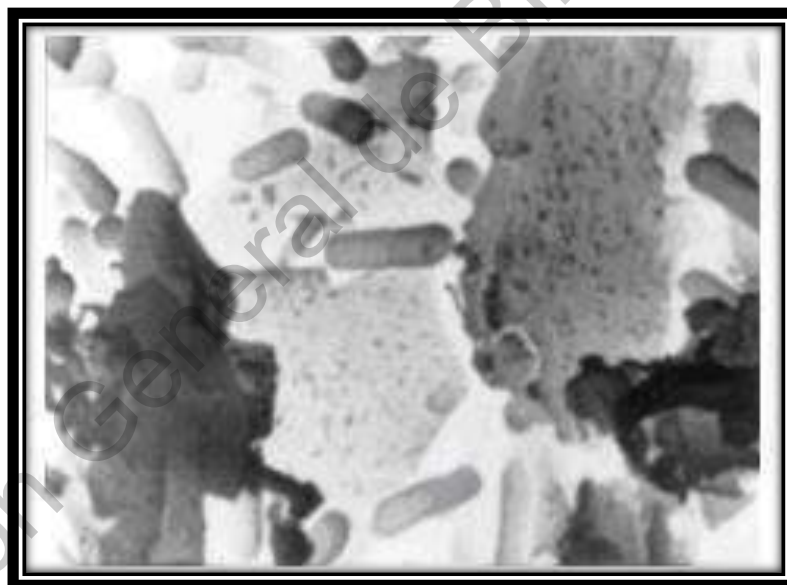


Figura 121. Micrografía *Acidithiobacillus thiooxidans*. Oxida el S⁰ y produce ácido sulfúrico. Aunque ha sido aislado del suelo se le ha observado en la corrosión del concreto de tubos de alcantarilla, transformando el gas de sulfuro en ácido sulfúrico en aguas residuales, (Kim, 2008).

Cuadro 18. Bacterias oxidantes de azufre. Bacterias filamentosas* quimiolitótrofas del azufre y otros géneros, (Prescott, 2002).

Géneros y especies	Donador inorgánico de electrones	Rango de pH de crecimiento
<i>Beggiatoa</i> *	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻	6 - 8
<i>Thiothrix</i> *	H ₂ S	6 - 8
<i>Thioploca</i> *	H ₂ S, S ⁰	---
<i>Achromatium</i>	H ₂ S	---
<i>Thiomicrospira</i>	S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂ S	6 - 8
<i>Thiosphaera</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂	6 - 8
<i>Thermothrix</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ⁻	6.5 - 7.5
<i>Thiovulum</i>	H ₂ S, S ⁰	6 - 8

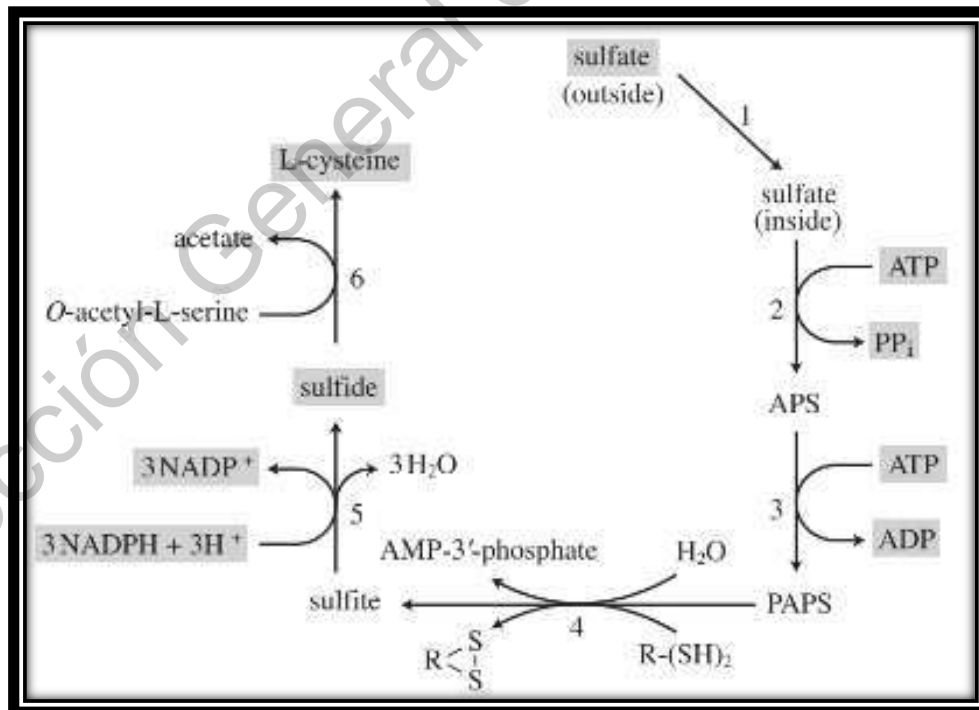


Figura 121. Asimilación por reducción del sulfato y síntesis de cisteína, (Kim, 2008).

5.2.3 Bacterias oxidantes del hierro

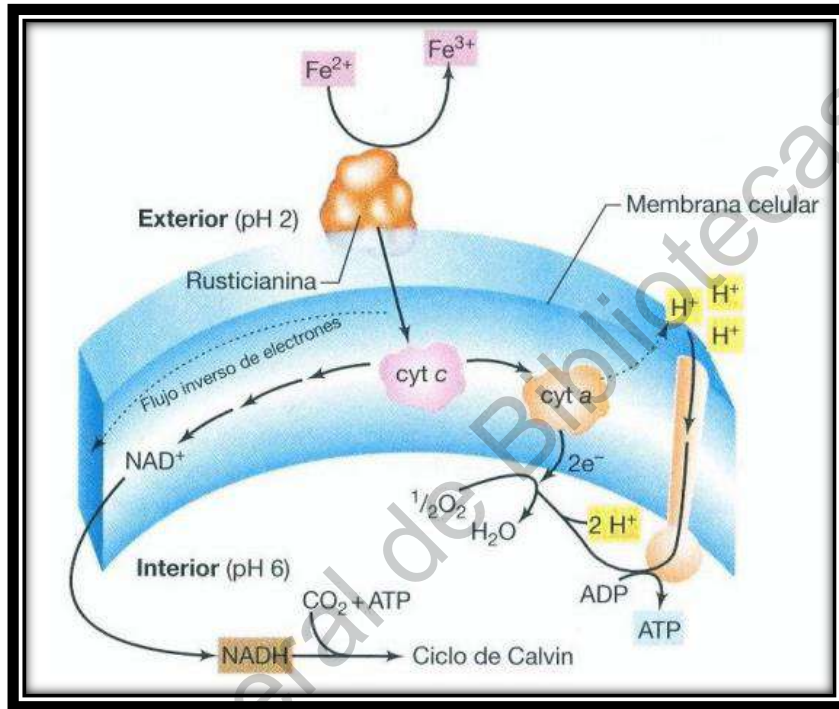
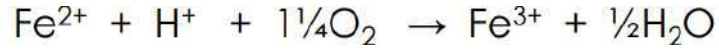


Figura 122. Rusticianina, proteína periplásmica que contiene hierro. Los electrones liberados entran a nivel del citocromo C, para formar ATP. El NADH es producido por un flujo reverso de electrones para producir NADH necesario para la fijación del CO_2 en el ciclo de Calvin.

5.2.4 Bacterias oxidantes de hidrógeno

Son bacterias Gram negativas, con Hidrogenasa membranas y citoplasmática, metabolismo litoautotrófico y quimiolitotrófico, produce polihidroxicarbonatos (Figuras 123-125, Cuadros 19 y 20).

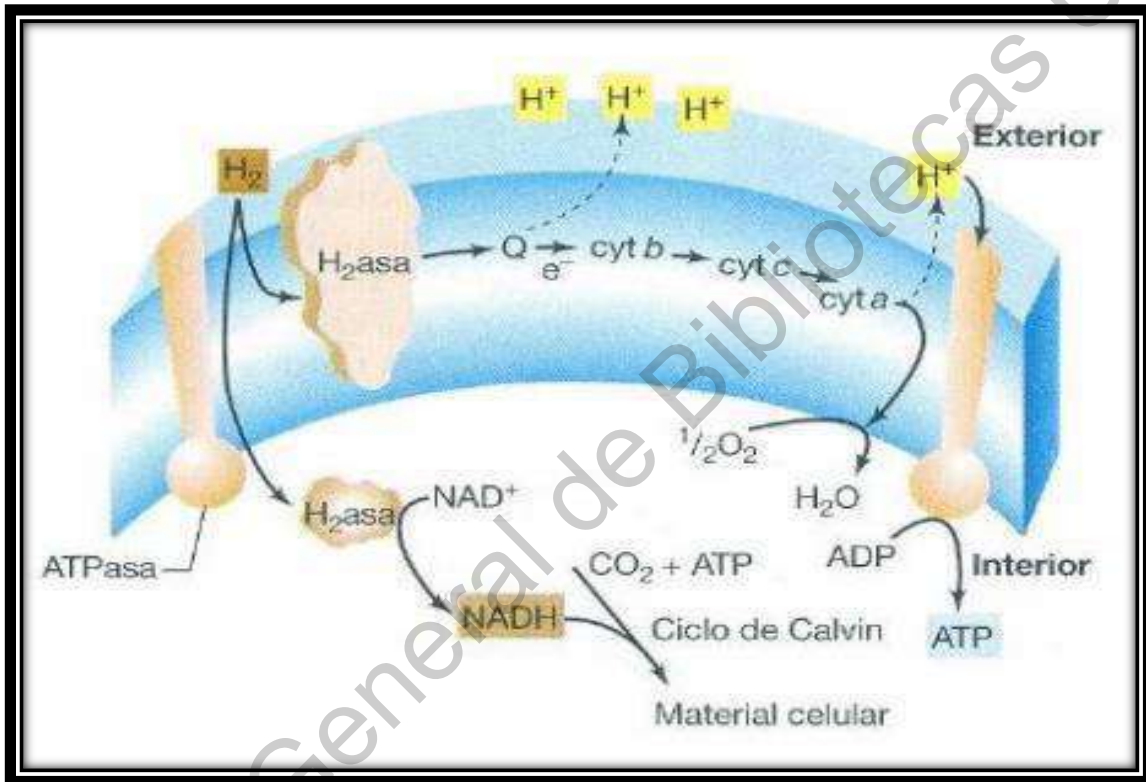
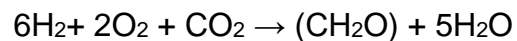
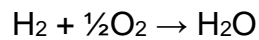


Figura 123. Bacterias del hidrógeno quimioheterótrofas. La reacción la cataliza la enzima Hidrogenasa (cofactor Ni²⁺). Pueden contener 2 hidrogenasas, una unida a la membrana y otra citoplasmática, (Prescott, 2002).



Cuadro 19. Bacterias oxidantes del hidrógeno, (Presscott, 2002).

Gram negativas	
Géneros y especies	Características
<i>Acidovorax facilis</i>	Hidrogenasa membranal.
<i>Ralstonia eutropha</i>	Hidrogenasa membranal y citoplasmática.
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	Hidrogenasa membranal y citoplasmática.
<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	Hidrogenasa membranal.
<i>Pseudomonas carboxydovorans</i>	Hidrogenasa membranal y oxida CO (carboxidotrófica).
<i>Hydrogenophaga flava</i>	Colonias amarillo brillante.
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Hidrogenasa membranal y es desnitrificante.
<i>Aquifex pyrophilus</i>	Hipertérmofila, microaerofílica o anaerobia con NO_3^- , quimiolitioautótrofo obligado, usa también S^0 o $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Hipertérmofila, aerobia obligada, quimiolitioautótrofo obligado, usa también S^0 o $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

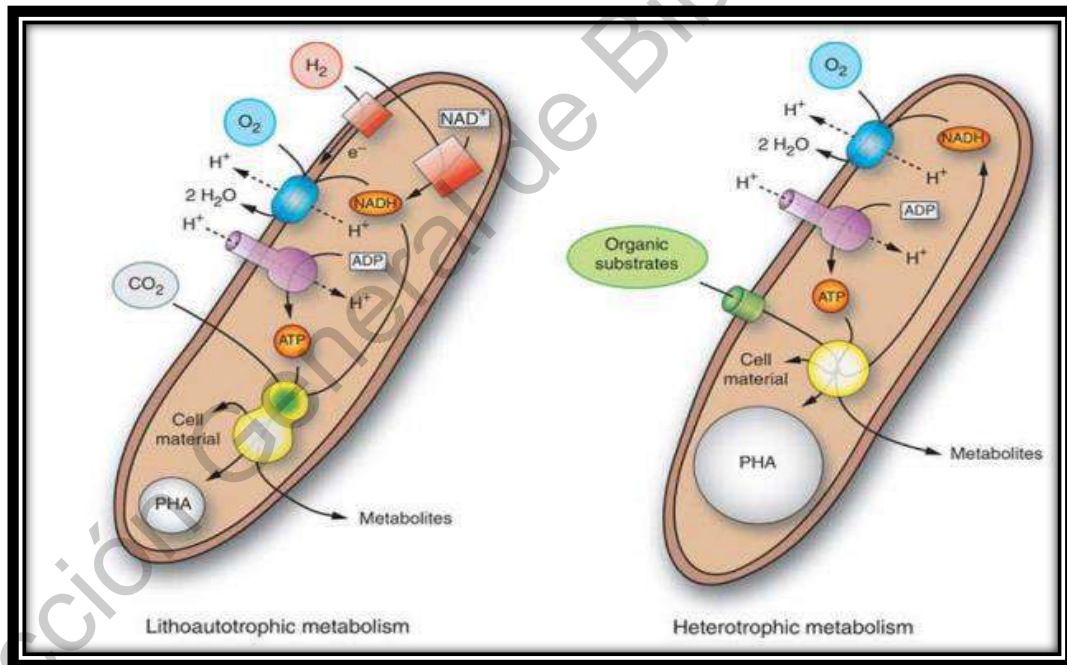


Figura 124. *Ralstonia eutropha*, aspectos principales del metabolismo heterotrófico y lito autotrófico. Los círculos amarillos representan el metabolismo central, mientras que las áreas verde-amarillas el ciclo de Calvin, los cuadrados rojos representan las 2 hidrogenasas para la conservación de la energía, (Pohlmann, 2006).

Cuadro 20. Bacterias oxidantes del hidrógeno.

Bacterias oxidantes de hidrógeno	
◦ Gram positivas	
Géneros y especies	Características
<i>Bacillus schlegelii</i>	Produce endosporas, también emplea CO o $S_2O_3^{2-}$ como donador de electrones.
<i>Arthrobacter</i> sp	Hidrogenasa membranal.
<i>Mycobacterium gordonae</i>	BAAR, colonias amarillo a naranja.

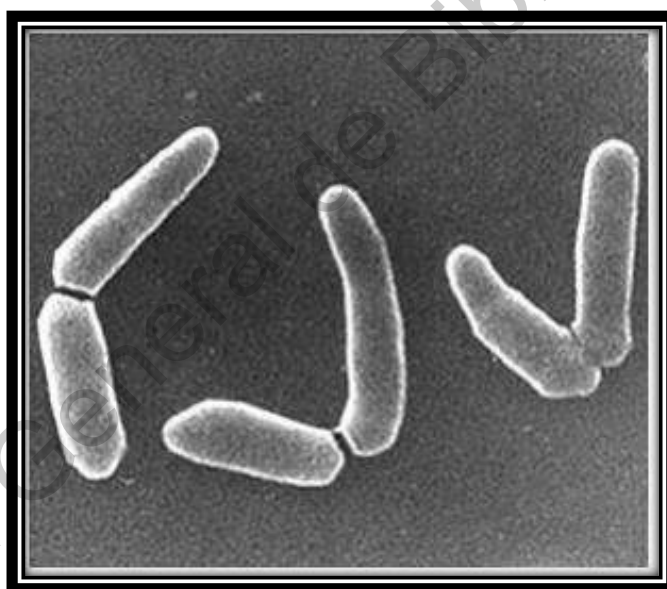


Figura 125. *Arthrobacter* spp. Bacterias del suelo capaces de degradar simbióticamente con *Streptomyces* compuestos tóxicos. Juntos pueden degradar los insecticidas organofosforados totalmente y emplearlos como única fuente de carbono y energía. *Arthrobacter* puede reducir el cromo hexavalente a trivalente (menos tóxico).

5.2.5 Vía de la fijación de CO₂ en quimiolitótrofos

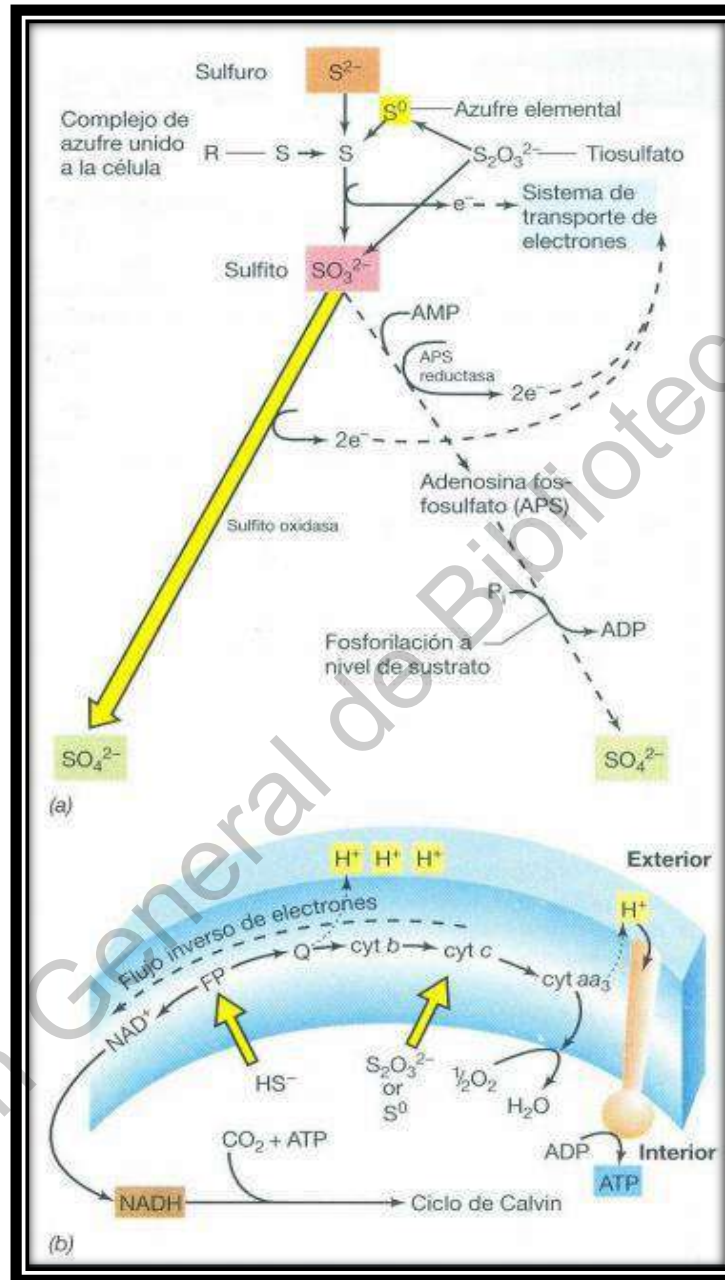


Figura 126. Vía Sulfito oxidasa. La adenosina fosfosulfato reductasa (APS) la emplean pocos microorganismos que oxidan el sulfito. Los electrones liberados entran a nivel del citocromo C, para formar ATP. El NADH es producido por un flujo reverso de electrones para producir NADH necesario para la fijación del CO₂ en el ciclo de Calvin, (Madigan 2015).

5.3 Metabolismo fotolitotrófico

La fotosíntesis es un proceso básico para la vida. Este proceso por el cual las plantas y algunas bacterias, llamadas fototrofos, convierten la energía radiante en forma de luz en energía metabólica (ATP) y poder reductor ($\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$). En contraste a las plantas y algas las bacterias fotosintéticas no necesitan oxígeno, no liberan oxígeno y por lo tanto son anaerobios naturales (Figuras 127 y 128).

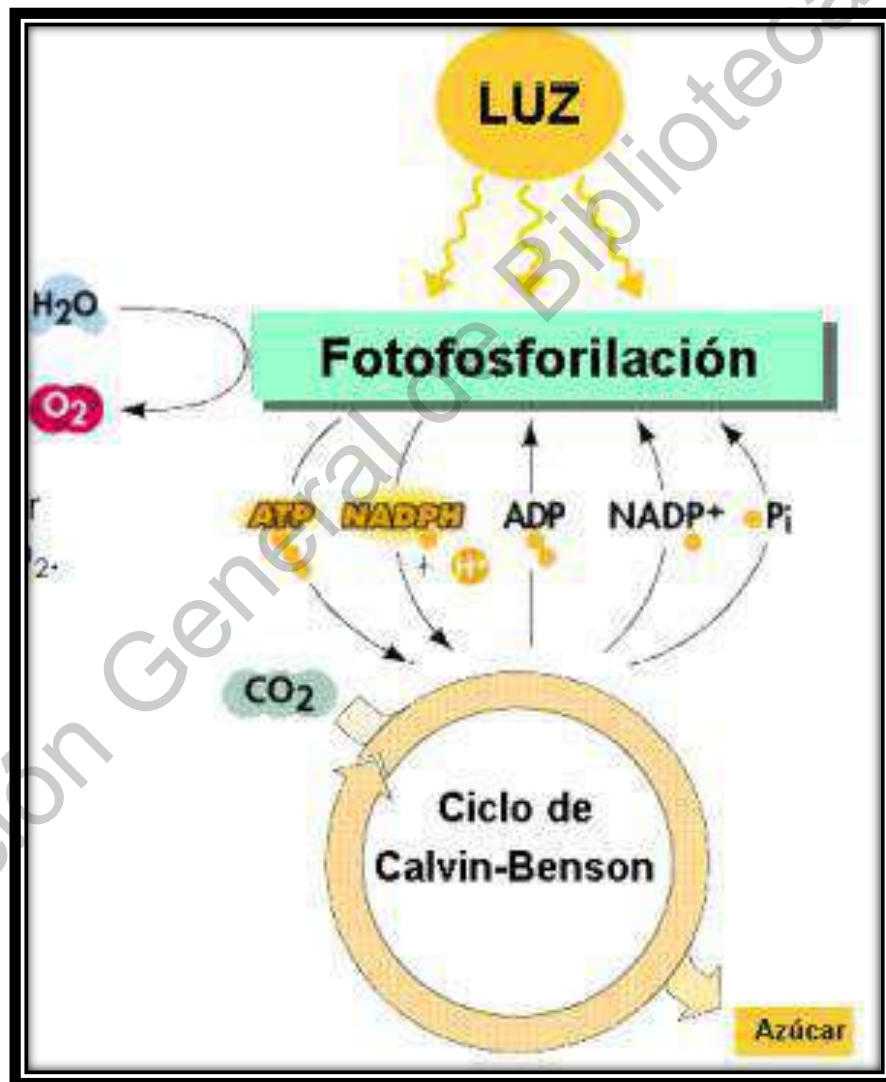


Figura 127. Los organismos fotolitotróficos emplean el ATP y el poder reductor para fijar el CO_2 a través del ciclo de Calvin, (Madigan, 2015).

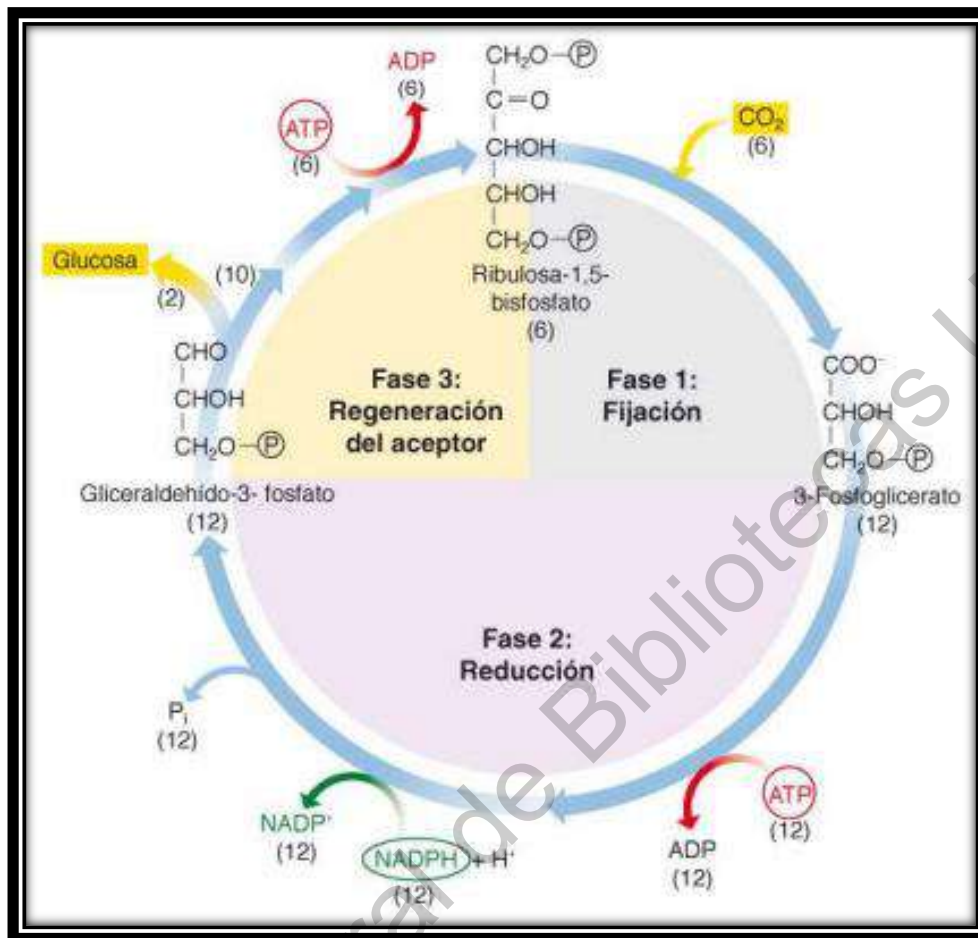


Figura 128. El ciclo de Calvin. Tiene 3 fases: Fase 1: Fijación del carbono a través de Rubisco. Fase 2: Reducción. Usa el poder reductor de NADPH para transformar el fosfoglicerato en gliceraldehído 3-fosfato. Fase 3: Recuperación del CO_2 . De cada 6b moléculas de gliceraldehído 3-fosfato 5 se transforman en 3 moléculas de ribulosa difosfato y la otra se considera el rendimiento neto del ciclo, (Moat, 2002).

5.3.1 Fotosíntesis

Los microorganismos que utilizan la luz como fuente de energía para sus procesos biosintéticos, incluyen algas eucariontes, cianobacterias (Cuadro 21), bacterias fotosintéticas (Cuadro 22), y bacterias fototróficas anoxigénicas aeróbicas. En la fotosíntesis oxigénica se genera oxígeno y el agua es usada como donador de electrones. En la fotosíntesis anoxigénica compuestos orgánicos o de azufre son

usados como donadores de electrones. El sistema fotosintético consta de un centro de reacción asociado íntimamente a moléculas antena (Figuras 130-140).

Cuadro 21. Toxinas producidas por cianobacterias, (Bonilla, 2009).

Toxina	Cianobacteria productora	Toxina	Cianobacteria productora
Hepatotoxinas		Neurotoxinas	
1) Microcistina (MCYS)	<i>Dolichospermum</i> spp <i>Anabaenopsis millerii</i> <i>Microcystis</i> spp <i>Nostoc</i> sp <i>Oscillatoria limosa</i> <i>Planktothrix</i> spp	Anatoxina a (ANTX-a)	<i>Dolichospermum</i> spp <i>Aphanizomenon</i> spp <i>Cylindrospermum</i> sp <i>Microcystis</i> spp <i>Oscillatoria</i> spp <i>Planktothrix</i> spp
2) Nodularina	<i>Nodularia</i> spp	Anatoxina a (S) (ANTX-s)	<i>Dolichospermum</i> spp
3) Cilindrospermopsina (CYN)	<i>Aphanizomenon</i> spp <i>Raphidiopsis</i> spp	Saxitoxina (SXT)	<i>Dolichospermum circinalis</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> <i>Raphidiopsis raciborskii</i> <i>Lyngbya wolleii</i>
Dermotoxina			
Aplisiatoxina Lyngbiatoxina	<i>Lyngbya</i> spp		
Imitantes			
Lipopolisacáridos (LPS)	Todas las especies		

Cuadro 22. Bacterias fotosintéticas, (Kim, 2008).

Pigmentos Fotosintéticos en Bacterias Fotosintetizadoras	
Tipo de organismo	Pigmento presente
Bacterias púrpuras	Bacterioclorofila a ó b Carotenos
Bacterias verdes	Bacterioclorofila a, c, d ó e Carotenos
Heliobacterias	Bacterioclorofila g Carotenos
<i>Candidatus Chloracidobacterium thermophilum</i>	Bacterioclorofila a y c Carotenos y xantofilas Clorofila a
Cianobacterias	Clorofila a y b Ficobilinas

Cuadro 23. Pigmentos fotosintéticos, (Kim, 2008).

Pigmento	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Máximo de absorción (nm)	
								<i>In vivo</i>	Extracto (metanol)
Bacterioclorofila <i>a</i> (bacterias rojas)	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	---CH_3^b	$\text{---CH}_2\text{---CH}_3$	---CH_3	$\begin{array}{c} \text{---C---O---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	P/Cg ^a ---H		805 830-890	771
Bacterioclorofila <i>b</i> (bacteria rojas)	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	---CH_3^c	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{H} \end{array}$	---CH_3	$\begin{array}{c} \text{---C---O---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	P	---H	835-850 1020-1040	794
Bacterioclorofila <i>c</i> (bacterias verdes del azufre)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	---CH_3	$\text{---C}_2\text{H}_5$ $\text{---C}_3\text{H}_7^d$ $\text{---C}_4\text{H}_9$	$\text{---C}_2\text{H}_5$ ---CH_3	---H	F	---CH_3	745-755	660-669
Bacterioclorofila <i>c</i> ₂ (bacterias verdes no del azufre)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	---CH_3	$\text{---C}_2\text{H}_5$	---CH_3	---H	S	---CH_3	740	667
Bacterioclorofila <i>d</i> (bacterias verdes del azufre)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	---CH_3	$\text{---C}_2\text{H}_5$ $\text{---C}_3\text{H}_7$ $\text{---C}_4\text{H}_9$	$\text{---C}_2\text{H}_5$ ---CH_3	---H	F	---H	705-740	654
Bacterioclorofila <i>e</i> (bacterias verdes del azufre)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{---C---H} \\ \\ \text{O} \end{array}$	$\text{---C}_2\text{H}_5$ $\text{---C}_3\text{H}_7$ $\text{---C}_4\text{H}_9$	$\text{---C}_3\text{H}_5$	---H	F	---CH_3	719-726	646
Bacterioclorofila <i>g</i> (heliobacterias)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C=CH}_2 \end{array}$	---CH_3^b	$\text{---C}_2\text{H}_5$	---CH_3	$\begin{array}{c} \text{---C---O---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	F	---H	670-788	765

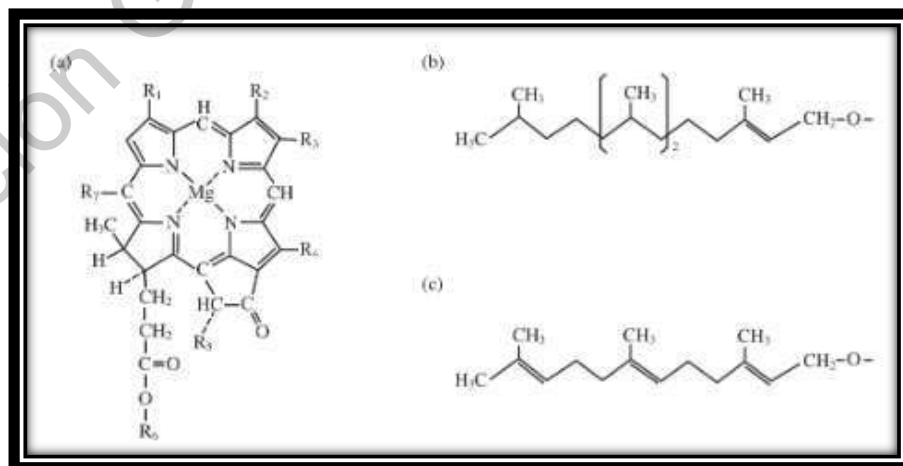


Figura 129. Estructura de la clorofila, (Kim, 2008).

5.3.1.1 Microorganismos fotosintéticos

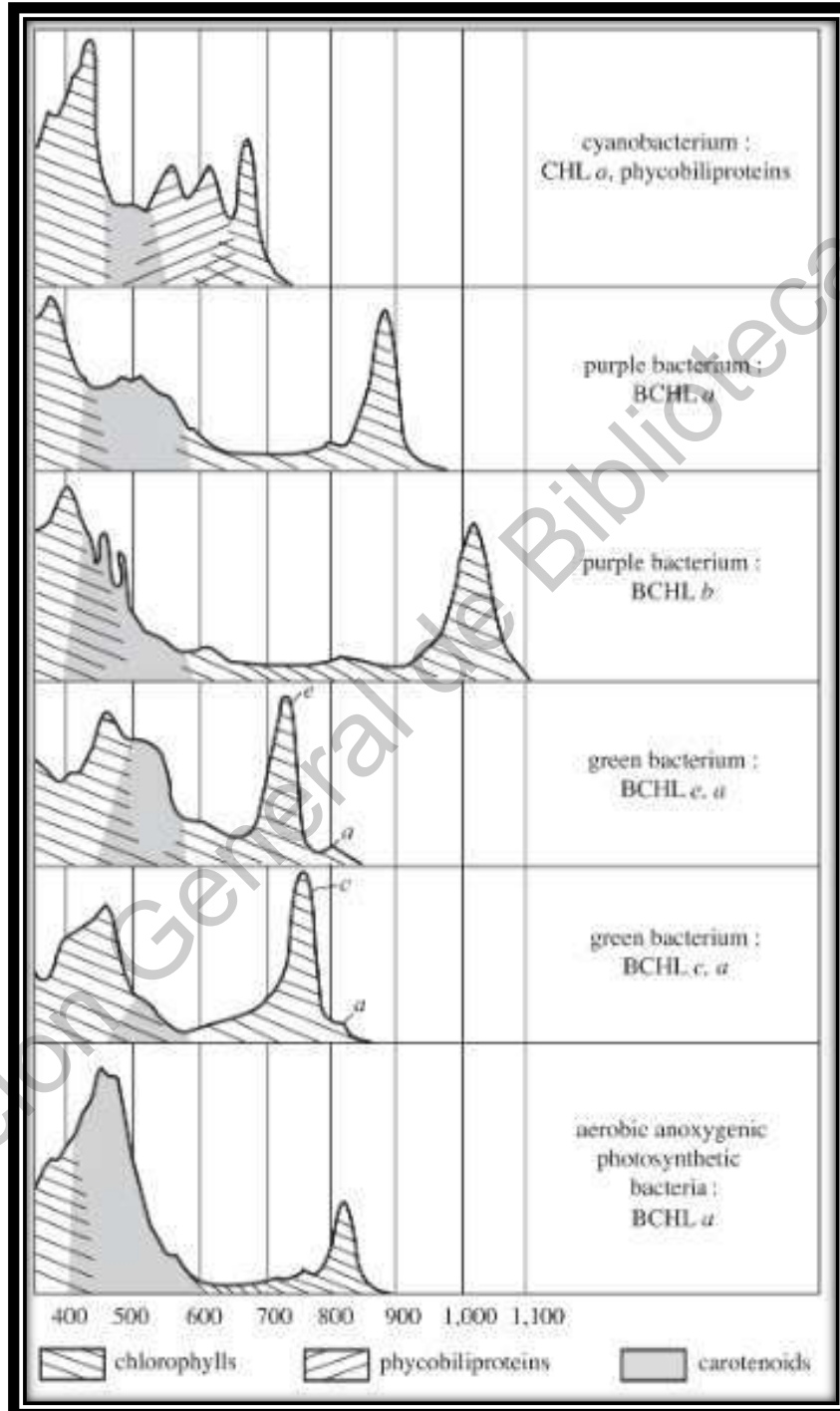


Figura 130. Espectro de absorción de organismo fotosintéticos, (Kim, 2008).

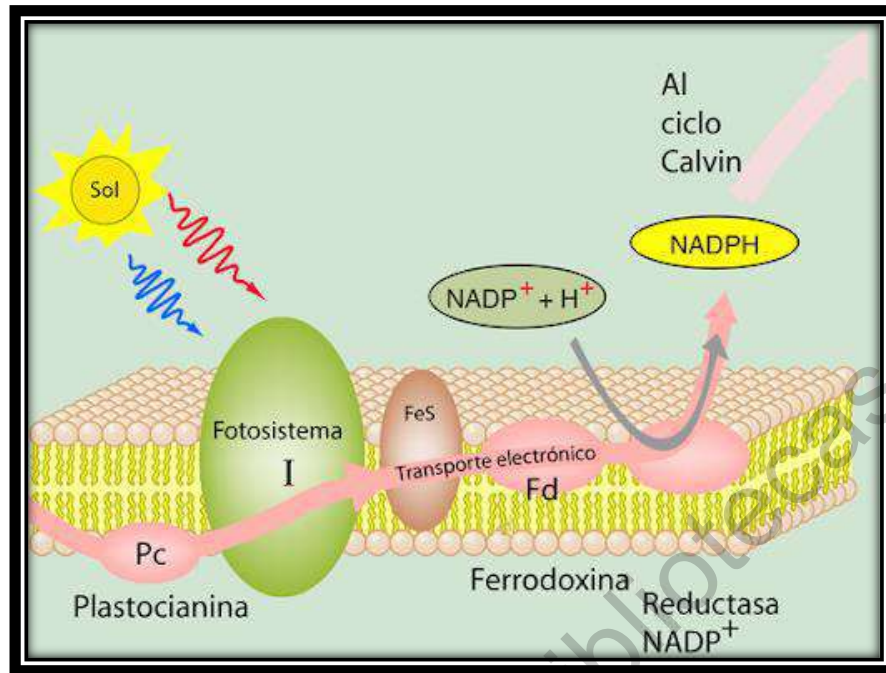


Figura 131. Fotosistema I: flujo cíclico de electrones acoplado a la fosforilación, (Madigan, 2015).

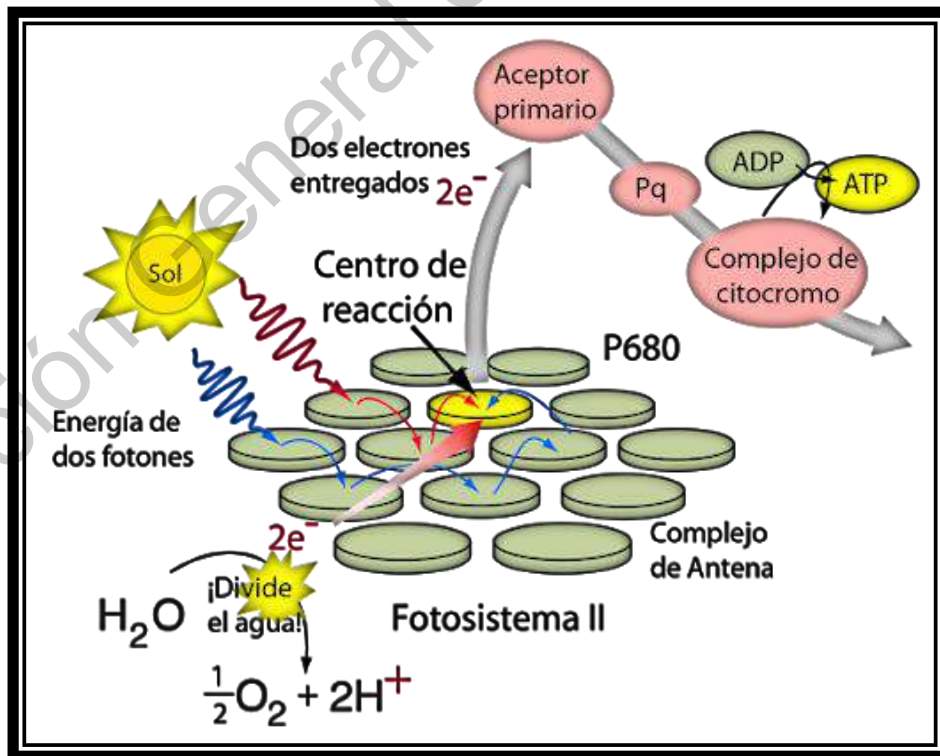


Figura 132. Flujo de electrones en la planta durante la fotosíntesis, (Kim, 2008).

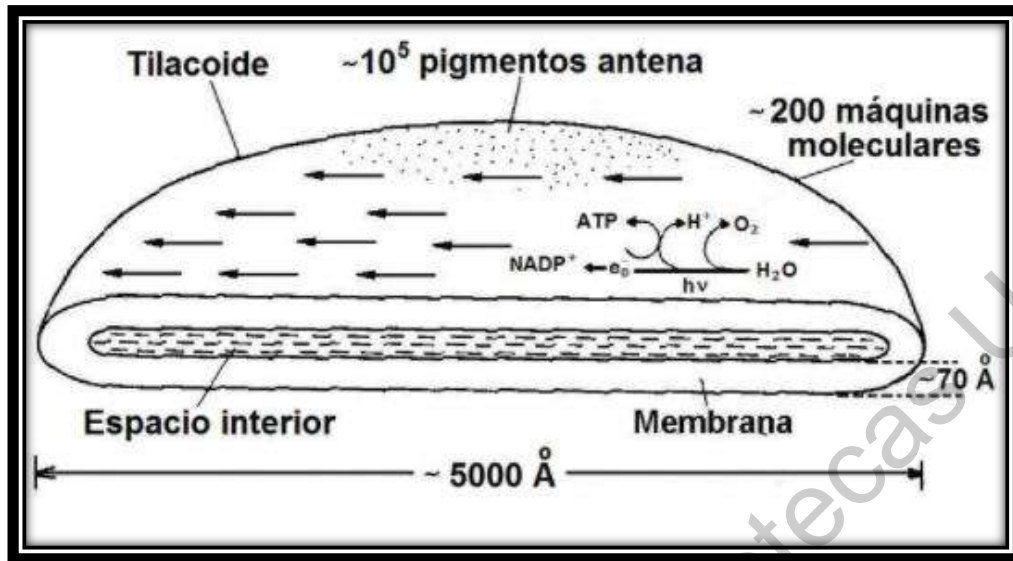


Figura 133. Tilacoides, organelos fotosintéticos en cianobacterias, (Kim, 2008).

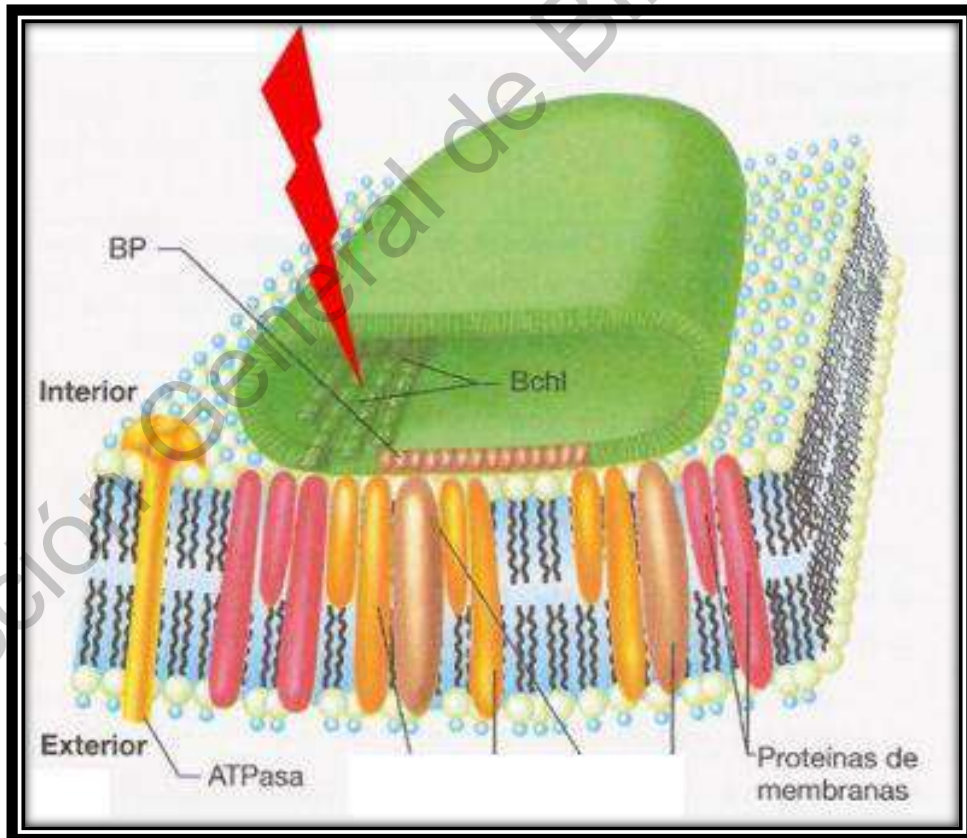


Figura 134. Clorosoma unido a la membrana citoplasmática en bacterias verdes.

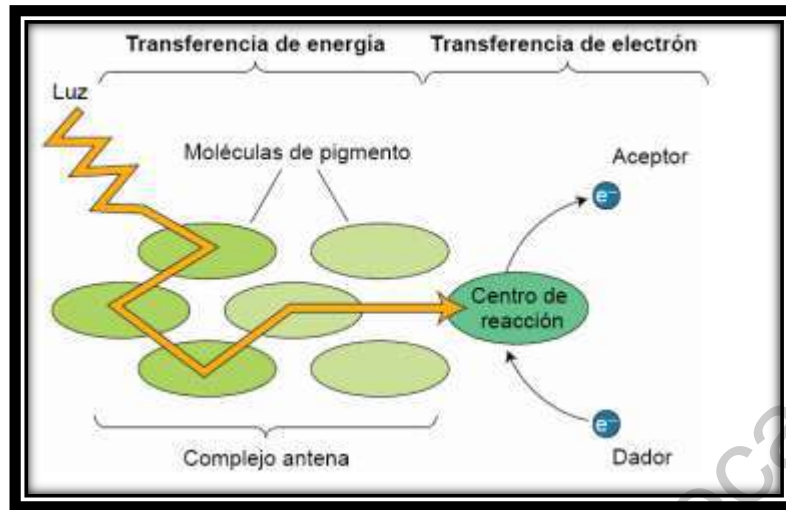


Figura 135. Aparato fotosintético en bacterias púrpuras.

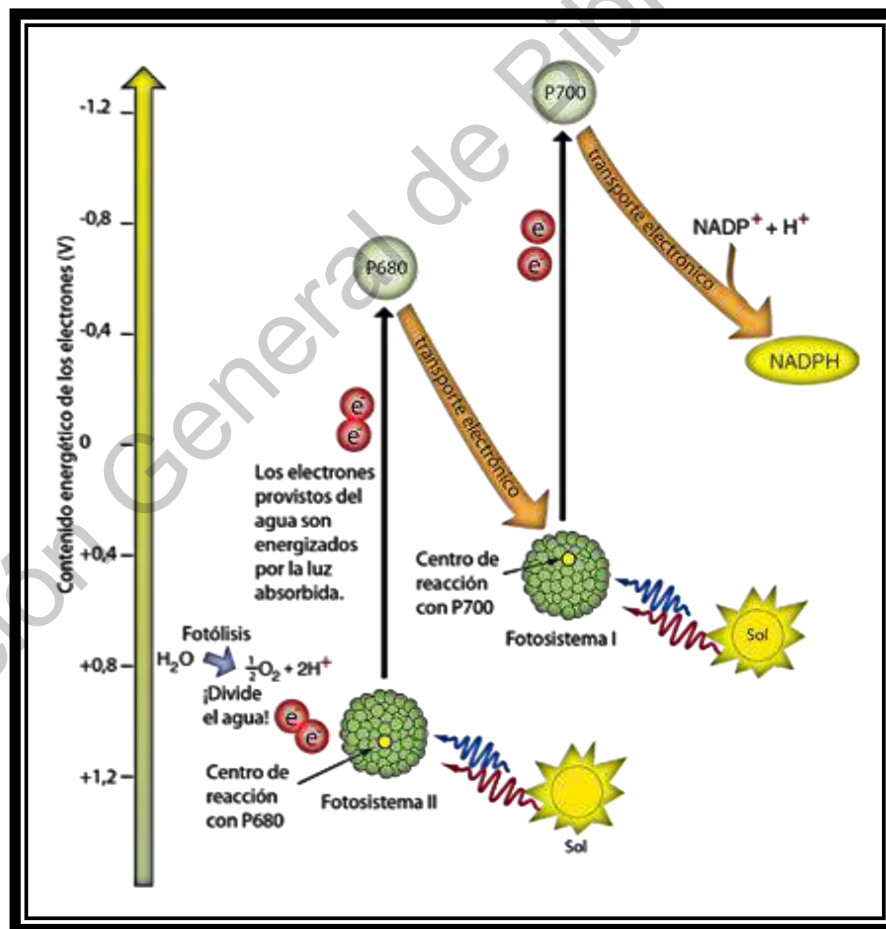


Figura 136. Cadena fotosintética de transporte de electrones de cianobacterias, (Kim, 2008).

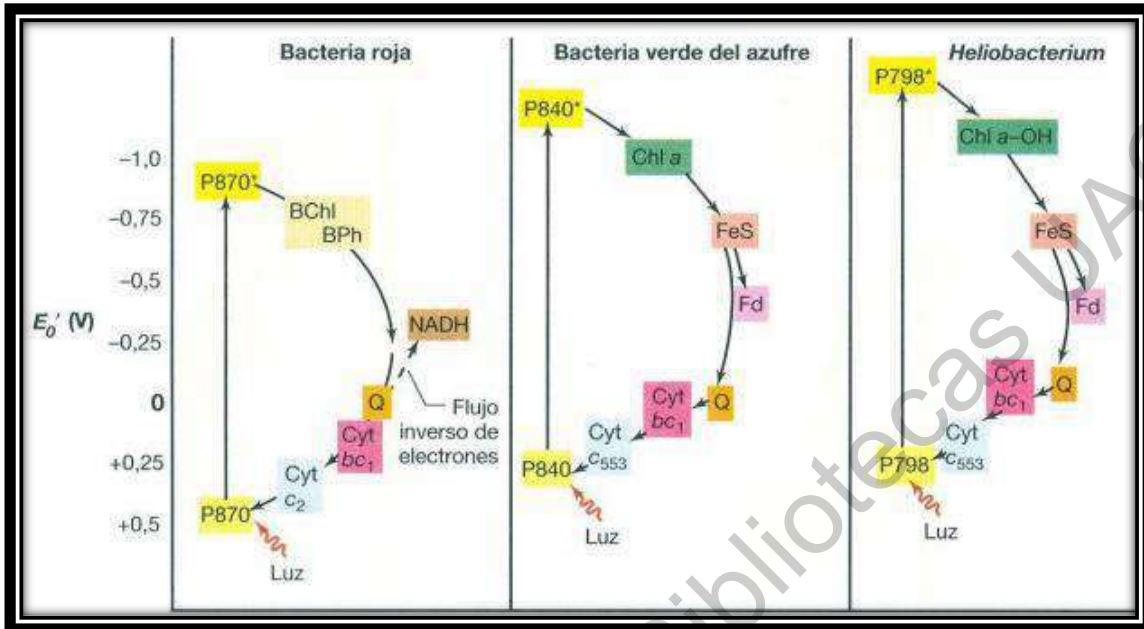


Figura 137. Bacterias fotosintéticas anoxygenicas, (Kim, 2008).

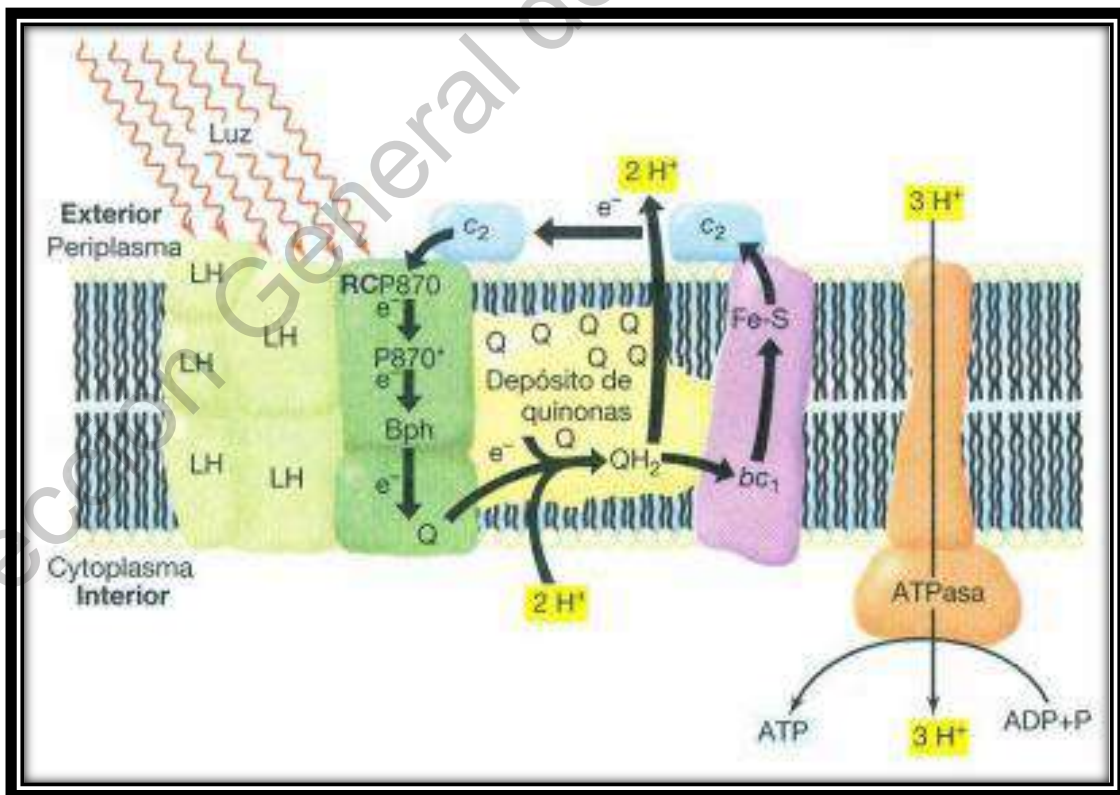


Figura 138. Reacciones de luz en bacterias púrpuras, (Kim, 2008).

Cuadro 24. Diferencias entre plantas y bacterias durante la fotosíntesis, (Tortora,2013).

	Plantas fotosintéticas	Bacterias fotosintéticas
Organismos	Plantas, algas, cianobacterias	Bacterias púrpuras y verdes
Tipo de clorofila	Clorofila a absorbancia 650-750nm	Bacterioclorofila absorbancia 800-1000nm
Fotosistema I (Fotofosforilación cíclica)	Presente	Presente
Fotosistema II (Fotofosforilación no cíclica)	Presente	Ausente
Producen O ₂	Si	no
Donador de electrones fotosintético	H ₂ O	H ₂ S, otros compuestos de azufre, compuestos orgánicos

5.3.1.2 Metabolismo del carbono en fotoorganótrofos

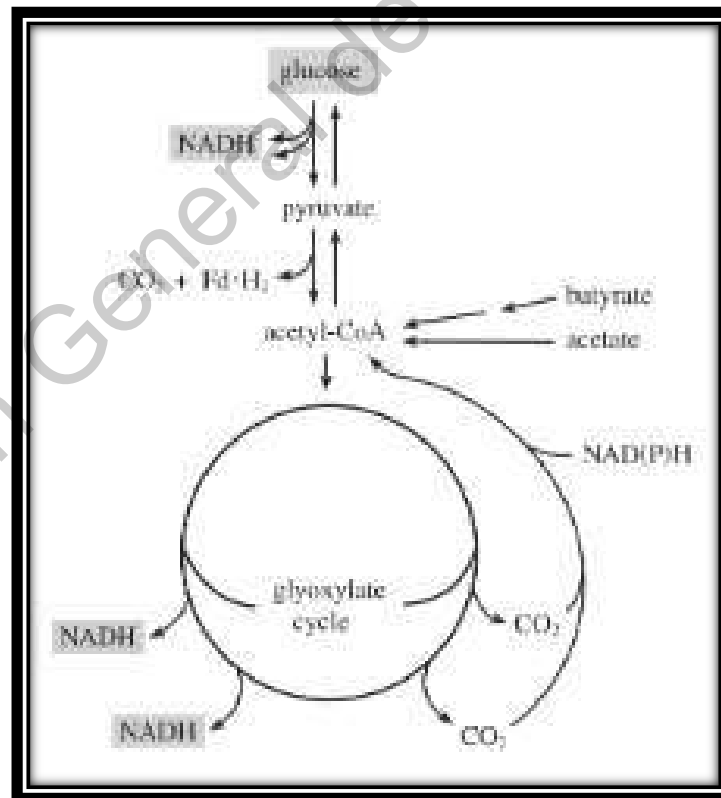


Figura 139. Metabolismo fotoorganótrofico en bacterias púrpuras, (Kim, 2008).

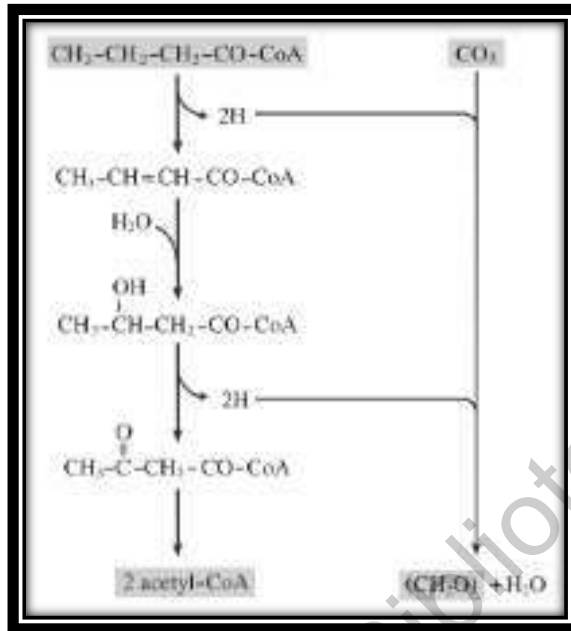


Figura 140. Butirato metabolizado por bacterias púrpuras, (Kim, 2008).

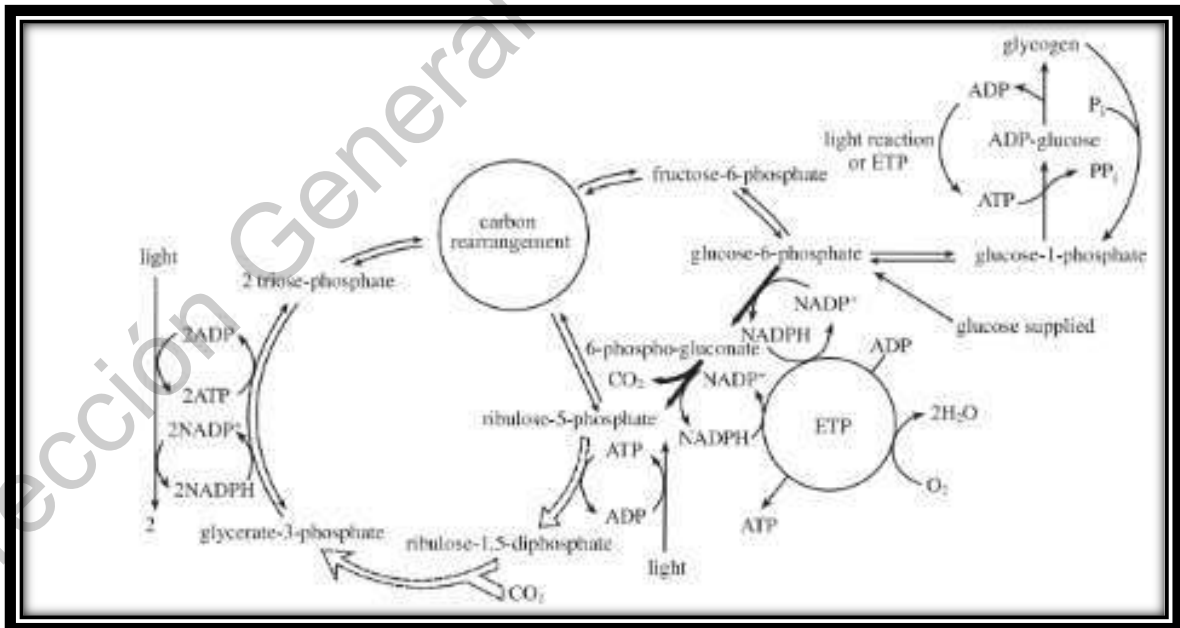


Figura 141. Metabolismo del carbono por cianobacterias, (Kim, 2008).

5.4 Respiración

5.4.1 Anaerobia

La respiración anaerobia (o anaeróbica) es un proceso biológico llevado a cabo por los microorganismos anaerobios (Cuadro 25), que consiste en la oxidorreducción de monosacáridos y otros compuestos en el que el aceptor terminal de electrones es una molécula inorgánica distinta del oxígeno, y más raramente una molécula orgánica.

Cuadro 25. Ejemplo de respiraciones anaerobias en procariontes, (Prescott, 2002).

Aceptor	Producto reducido	Denominación del proceso	Ejemplos
fumarato	succinato	Respiración anaerobia de c.orgánico	Enterobacterias
CO ₂	CH ₄	Metanogénesis	Arqueas metanogénicas
NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ N ₂	Respiración anaerobia: desnitrificación	<i>Pseudomonas, Bacillus</i>
NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Respiración anaerobia: reducción de nitratos	Enterobacterias
SO ₄ ²⁻	S ⁰ SH ₂	Respiración anaerobia: reducción de sulfatos	Sulfatorreductoras (<i>Desulfovibrio, Desulfotomaculum</i>)
Fe ³⁺	Fe ²⁺	Respiración anaerobia: reducción de hierro	<i>Pseudomonas, Bacillus</i>

5.4.1.1 Denitrificación

Las enterobacterias solo llevan a cabo la respiración de nitratos a nitritos (nitrato reductasa). Las bacterias desnitrificantes (*Pseudomonas aeuroginosas, Paracoccus desnitrificans, Rhodobacter sphaeroides*) pueden además reducir los nitritos a gases en un proceso llamado desnitrificación (Figura 142).

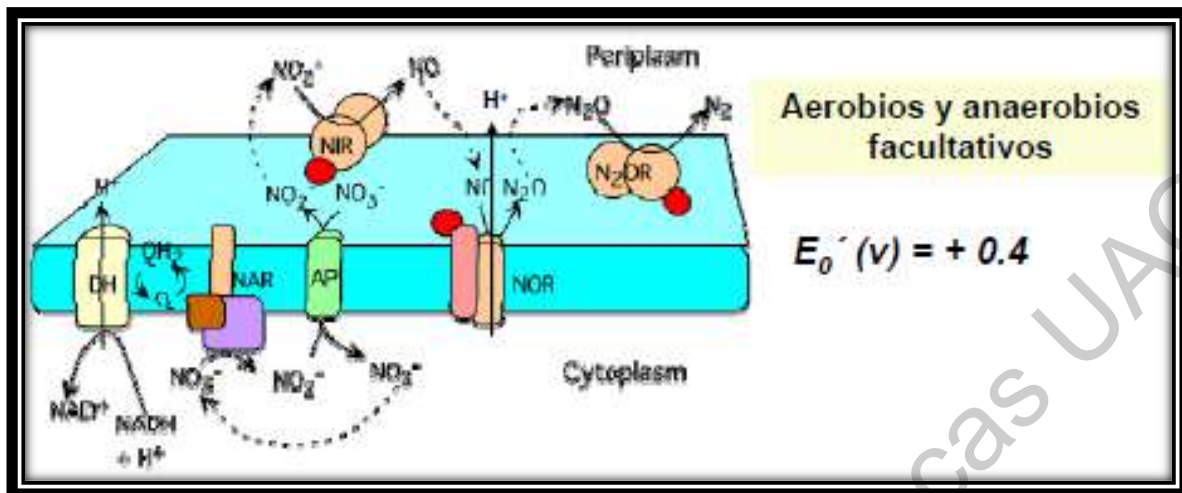


Figura 142. Desnitrificación en la membrana. DH: NADH deshidrogenasa, NAR]: nitrito reductasa, NIR: nitrito reductasa, NOR: nitrito reductasa, N₂OR: nitrito oxidoreductasa, (Madigan, 2015).

5.4.1.2 Reducción de metales

La reducción de hierro férrico se da por la respiración anaerobia de hierro férrico en anaerobios facultativos y estrictos, el Fe³⁺ es abundante en el hábitat.



Los microorganismos que utilizan óxidos de Fe³⁺ insolubles (Figura 142) como aceptores electrones pueden tener una función importante en los ciclos de la materia en sedimentos acuáticos y en biorremediación de aguas subterráneas contaminadas con metales.



Figura 143. Micrografía de *Geobacter metallireducens*. Es capaz de obtener energía a través de la reducción desasimiladora de hierro, manganeso y otros metales. Además, este organismo es capaz de oxidar compuestos aromáticos contaminantes. Esto lo hace un potencial agente de biorremediación, (Moat, 2002).

5.4.1.3 Sulfidogénesis

En bacterias sulfato reductoras se genera la respiración anaerobia de sulfatos conocida como reducción desasimiladora de sulfatos (Figura 144). Estas bacterias se encuentran en ambientes anaerobios marinos ricos en óxidos de azufre (Figura 145-146).

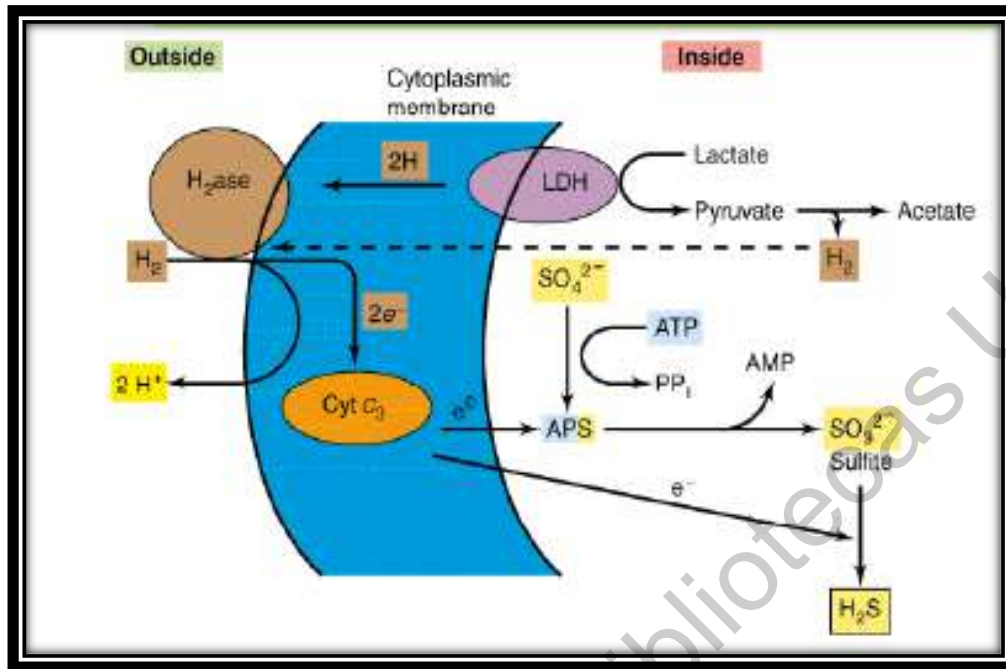


Figura 144. Reducción desasimiladora de sulfatos. El H₂ externo puede formarse también como producto de la fermentación además de por el catabolismo de lactato y piruvato, (Madigan, 2015).

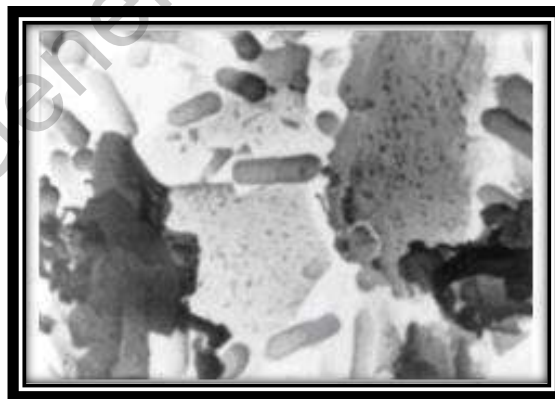


Figura 145. Micrografía *Acidithiobacillus thiooxidans*. Oxida el S⁰ y produce ácido sulfúrico. Aunque ha sido aislado del suelo se le ha observado en la corrosión del concreto de tubos de alcantarilla, transformando el gas de sulfuro en ácido sulfúrico en aguas residuales, (Moat, 2002).

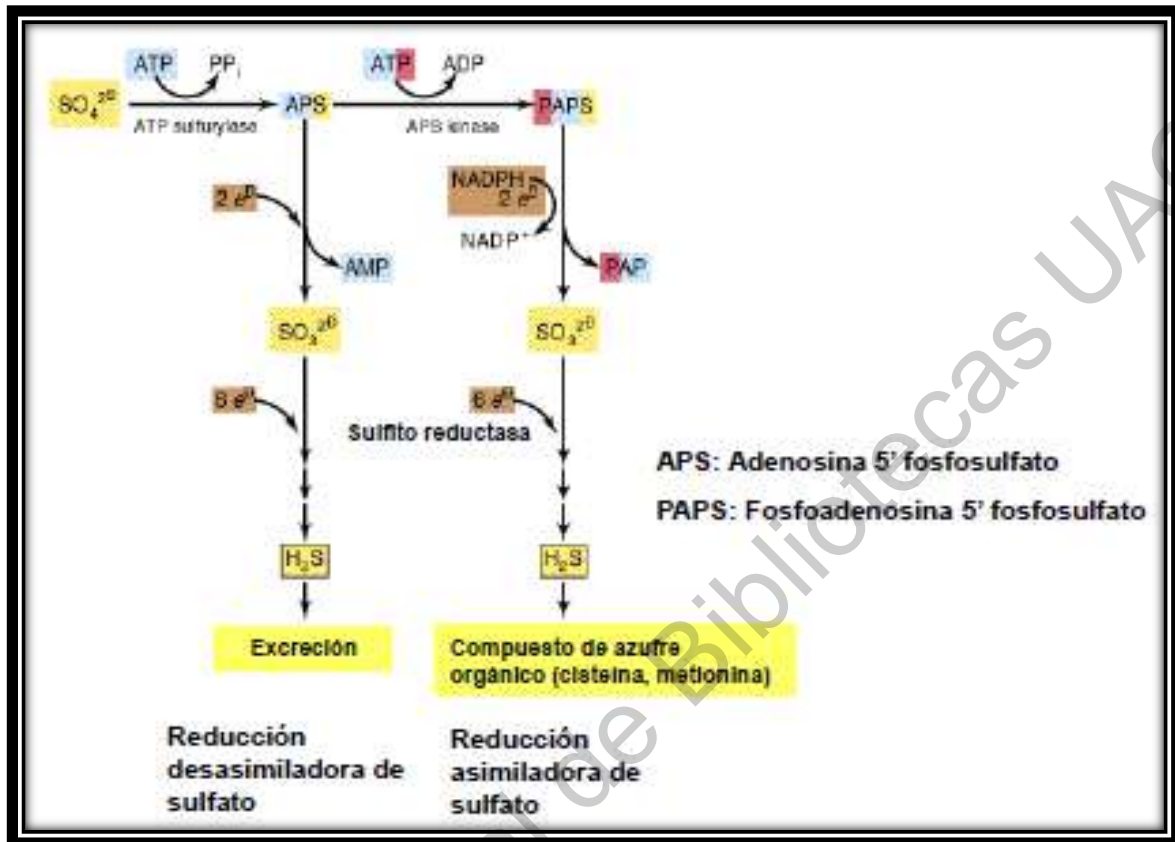
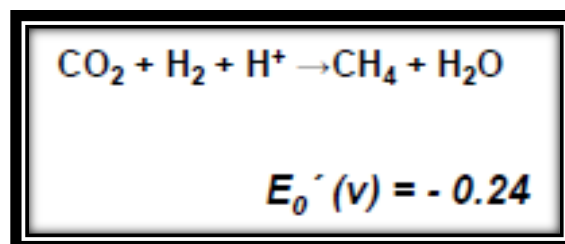


Figura 146. Comparación de reducciones asimiladoras y desasimiladoras de sulfatos, (Moat, 2002).

5.4.1.4 Metanogénesis

Los metanógenos (Figura 147) son un grupo importante de reductores de CO₂ anaerobios obligados del dominio *Archea* que producen metano como producto final. Se genera un gradiente de protones durante la metanogénesis. La reacción:



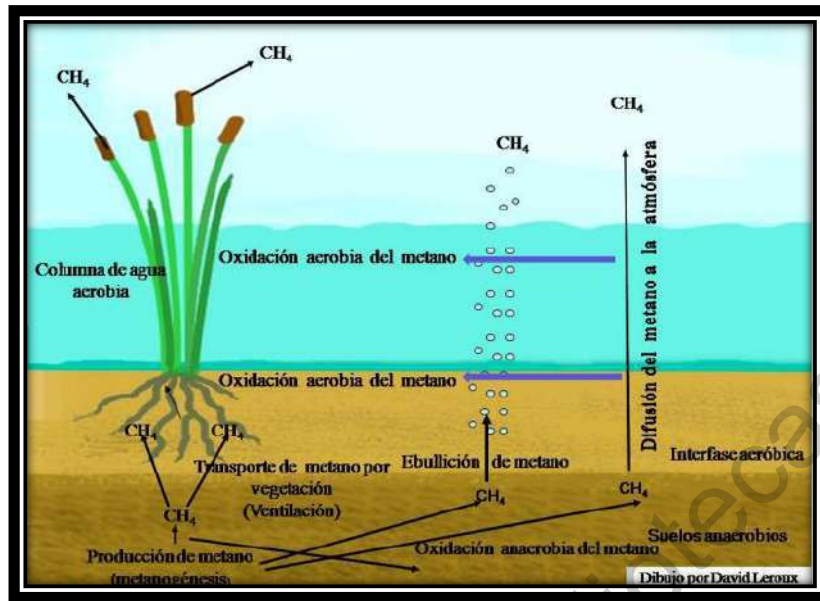


Figura 147. Metanógenos. Usan los carbonatos y lo convierten en metano utilizando hidrógeno como fuente de electrones, (Moat, 2002).

5.5 Metabolismo Intermediario

5.5.1 Degradación de polímeros

Las macromoléculas que existen en las células son polímeros (carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas) (Figura 148), están formadas por la unión de unidades más pequeñas.

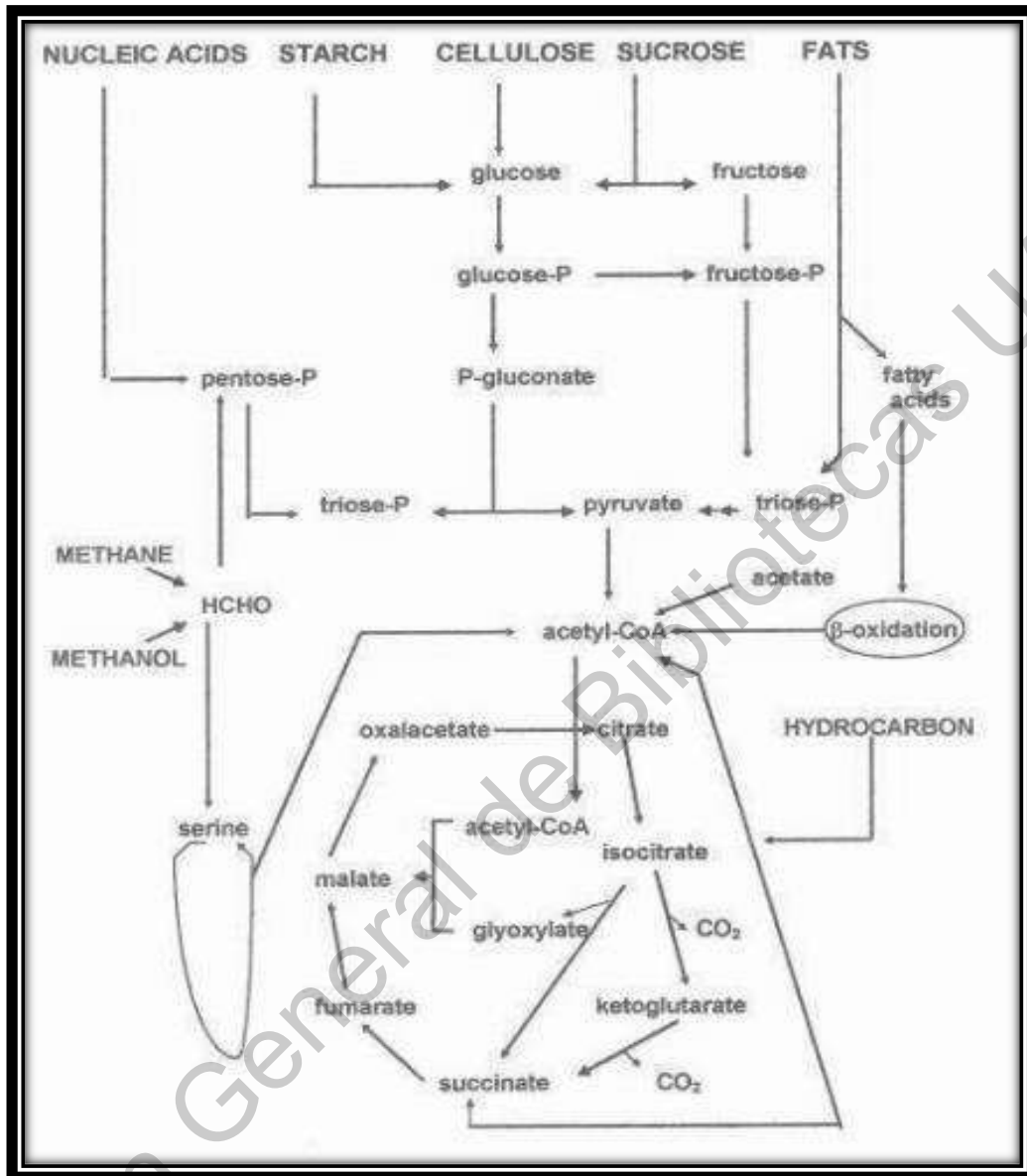


Figura 148. Diagrama general de la degradación de polímeros, (Doelle, 2010).

5.5.1.1 Carbohidratos

Los carbohidratos o polisacáridos están constituidos por monosacáridos (Cuadro 26). Los polisacáridos como el almidón o la celulosa, se hidrolizan primero a monómeros u oligómeros por enzimas extracelulares, antes de ser transportados al interior de la célula.

Cuadro 26. Degradación de polímeros de carbono, (González, 2004).

Degradación de polímeros de C			
Sustancias	Composición	Fuentes	Enzimas catabólicas
Celulosa	Polímero de glucosa (β -1,4-)	Plantas (hojas, tallos)	Celulasa (β -1,4-glucanasa)
Almidón	Polímero de glucosa (α -1,4-)	Plantas (hojas, semillas)	Amilasa
Glucógeno	Polímero de glucosa (α -1,4- y β -1,6-)	Animales (músculo)	Amilasa, fosforilasa
Laminarina	Polímero de glucosa (β -1,3-)	Algas marina	β -1,3-Glucanasa (laminarinasa)
Paramilón	Polímero de glucosa (β -1,3-)	Algas	β -1,3-Glucanasa
Agar	Polímero de galactosa y ácido galacturónico.	Algas rojas	Agarasa

Degradación de polímeros de C			
Sustancias	Composición	Fuentes	Enzimas catabólicas
Quitina	Polímero de N-acetilglucosamina (β -1,4)	Hongos (paredes celulares), insectos (exoesqueleto)	Quitinasa
Pectina	Polímero de ácido galacturónico	Pectina (hojas, semillas)	Pectinasa (poligalacturonasa)
Dextrano	Polímero de glucosa	Cápulas o capas mucoides	Dextranasa
Xilano	Heteropolímero de xilosa y otros azúcares (β -1,4- y otros laterales α -1,2 o α -1,3)	Plantas	Xilanasa

El almidón es un polímero de glucosa constituido por amilosa y amilopeptina. Forman cadena fuertemente unidas por enlaces α -1,4-glucosídicos, mientras que las cadenas laterales tienen enlaces α -1,6-glucosídicos. La α -amilasa es una endoglucanasa que hidroliza aleatoriamente los enlaces α -1,4-glucosídicos para producir una mezcla de dextrina, maltosa y glucosa, pero no hidroliza los enlaces α -1,6-glucosídicos. Muchas bacterias incluyendo *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Clostridium* producen esta enzima.

La celulosa es uno de los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza y es un homopolímero de glucosa unido a almidón (Figura 150). Las glucosas se encuentran fuertemente unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos.

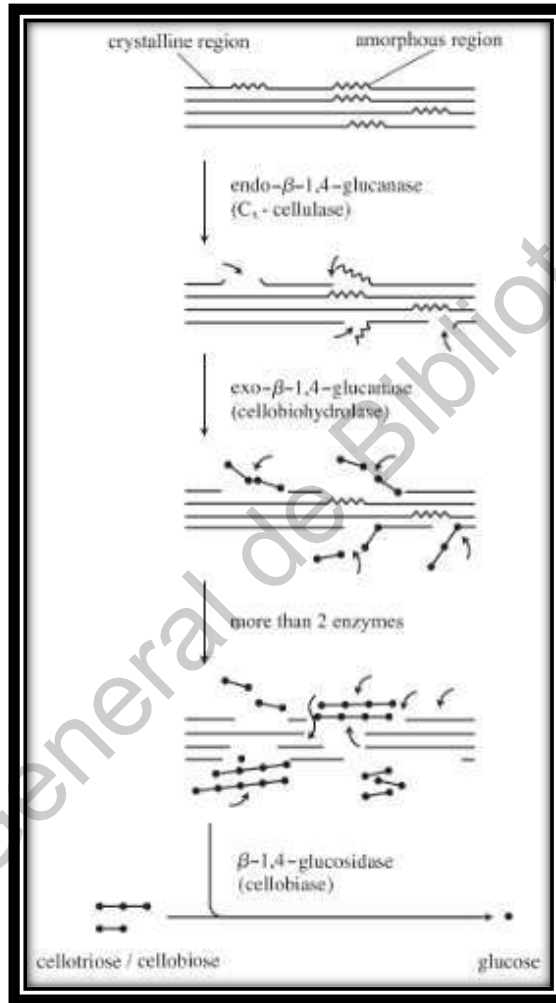


Figura 149. Hidrólisis de celulosa cristalina por exo- β -1,4-glucanasa, (Kim, 2008).

5.5.1.2 Ácidos nucleicos

Las nucleasas hidrolizan ARN y ADN a ribonucleosido monofosfato y deoxiribonucleosido monofosfato. Más adelante se hidrolizan a bases y ribosa (deoxirribosa) por la nucleotidasa y nucleosidasa (Figuras 150 y 151).

Figure 7.19 Degradation of purine bases.

1, adenine deaminase; 2, xanthine dehydrogenase or xanthine oxidase; 3, guanine deaminase; 4, uricase; 5, allantoin racemase; 6, 5(+)-allantoinase; 7, allantoinase; 8, allantoinase; 9, 5-ureidoglycolase; 10, urease.

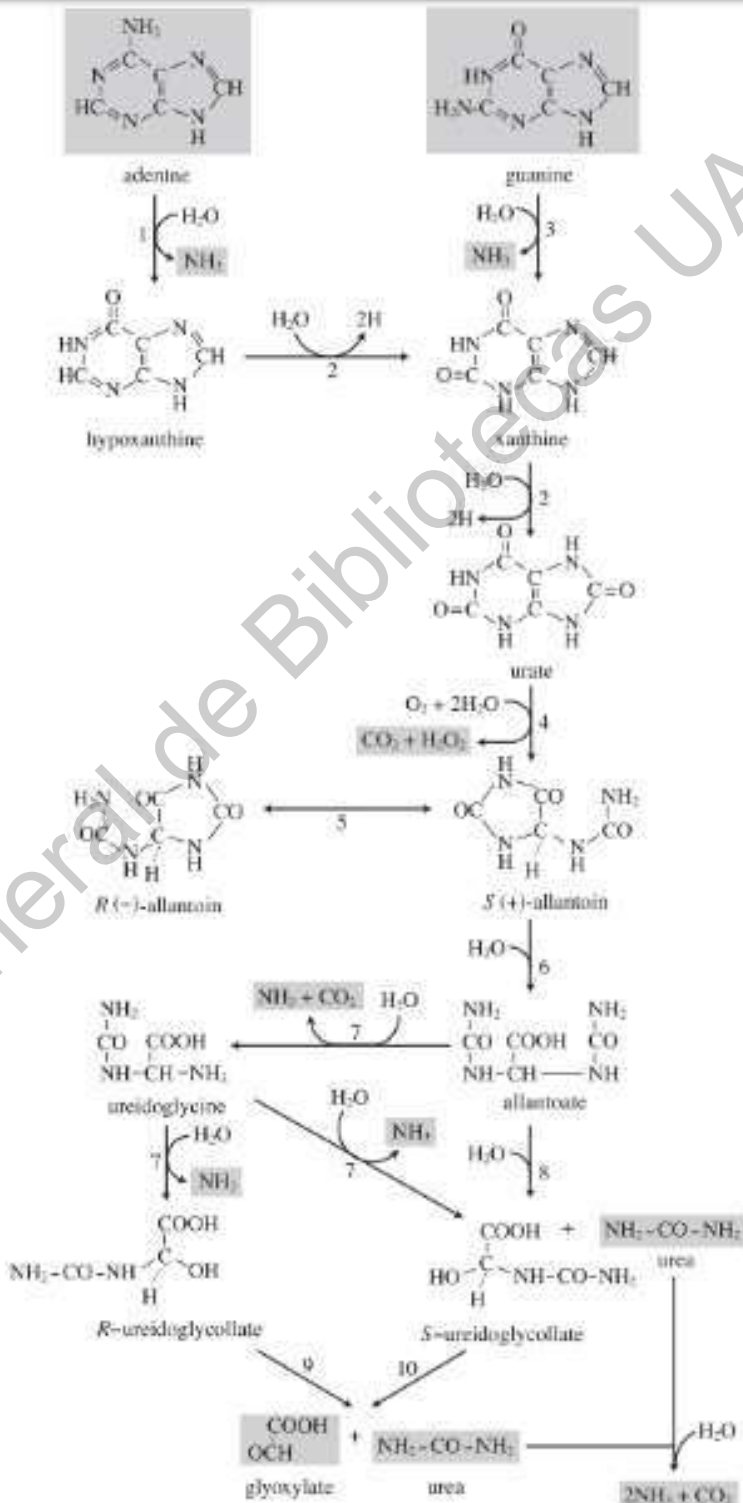


Figura 150. Degradación de bases purinas, (Kim, 2008).

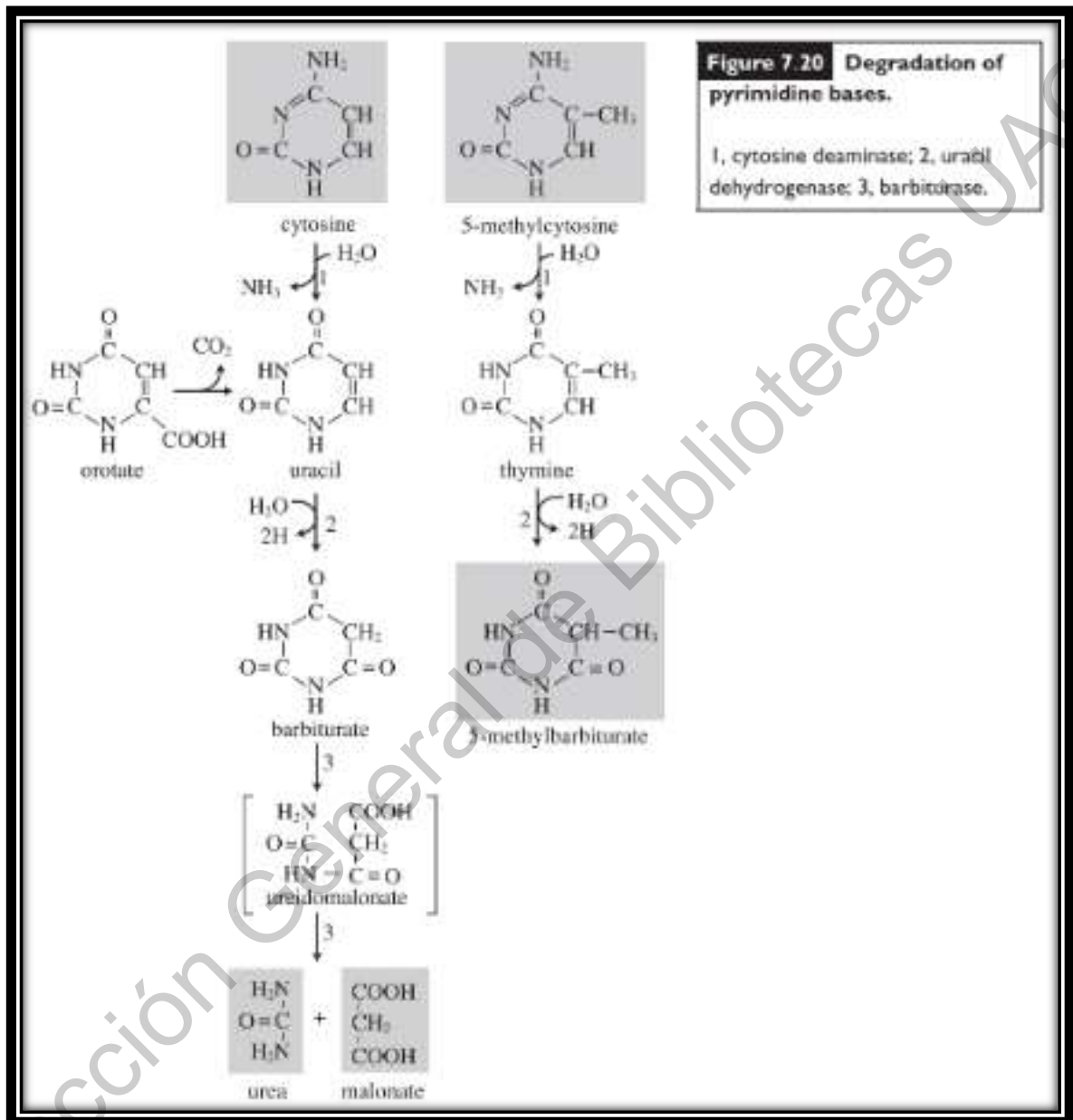


Figura 151. Degradación de bases pirimidinas, (Kim, 2008).

5.5.1.3 Lípidos

Algunos microorganismos utilizan la β -oxidación con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Figura 152) para convertir acetil-CoA proveniente de ácidos grasos en esqueletos de carbono necesarios para la biosíntesis.

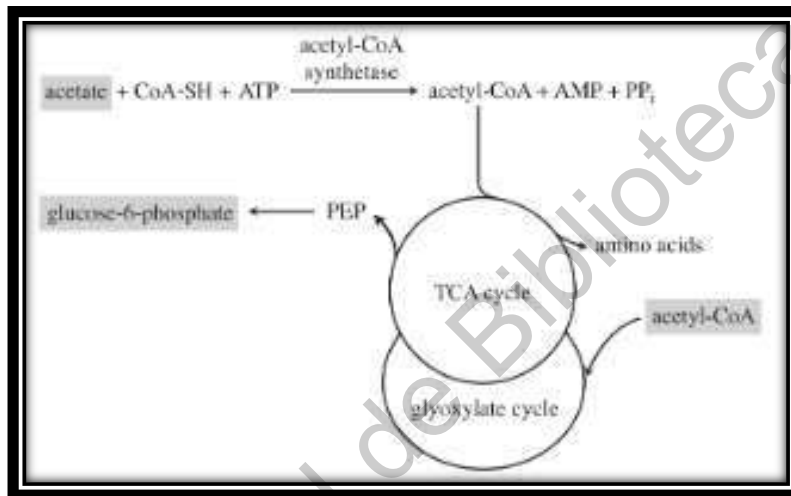


Figura 152. Conversión del acetato a intermediarios del metabolismo central a través de ciclo de los ácidos tricarbóxicos y el ciclo del glioxilato (Kim, 2008).

Los ácidos grasos con un número par de carbonos a través de la β -oxidación son divididos en unidades de 2-carbonos en forma de acetil-CoA a partir de Acil-CoA y es catalizado por 5 enzimas (Figura 153).

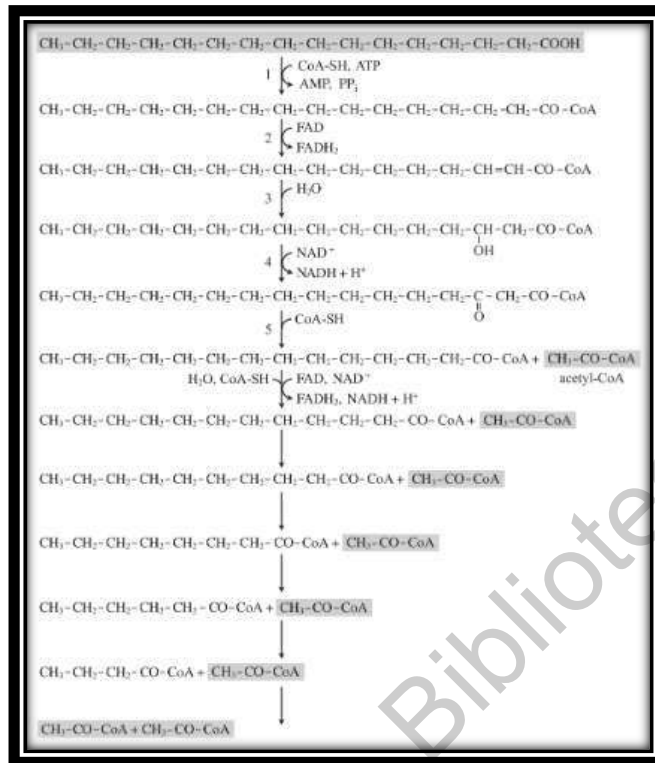


Figura 153. Degradación de palmitato a acetil-CoA a través de la β -oxidación.

El propionil-CoA es un intermediario metabólico de un gran número de compuestos, incluyendo los aminoácidos. La vía del acrilato (Figura 154) y la vía del metilmalonil-CoA (Figura 155) fueron identificadas como metabolismo oxidativo de propionil-CoA.

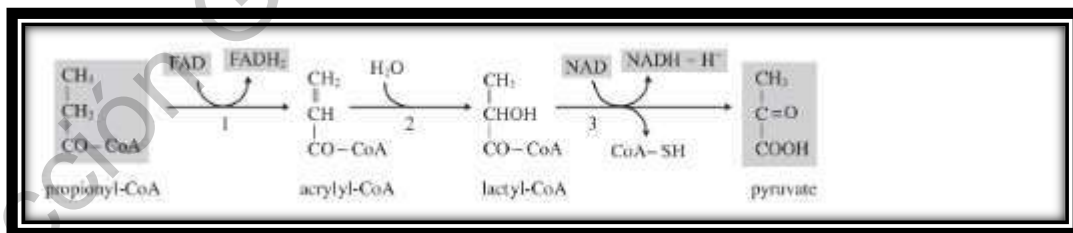


Figura 154. Vía del acrilato. *Pseudomonas aeruginosa* oxida propionil CoA a piruvato, (Kim, 2008).

El propionil-CoA es metabolizado a piruvato a través del ciclo del metilcitrato, en muchas bacterias incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Ralstonia eutropha*, en hongos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*.

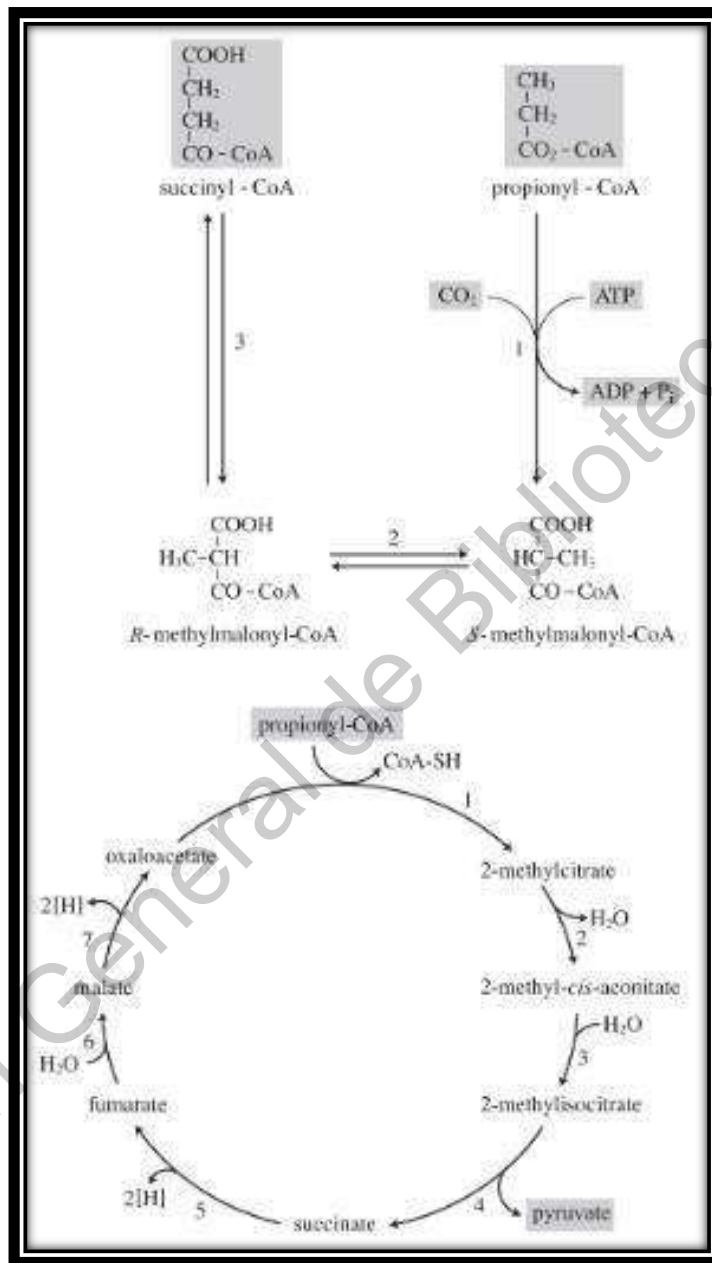


Figura 155. Conversión del acetato a intermediarios del metabolismo central a través del ciclo del Ácido tricarboxílico y ciclo del glicoxilato (arriba). Oxidación de propionil-CoA a piruvato a través del ciclo del metilcitrato (abajo), (Kim, 2008).

Algunos compuestos de C₂ como el glicolato, glicoxilato (Figuras 156 y 157) y oxalacetato (Figura 158) no pueden ser metabolizados de la misma forma que el

acetato. El glicolato es generado de la descarboxilación del fosfoglicolato que se produce durante la fotorespiración. El glioxilato resulta de la degradación de la purina. *Escherichia coli* y *Pseudomona spp.* Usan estas sustancias a través del ciclo de los ácidos dicarboxílicos para generar energía.

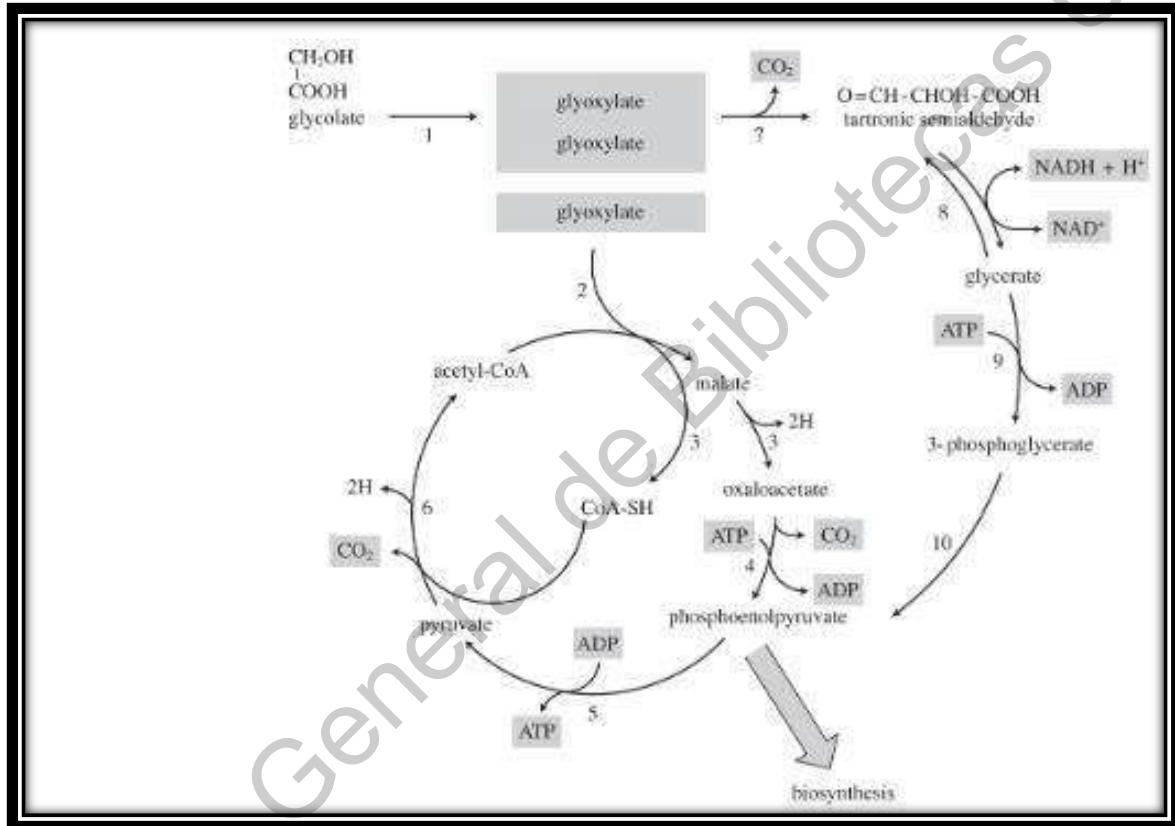


Figura 156. Ciclo de los ácidos dicarboxílicos y vía del glicerato para la utilización del glioxilato (Kim, 2008).

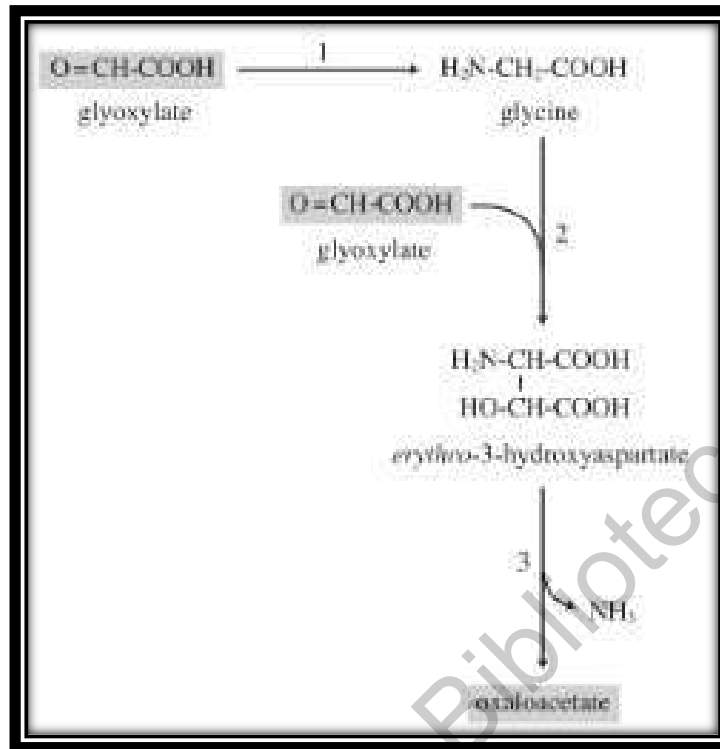


Figura 157. Metabolismo del glioxilato a través de la vía 3-hidroxiaspartato por *Paracoccus denitrificans*, (Kim, 2008).

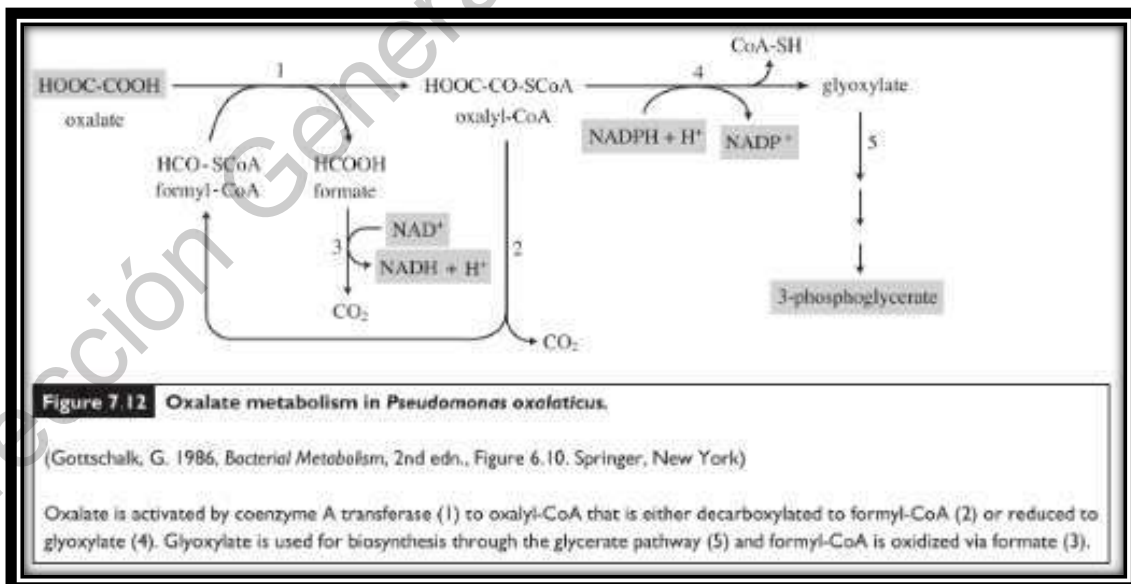
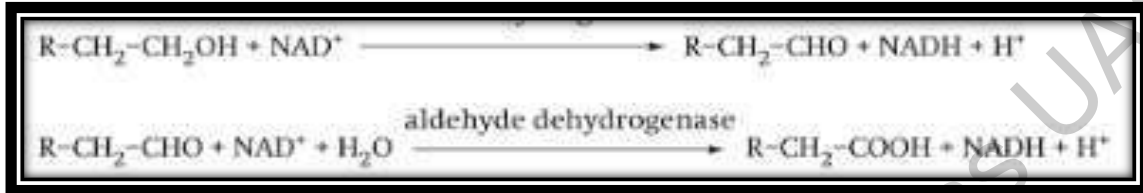
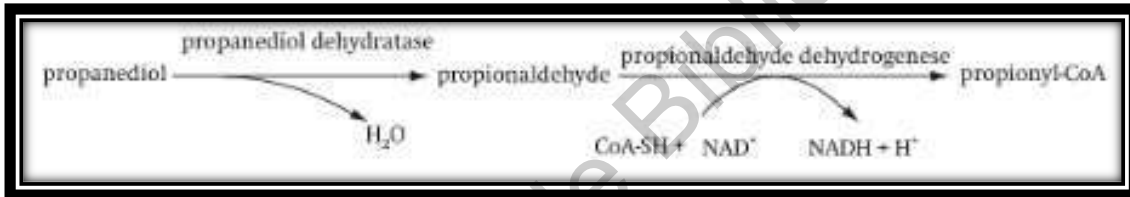


Figura 158. Metabolismo del oxalacetato en *Pseudomonas oxolaticus*, (Kim, 2008).

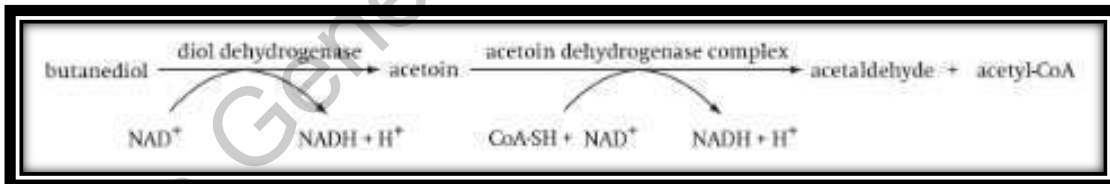
Los microorganismos anaerobios fermentativos producen alcoholes como etanol, butanol y otros. La alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa oxida estos alcoholes primarios a ácidos grasos (Moat, 2002).



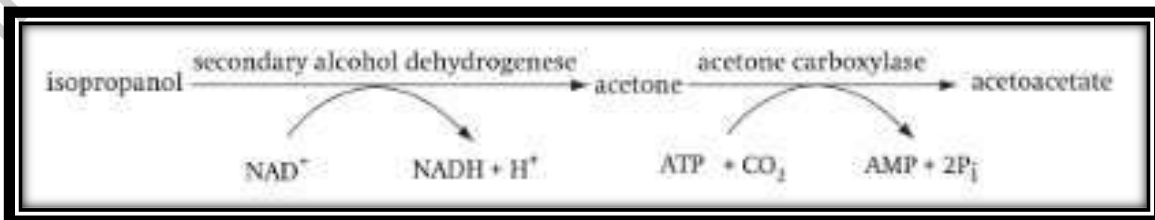
Salmonella thyphimurium oxida propanodiol a propionil-CoA donde es metabolizado a través del ciclo del metilcitrato.



Especies como *Bacillus*, *Ralstonia eutropha* y *Pelobacter carbinolicus*, oxidan el butanodiol a acetaldehído y acetyl-CoA.



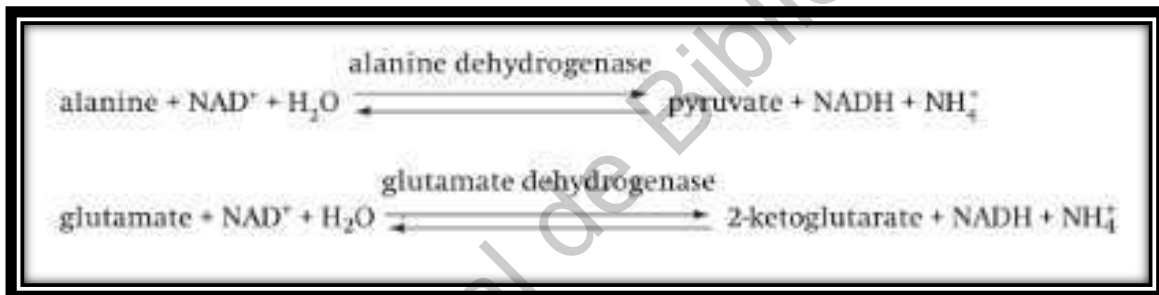
Xanthobacter spp. Puede oxidar el isopropanol a acetona antes de la carboxilación a acetoacetato. La acetona es carboxilada por *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodomicrobium vannielii* y *Thiosphaera pantotropha*.



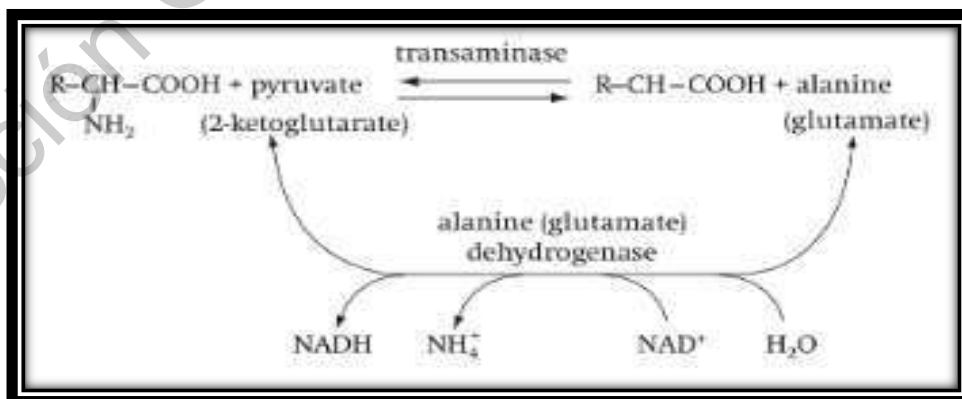
5.5.1.4 Proteínas

Los aminoácidos se usan para la síntesis de proteínas y son deaminados a 2 cetoácidos correspondientes. Los 2 cetoácidos son oxidados a Acil-CoA por 2 cetoácido deshidrogenasa para usarse como fuente de carbono y energía. Son deaminados a través de diferentes vías dependiendo de su naturaleza.

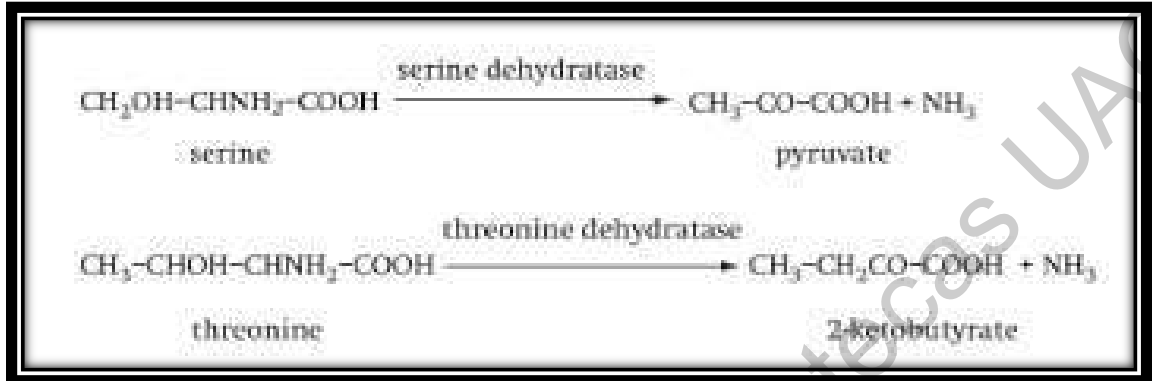
Deaminación Oxidativa. Los aminoácidos son deaminados por cualquier aminoácido oxidasa o por un aminoácido deshidrogenasa (Figura 160-164). Las aminooxidasas tienen una baja especificidad para los sustratos, una sola enzima puede oxidar hasta diez diferentes aminoácidos (Moat, 2002).



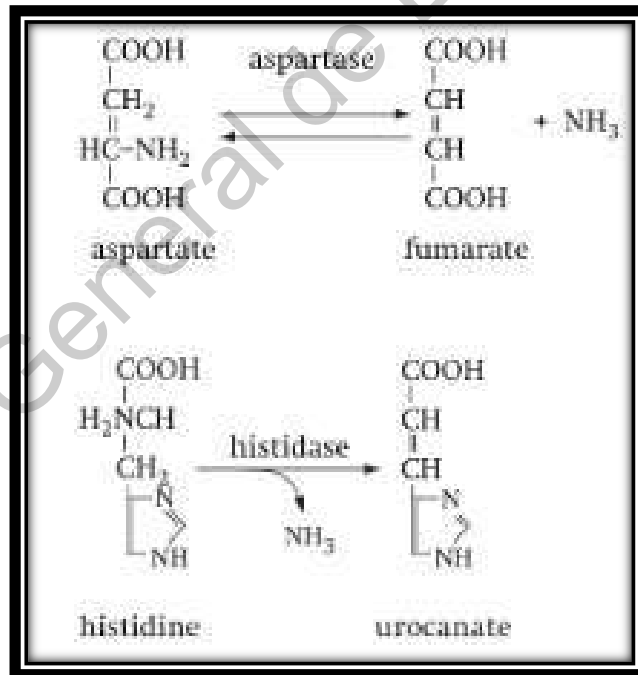
La transaminación es una reacción enzimática que transfiere un grupo NH₂ de aminoácidos a 2-ceto ácidos.



Aminoácido dehidratasa. La aminoacidodeshidratasa deamina serina y treonina, removiendo el grupo hidroxil (-OH).



Aspartato e Histidina son deaminados en reacciones similares a los catalizados por la dehidratasa.



Deaminación de cisteína y metionina (Figura 159). La transmetilasa remueve el grupo metil de metionina para producir homocisteína. Desulfidasa remueve grupos amino y sulfido simultáneamente de cisteína y homocisteína para producir piruvato y 2-cetobutirato respectivamente (Moat, 2002).

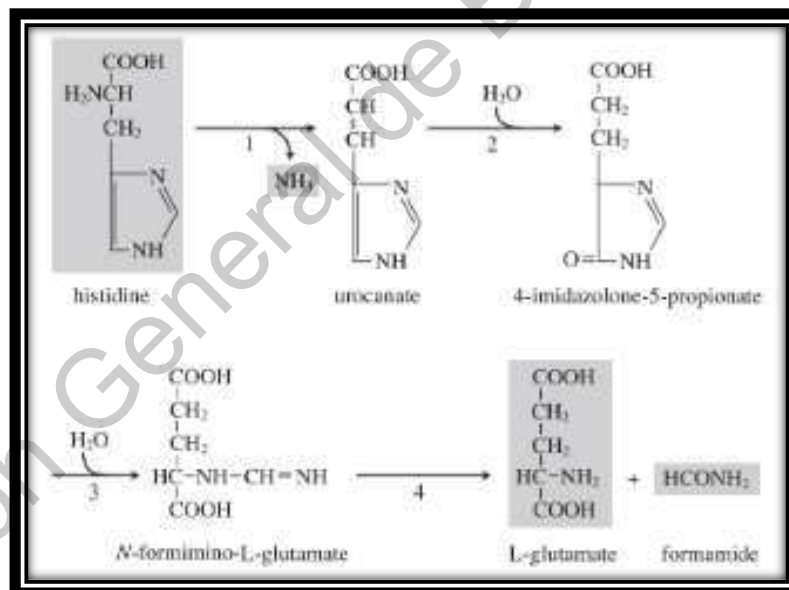
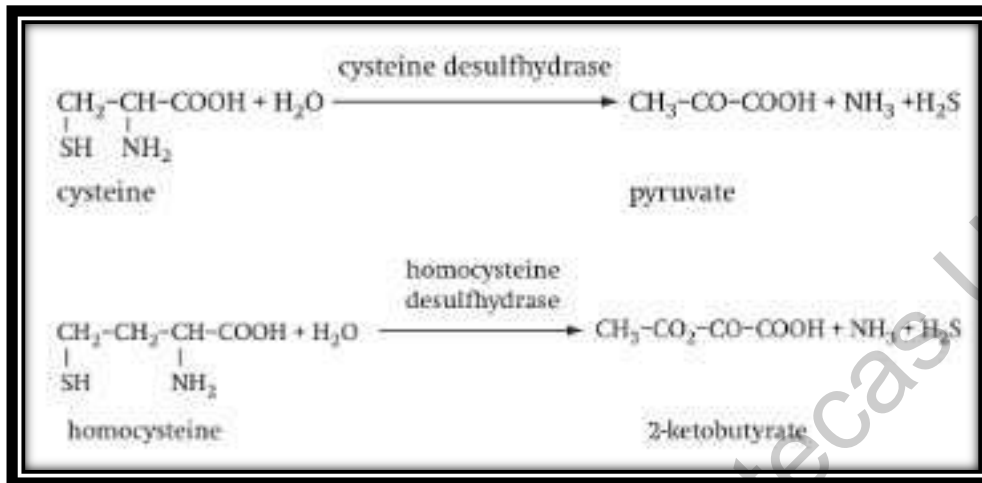


Figura 159. Degradación de Histidina, (Kim, 2008).

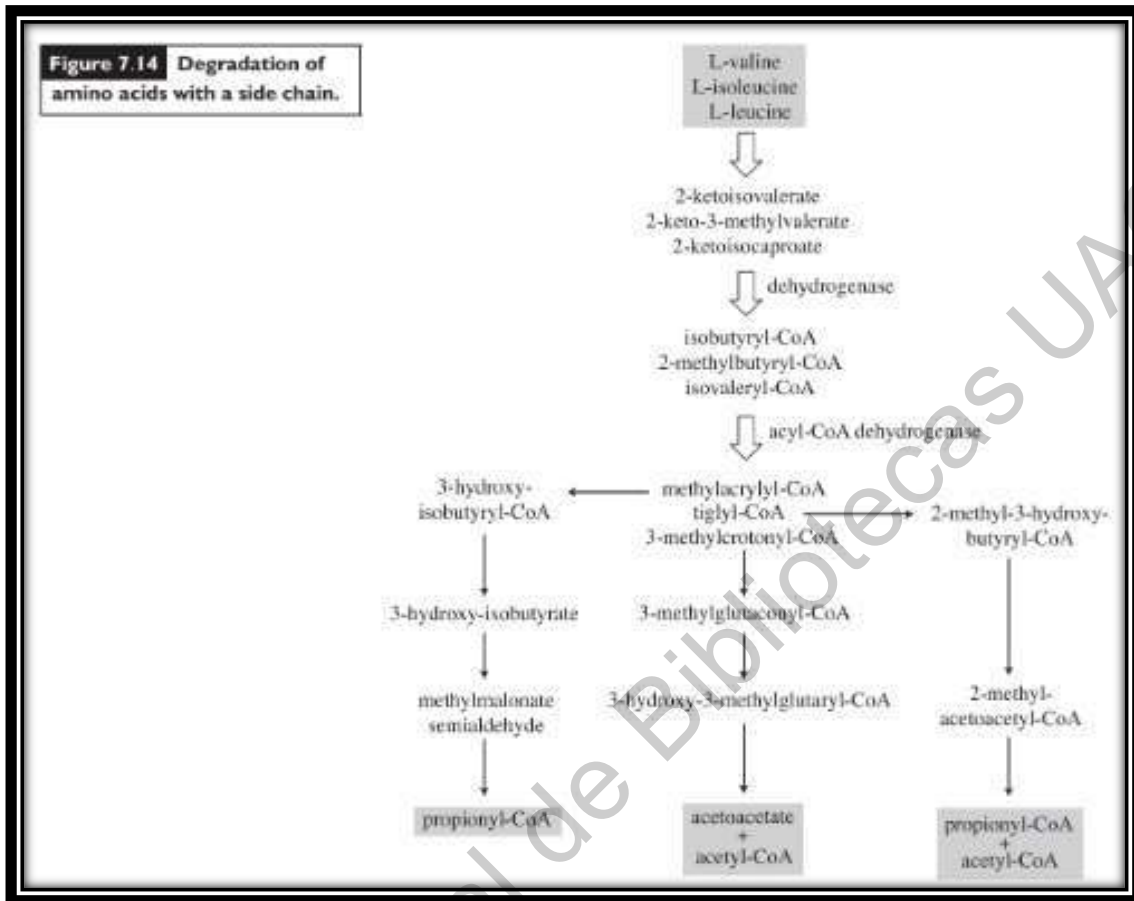


Figura 160. Degradación de aminoácidos con cadena lateral, (Kim, 2008).

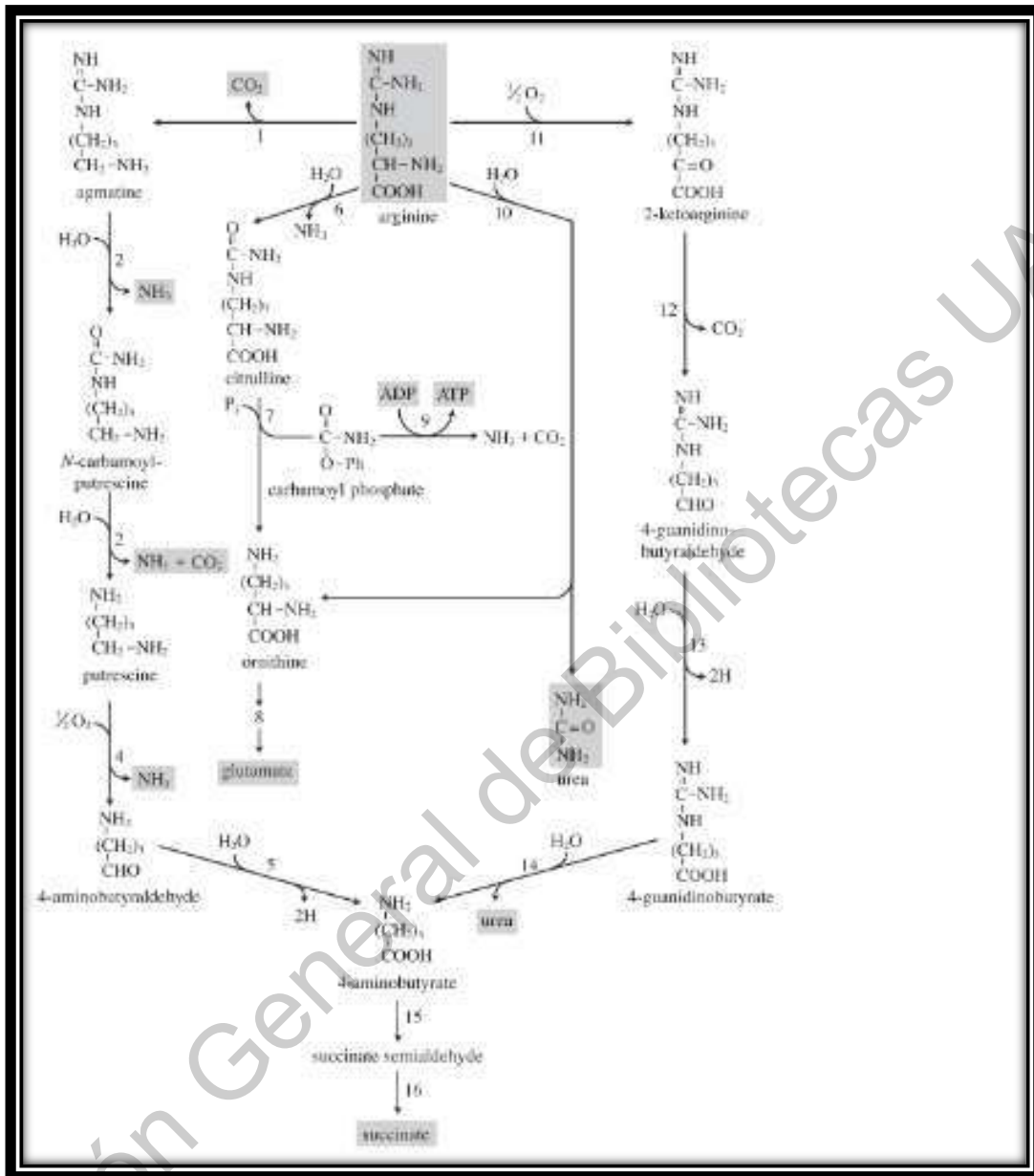


Figura 161. Degradación de arginina, (Kim, 2008).

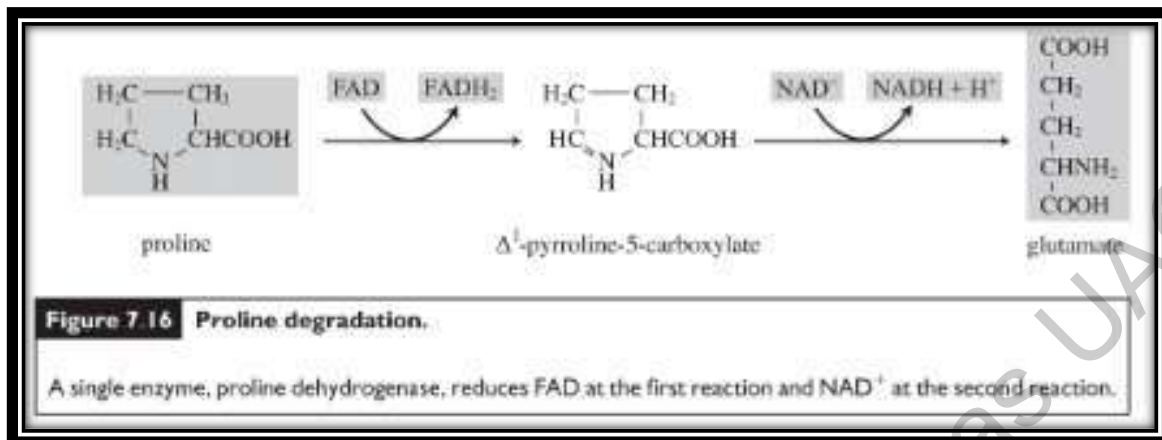


Figura 162. Degradación de prolina, (Kim, 2008).

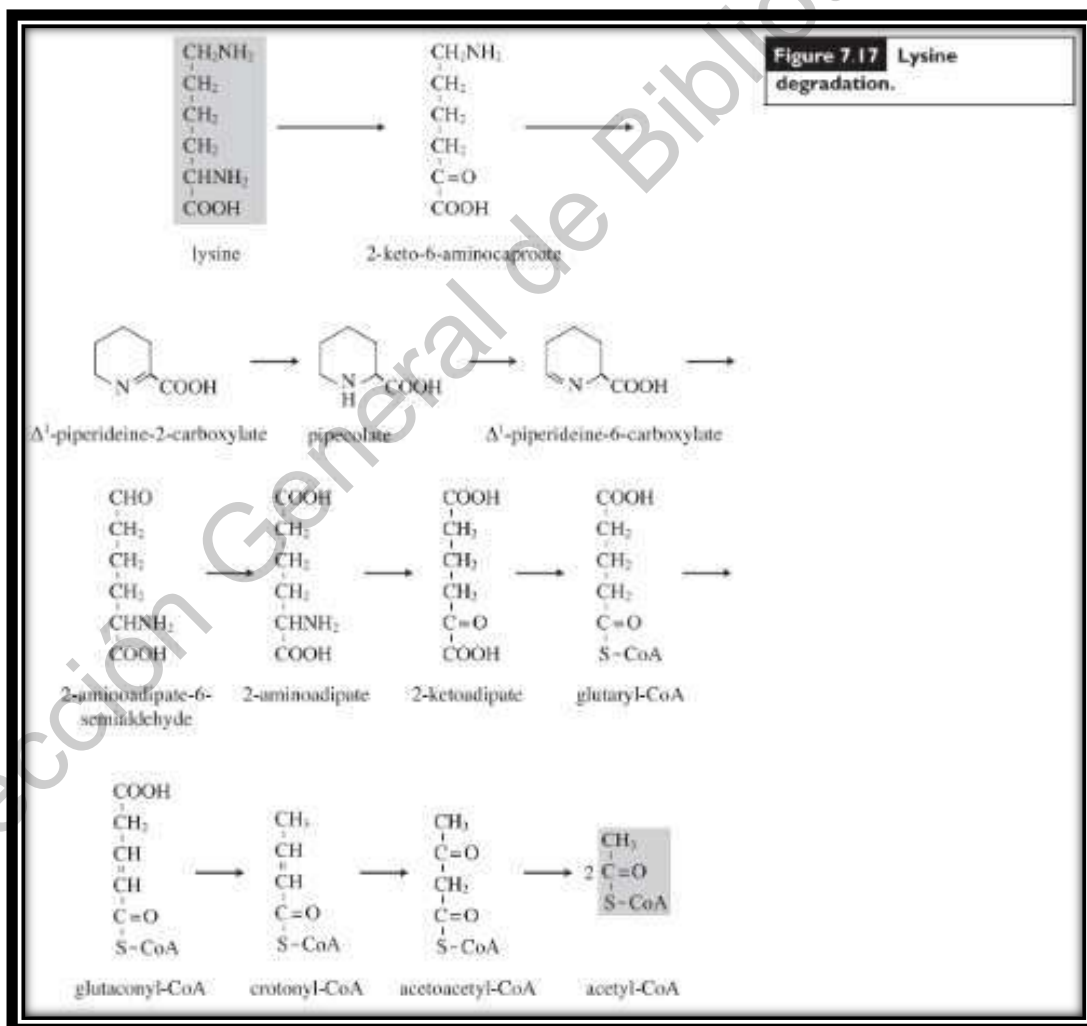


Figura 163. Degradación de lisina, (Kim, 2008).

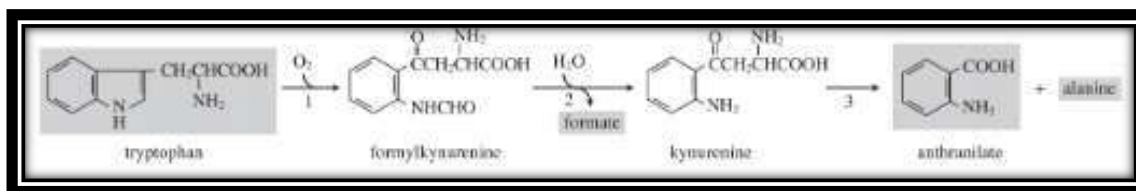


Figure 7.18 Tryptophan degradation.

- 1, tryptophan-2,3-dioxygenase;
- 2, formylkynureninase;
- 3, kynureninase.

Figura 164. Degradación de triptófano, (Kim, 2008).

5.5.2 Degradación de compuestos recalcitrantes

Muchos microorganismos procariontes y eucariontes pueden usar hidrocarburos alifáticos (Cuadro 27), especialmente aquellos que se encuentran líquidos a temperatura ambiente. Los hidrocarburos son insolubles en agua y diferentes en cuanto al transporte de los solubles en agua (Figura 165-168).

Cuadro 27. Algunos ejemplos de microbios que utilizan hidrocarburos, (Kim, 2008).

Bacteria
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>Arthrobacter paraffineus</i>
<i>Arthrobacter simplex</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i>
<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Nocardia petroleophila</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Fungi
<i>Candida lipolytica</i>
<i>Torulopsis calliculosa</i>
<i>Cephalosporium roseum</i>
<i>Hormoconis (Cladosporium) resiniae</i>

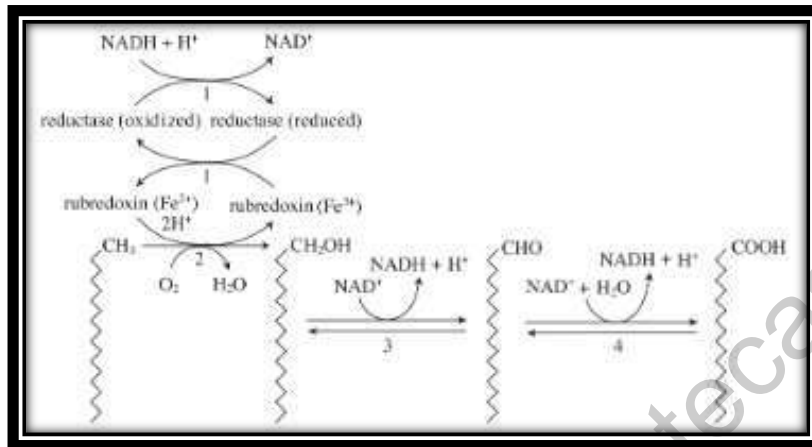


Figura 165. Oxidación de hidrocarburos alifáticos por *Pseudomonas oleovorans*. (Kim, 2008).

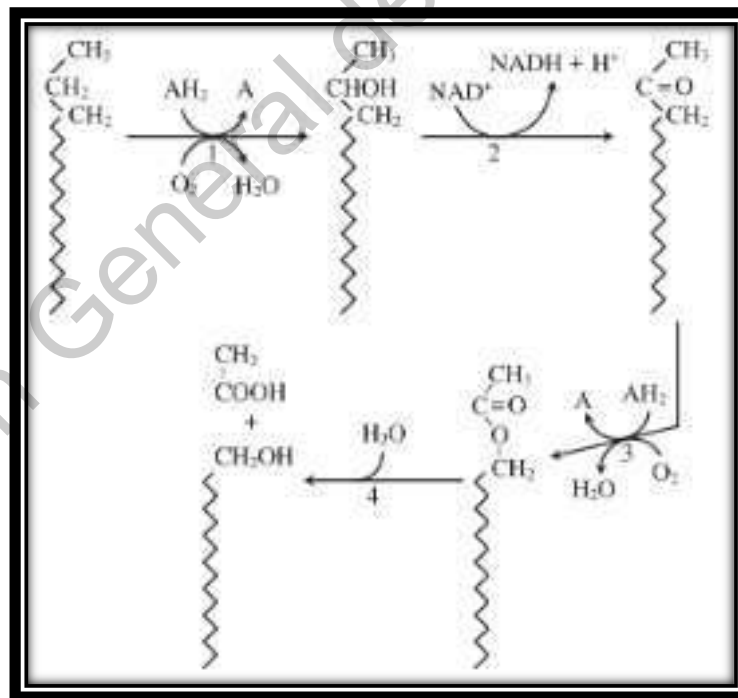


Figura 166. Oxidación de hidrocarburos alifáticos por *Nocardia petroleophila*, (Kim, 2008).

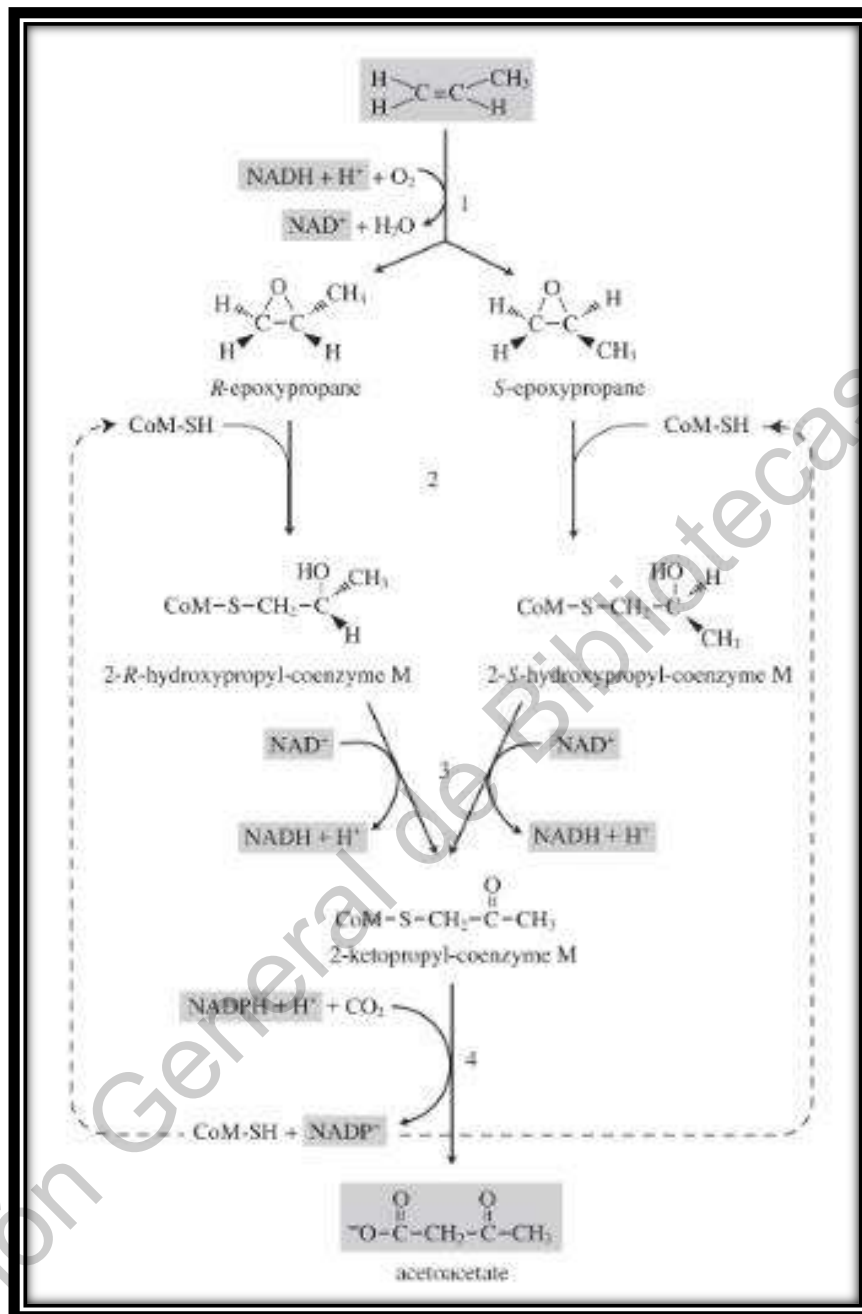


Figura 167. Oxidación de propileno por *Rhodococcus rhodochrous*, (Kim, 2008).

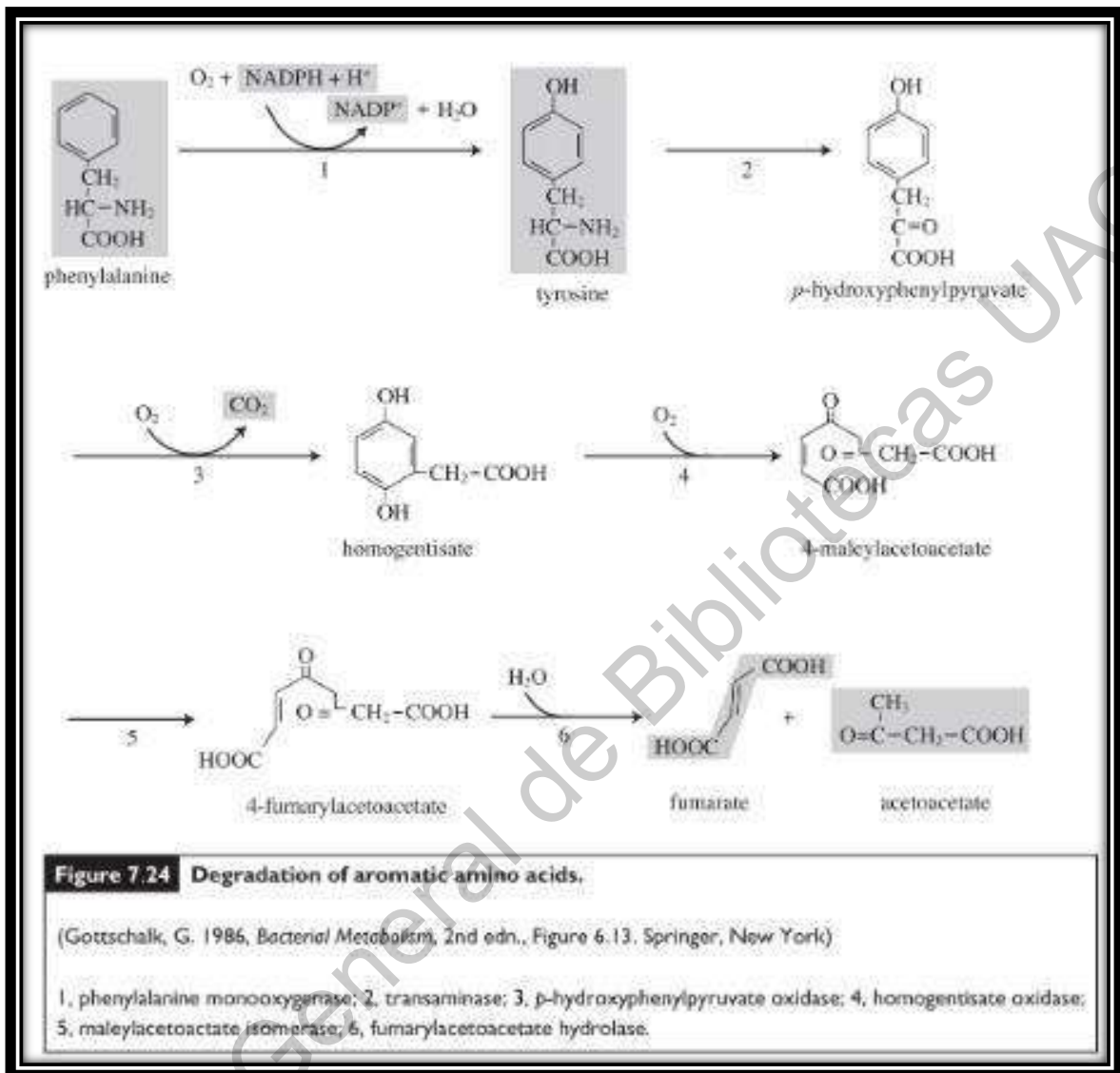


Figura 168. Degradación de aminoácidos aromáticos, (Kim, 2008).

5.5.2.1 Vía del catecol y protocatecuato

El metabolismo de compuestos aromáticos puede ser dividido en 2 pasos. En el primer paso las monooxigenasas incorporan grupos hidroxil dentro de los anillos bencénicos, con este paso los compuestos aromáticos son convertidos a uno de los tres intermediarios: protocatecuato, catecol y gentisata (Figuras 169-173). Los compuestos aromáticos son principalmente convertidos a protocatecuato, y el catecol se deriva de hidrocarburos aromáticos, compuestos aromáticos con grupo amino y

monómeros de lignina. Algunas bacterias generan gentisato de naftaleno, 3-hidroxibenzoato, derivados de fenol, entre otros.

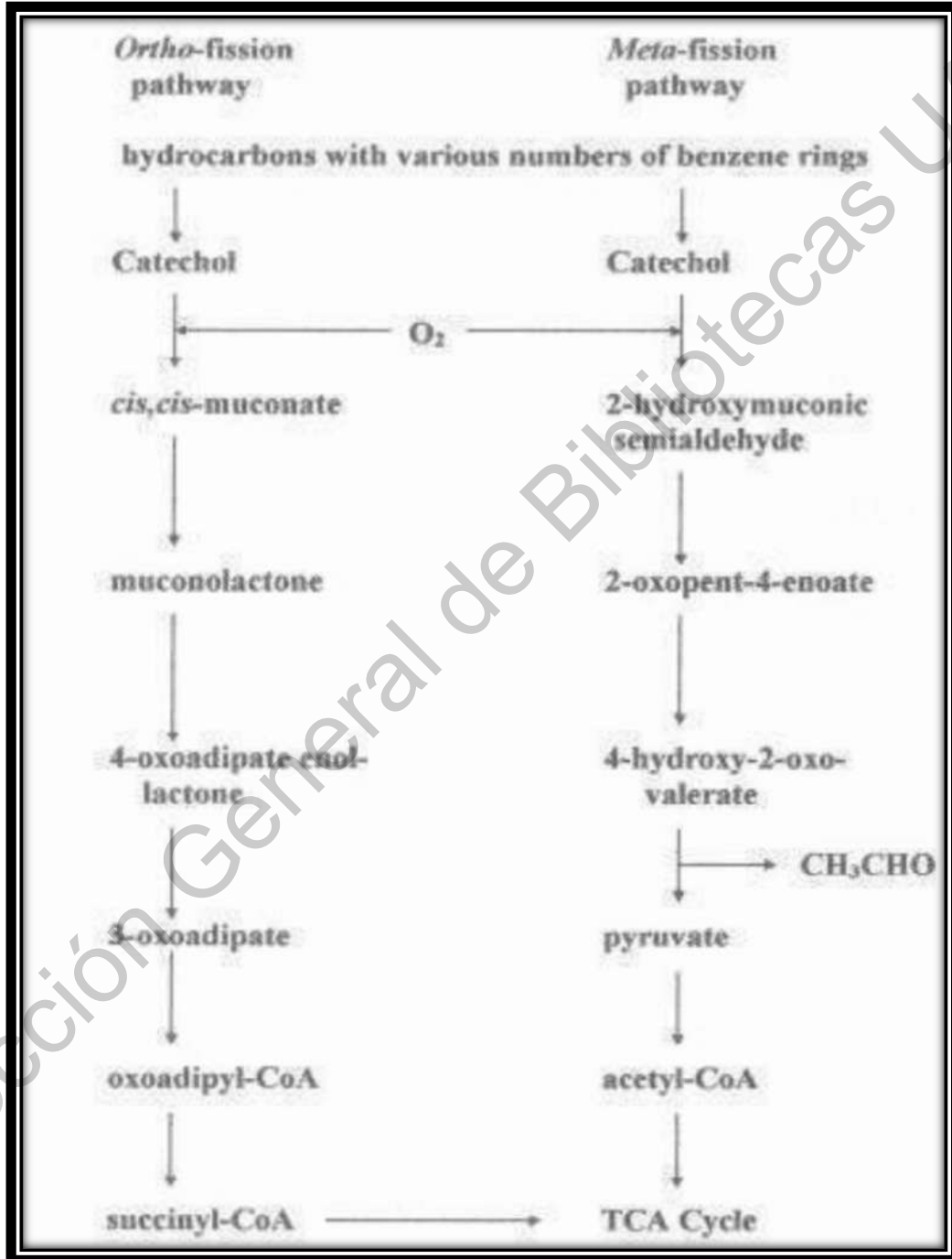


Figura 169. Metabolismo de los carbohidratos usando Ortho y Meta fisión (Doelle, 2010).

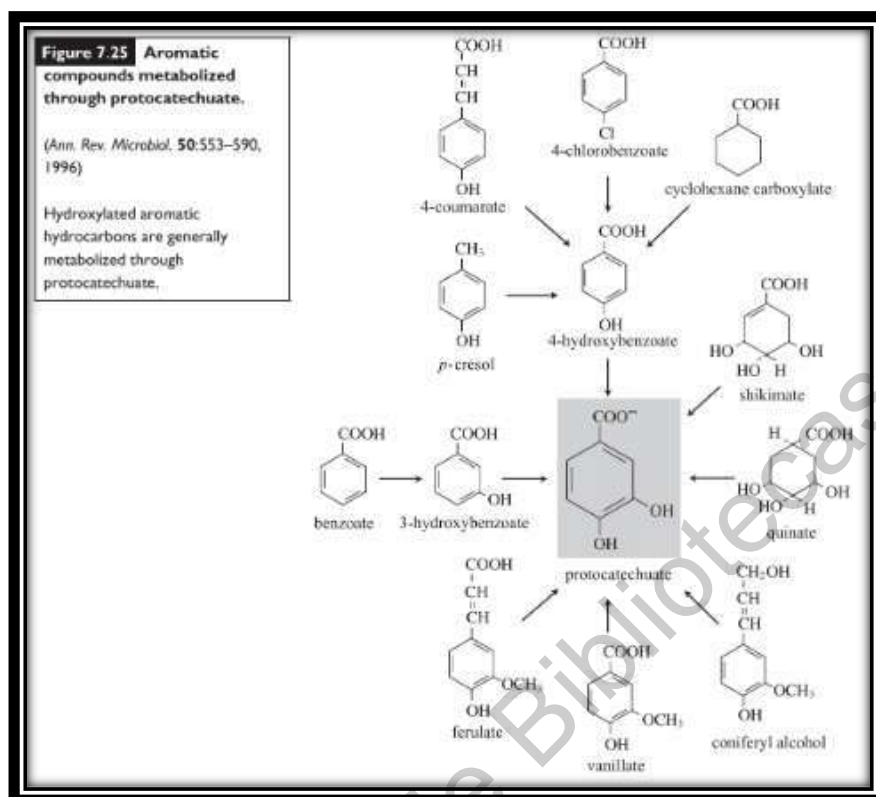


Figura 170. Compuestos aromáticos metabolizados a través de protocatecuato, (Kim, 2008).

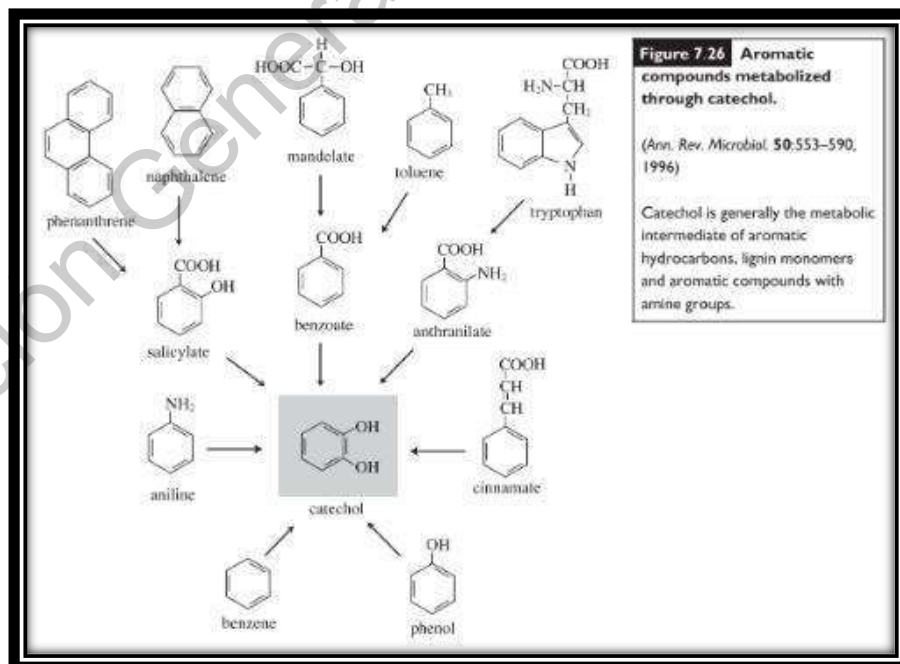


Figura 171. Compuestos aromáticos metabolizados por catecol, (Kim, 2008).

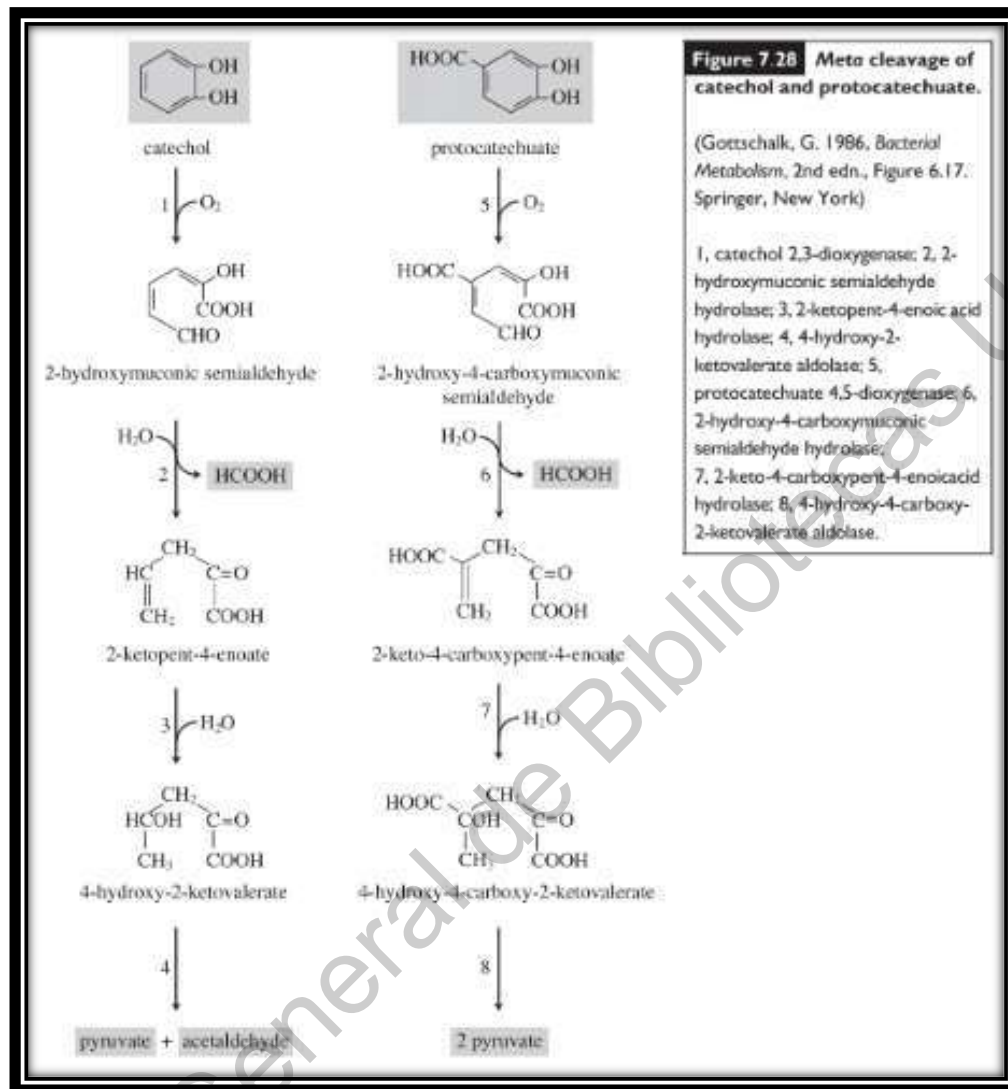


Figura 172. Meta fisión de catecol y protocatecuato, (Kim, 2008).

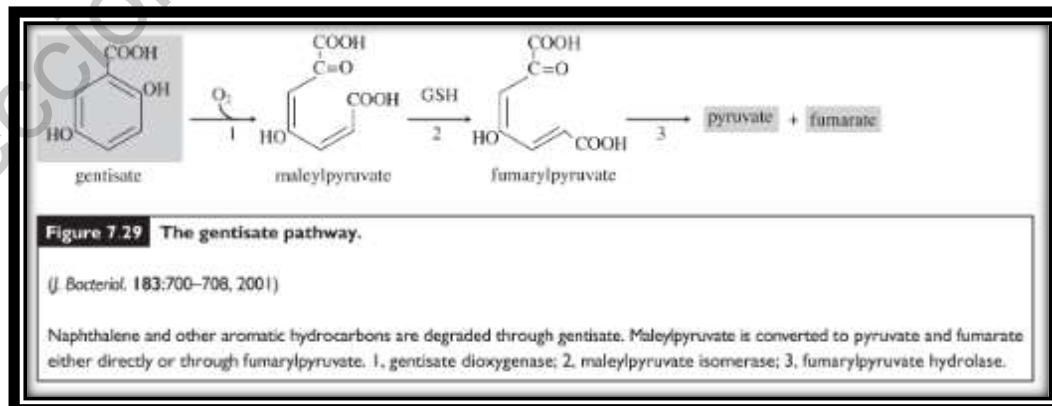


Figura 173. Vía gentisato, (Kim, 2008).

6. METABOLISMO BIOSINTÉTICO (ANABOLISMO)

6.1 Biosíntesis de sacáridos y sus derivados

6.1.1 Gluconeogénesis

Reportes recientes han puesto en evidencia que la GNG o elementos centrales de esta vía metabólica están presentes en micro organismos quimiolitio-autótrofos (Figura 174). Estos procariontes anaerobios, con capacidad de fijar CO_2 , obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos como el hierro y el azufre, siendo las bacterias nitrificantes ejemplos bien conocidos. El metabolismo intermediario de estos organismos está centrado en la síntesis y manejo de la acetyl-CoA; estos organismos son capaces de formar fosfoenolpiruvato por una serie de reacciones de fijación de CO_2 , y además manejan el ciclo de Krebs de manera reductiva (se produce NADH, no NAD^+).

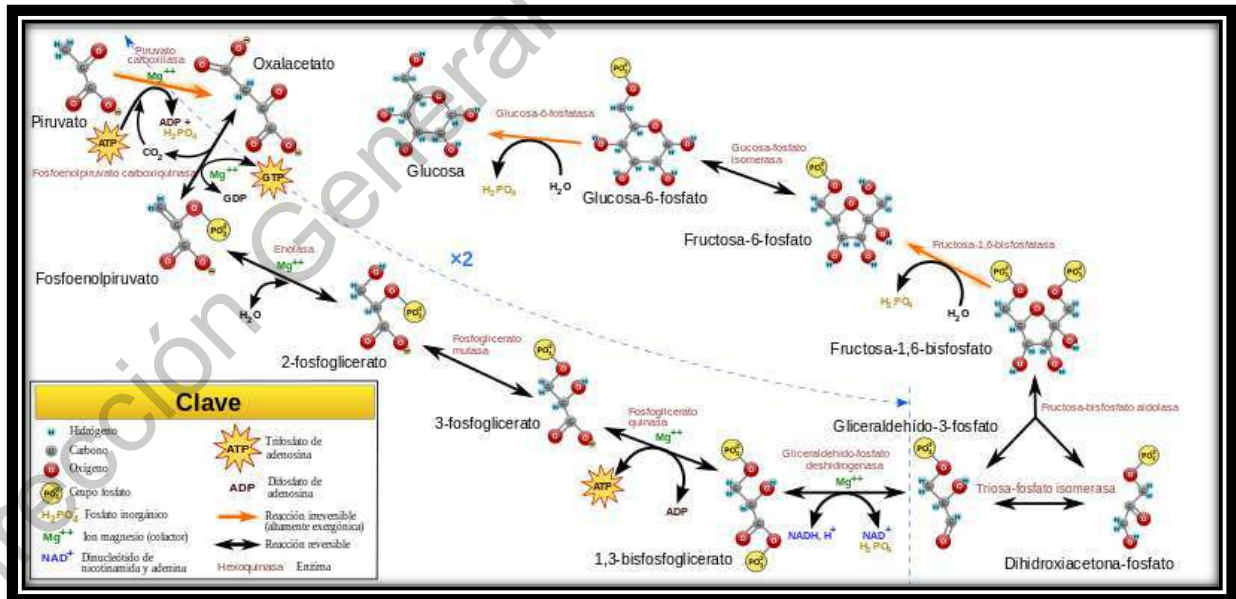


Figura 174. Gluconeogénesis, la biosíntesis de la glucosa a partir de compuestos no glucosídicos, (Herraez, 2014).

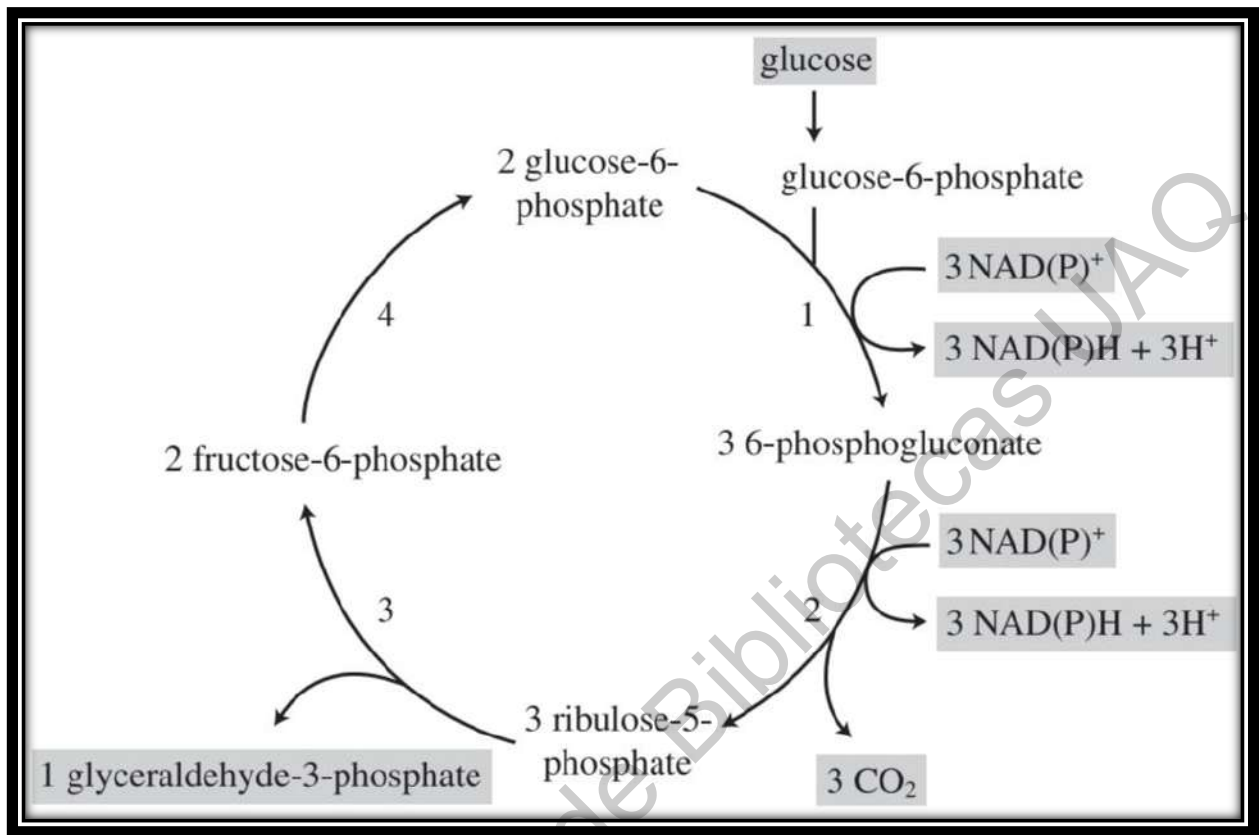


Figura 176. Ciclo hexosa monofosfato oxidativo. Gliceraldehido-3-fosfato es oxidado a piruvato como en la vía EMP. 1, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 2, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 3, carbono reorganizado como en la vía HMP; 4, glucosa-6-fosfato e isomerasa, (White, 2007).

6.1.3 Monómeros de mureína

La fructosa-6-fosfato es usada para sintetizar los monómeros de mureína, uridina difosfato (UDP)-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilmuramato. El precursor es aminado a glucosamina-6-fosfato usando glutamato como donador del grupo amino después es acetilado a N-acetilglucosamina-6-fosfato condensado con UTP Figuras 177 y 178).

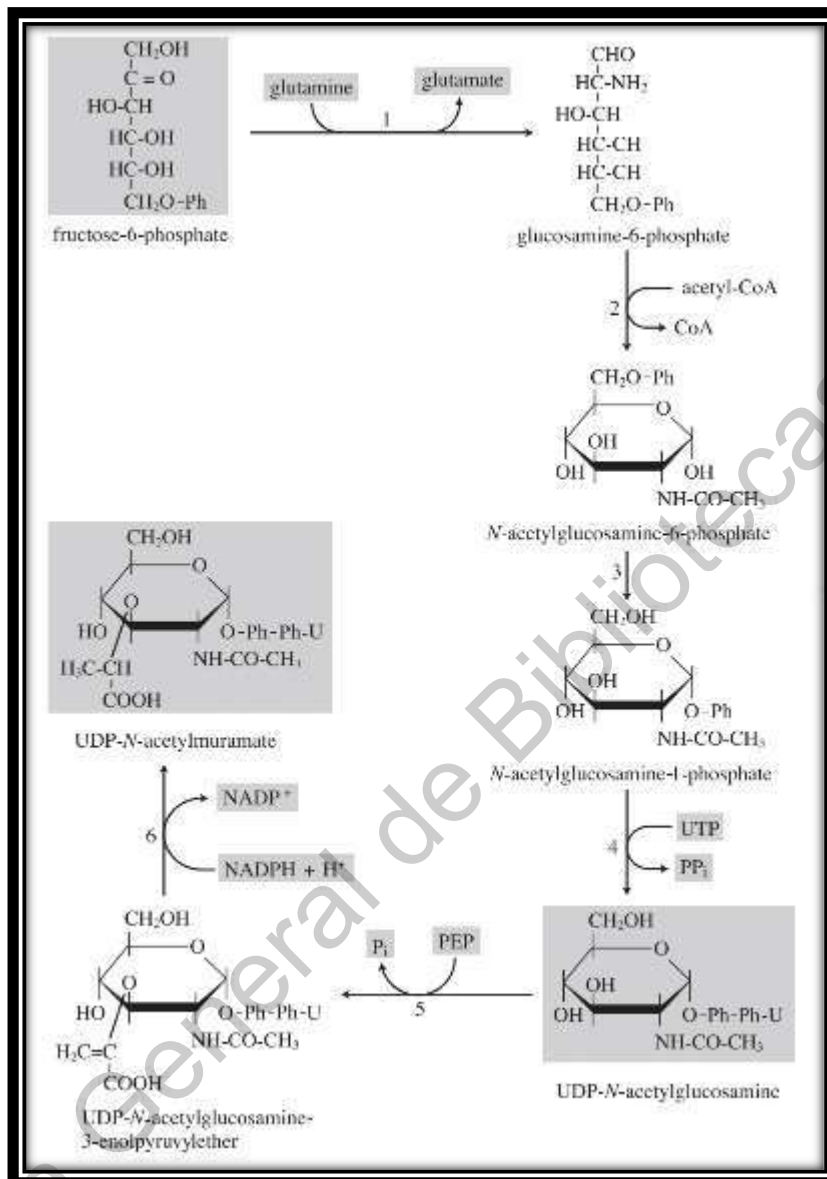


Figura 177. Síntesis de los monómeros de mureína, UDP-N-acetilglucosamina y UDP-N-acetilmuramato, (Kim, 2008).

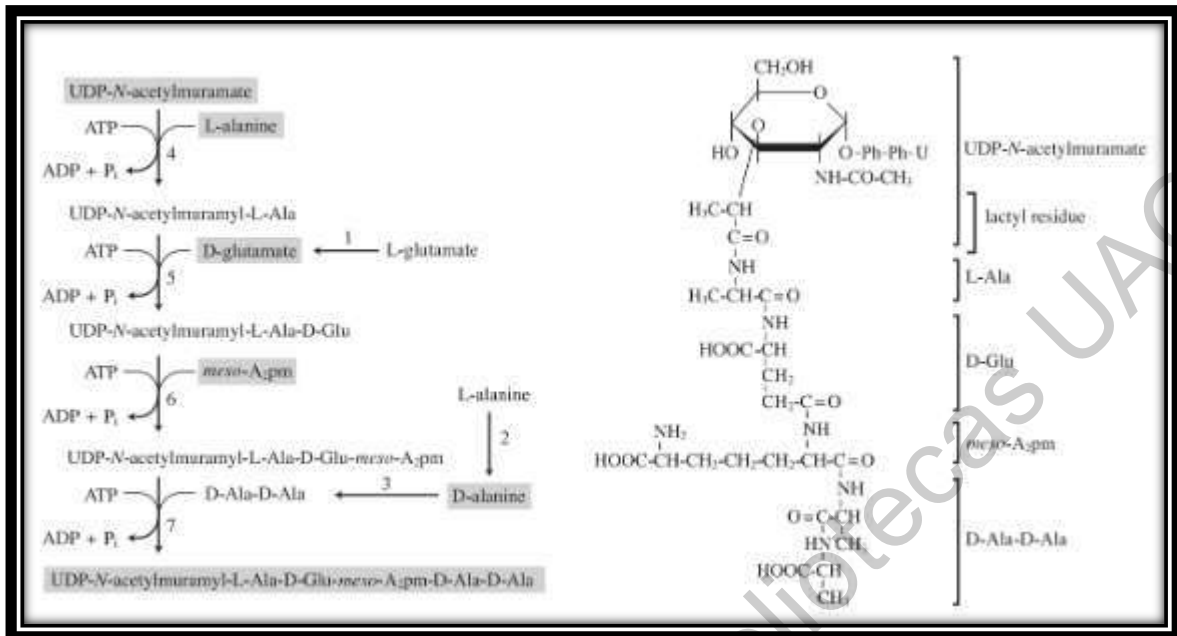


Figura 178. Síntesis de UDP-N-acetilmuramilpentapéptido a través de la síntesis de un péptido no ribosomal agregando aminoácidos al grupo lactil de UDP-N-acetilmuramato, (Kim, 2008).

6.1.4 Síntesis de ácido teicoico

Los ácidos teicoicos se encuentran en todas bacterias Gram Positivas pero ausentes en las bacterias Gram Negativas. Los ácidos teicoicos son polímeros de ribitol fosfato de glicerol fosfato unidos por enlaces fosfodiéster (Figura 179). Azúcares, aminoazúcares o aminoácidos pueden ser condensados a grupos hidroxil o ribosil del ribitol o glicerol para generar diversas variantes en las estructuras (Figura 180).

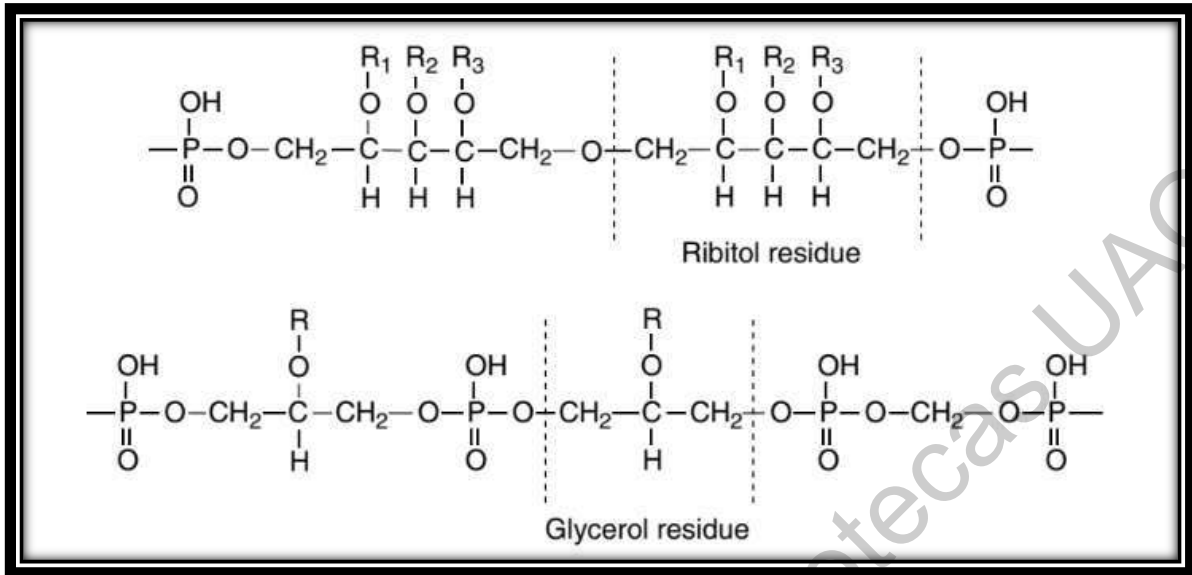


Figura 179. Estructuras de los ácidos Teicoicos, (White, 2007).

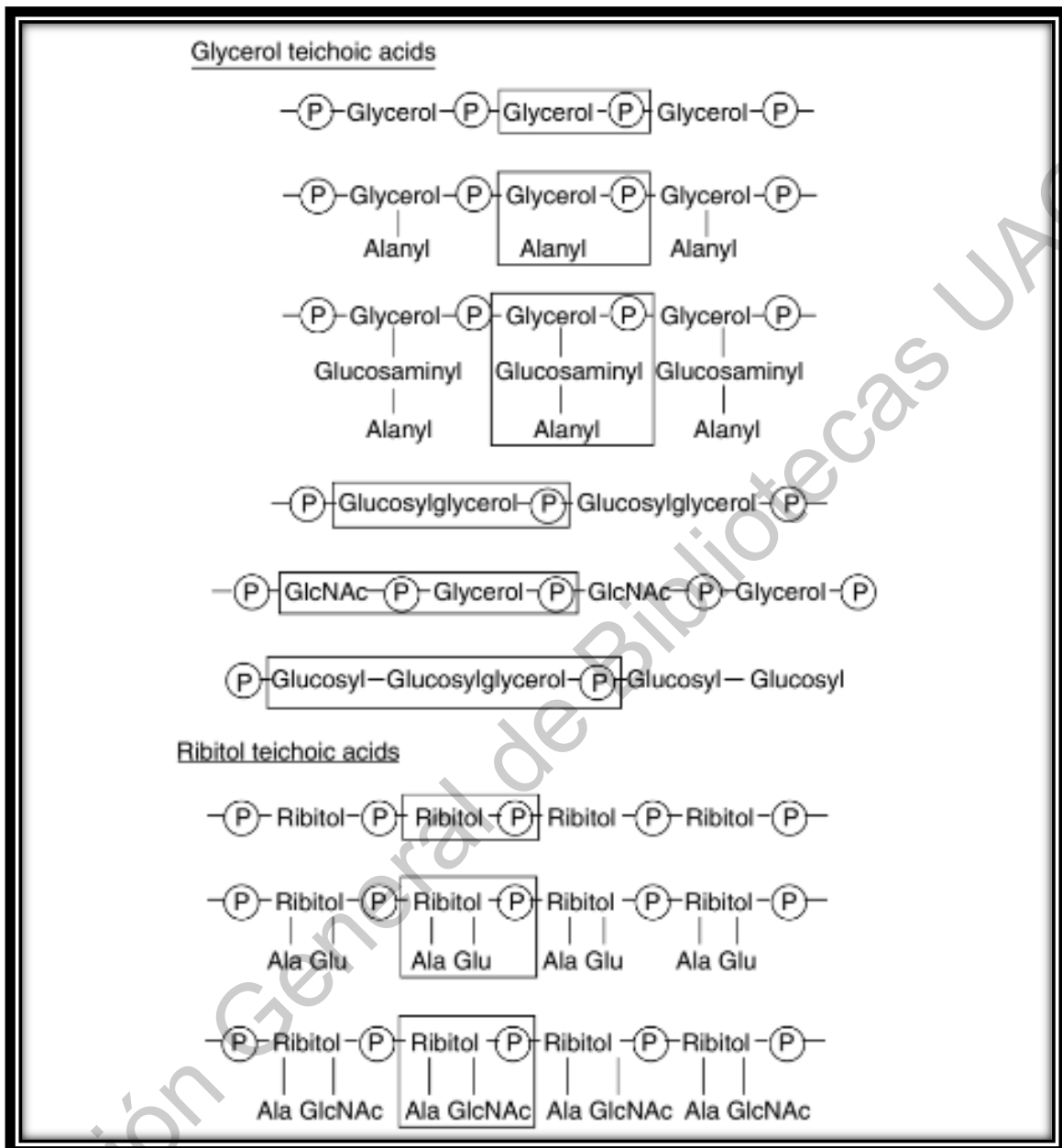


Figura 180. Variaciones en las estructuras de los ácidos teicoicos, (White, 2007).

6.2 Biosíntesis de aminoácidos.

Los aminoácidos son sintetizados usando los esqueletos de carbono (Cuadro 28) disponibles del metabolismo central (Figura 1781). Estos son piruvato,

oxalacetato, 2-cetoglutarato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, eritosa-4-fosfato y ribosa-5-fosfato.

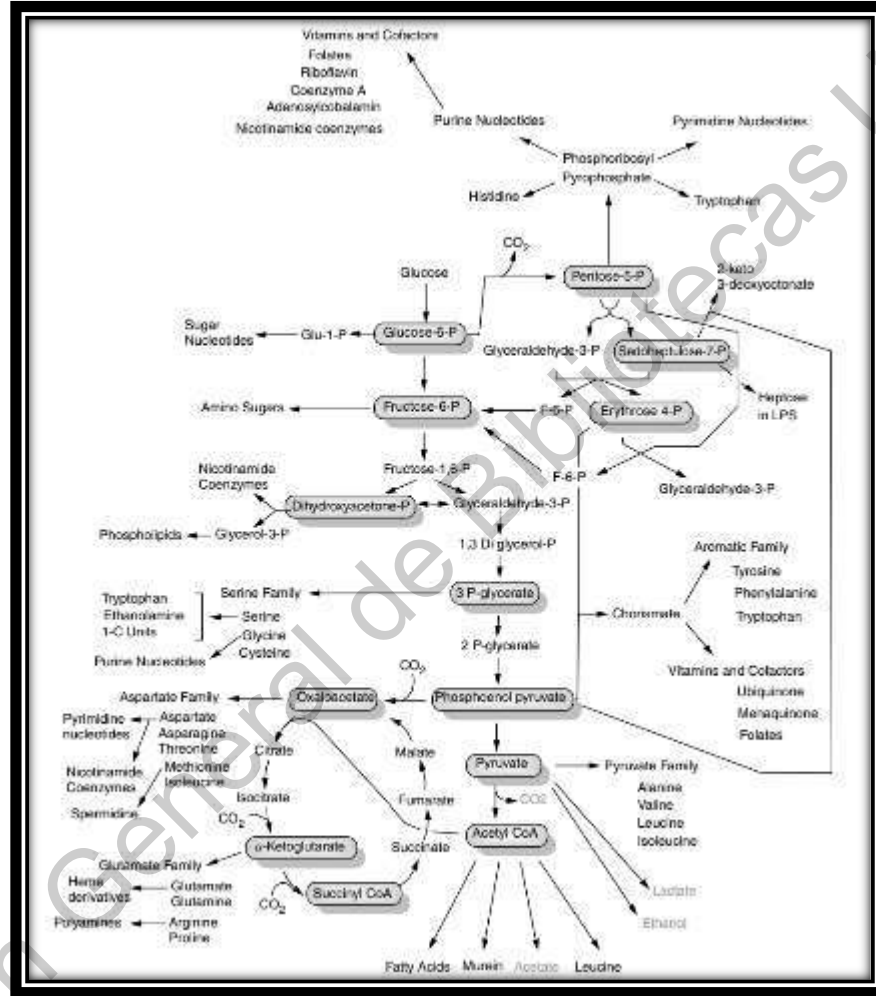


Figura 181. Ruta biosintética para aminoácidos y compuestos relacionados, (Moat, 2002).

Cuadro 28. Esqueletos de carbono usados en la biosíntesis de aminoácidos, (Kim, 2008).

Precursor	Amino acid
Pyruvate	alanine, valine, leucine
Oxaloacetate	aspartate, asparagine, methionine, lysine, isoleucine, threonine
2-ketoglutarate	glutamate, glutamine, arginine, proline
3-phosphoglycerate	serine, glycine, cysteine
PEP and erythrose-4-phosphate	phenylalanine, tyrosine, tryptophan
Ribose-5-phosphate	histidine

Algunos aminoácidos son sintetizados por diferentes vías dependiendo del organismo, sin embargo, usaremos como ejemplo lo que ocurre en *Escherichia coli*.

6.2.1 Familias del piruvato y oxalacetato

El piruvato y oxalacetato son convertidos en alanina y aspartato a través de las reacciones catalizadas por la transaminasa (Figura 182).

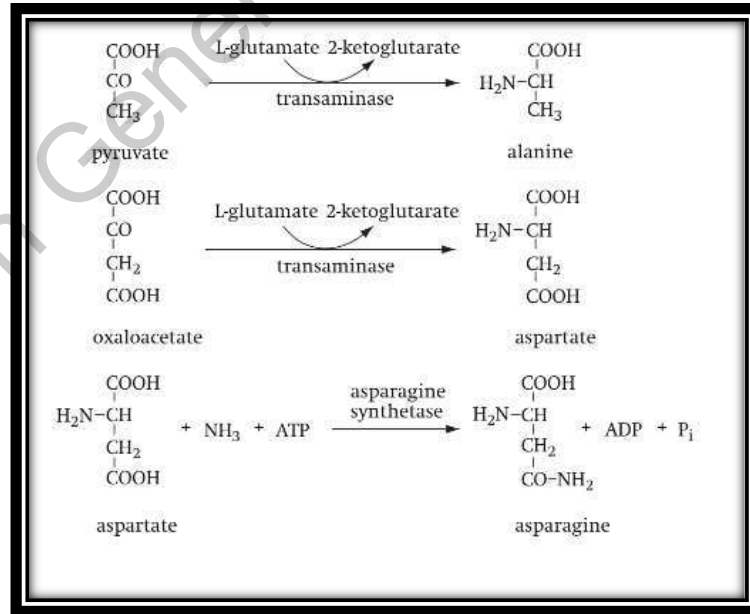


Figura 182. La asparagina sintetasa sintetiza la asparagina a partir del aspartato y el amonio consumiendo energía en forma de ATP, (White, 2007).

La treonina, metionina y lisina son producidos por el aspartato en adición a la asparagina (Figura 183). Un intermediario de la biosíntesis, diaminopimelato, no se encuentra en las proteínas, pero es un precursor de la mureína y ornitina, un intermediario en la biosíntesis de la arginina.

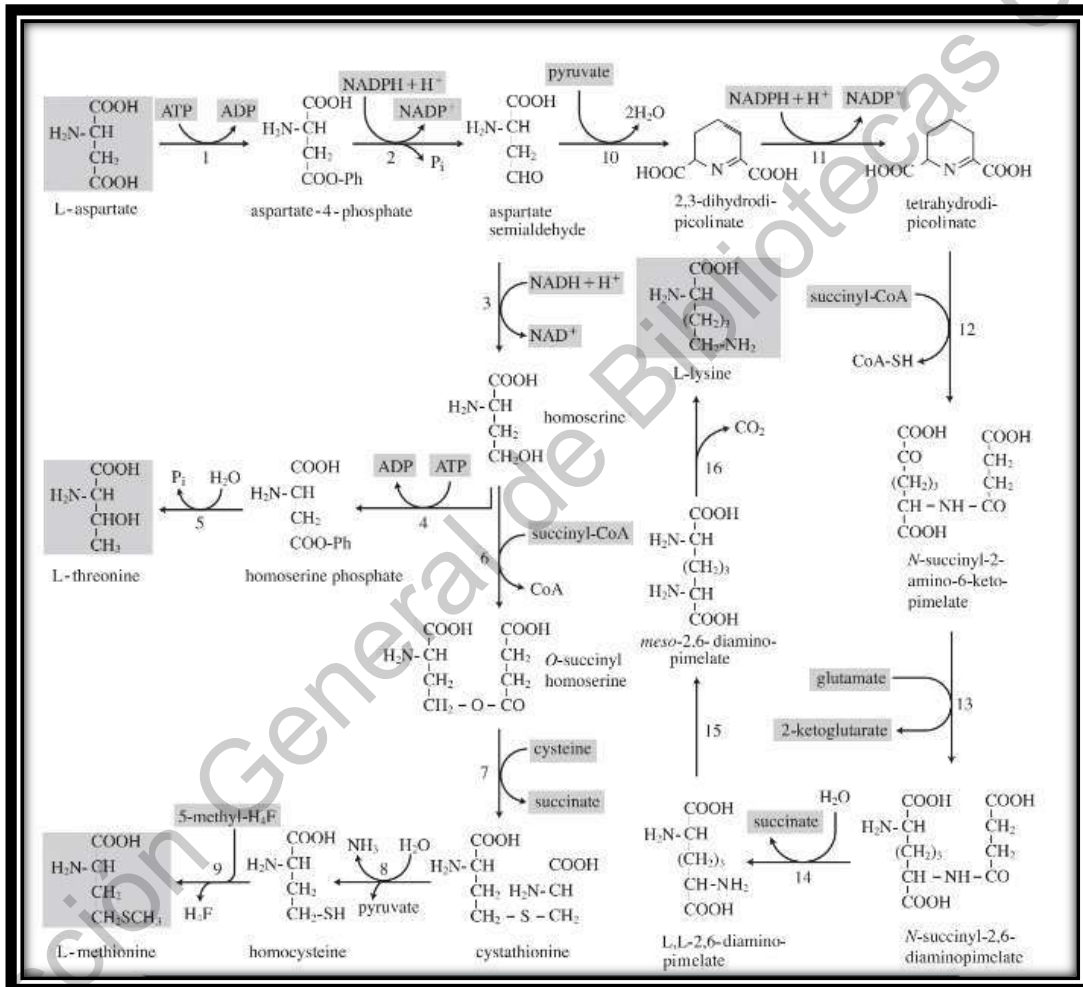


Figura 183. Biosíntesis de treonina, metionina y lisina del precursor común aspartato, (Kim, 2008).

Muchos procariontes utilizan la vía de diaminopimelato para sintetizar lisina, pero levaduras y hongos sintetizan este aminoácido de 2-cetoglutarato a través de la vía 2-aminodiapato (Figura 184).

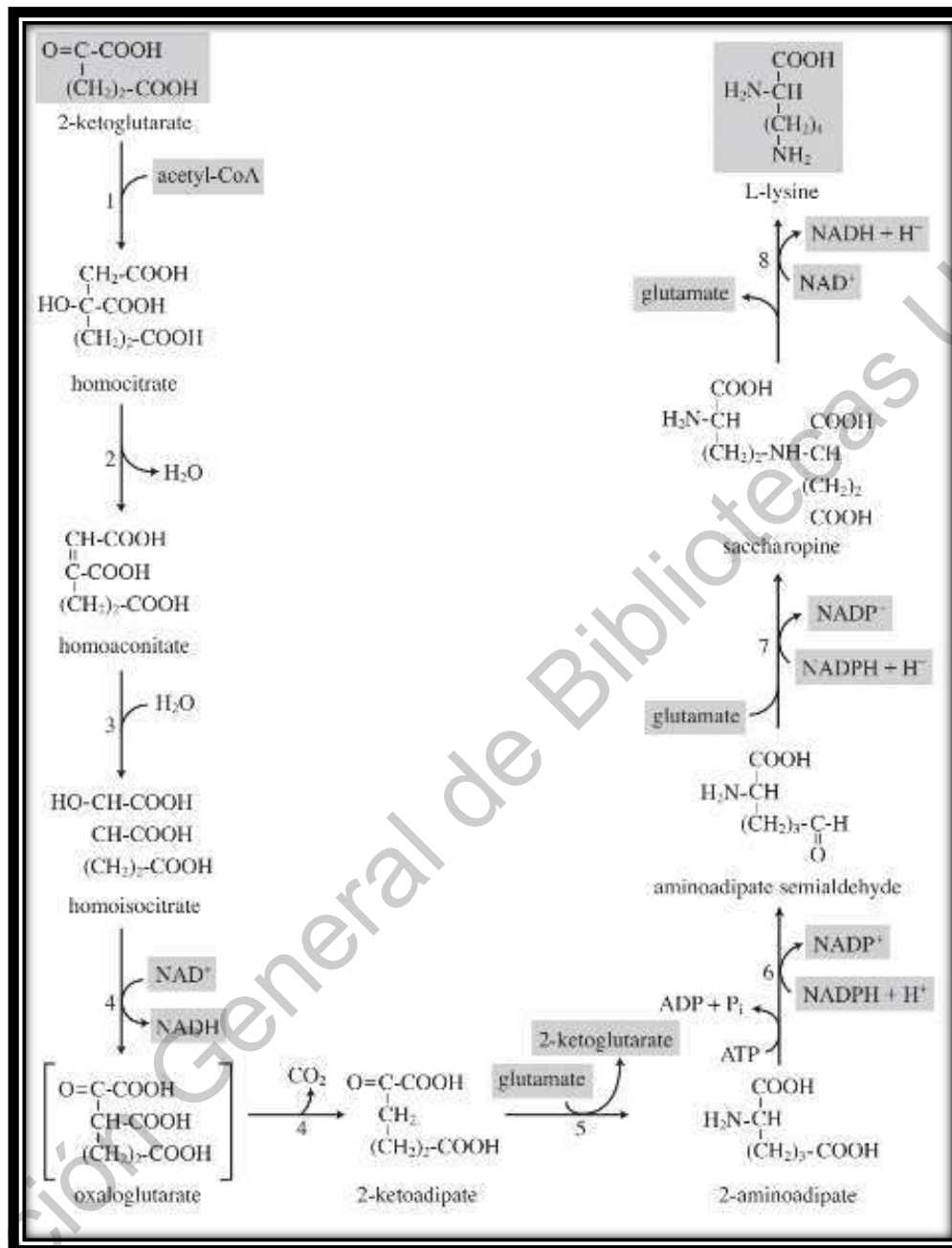


Figura 184. Biosíntesis de lisina en levaduras y hongos a través de la vía 2-aminoadipato, (Kim, 2008).

La treonina producida por el aspartato es deaminada a 2-cetobutirato, donde es usado como precursor para la biosíntesis de isoleucina. 2 moléculas de piruvato son condensadas a 2-acetolactato para la biosíntesis de leucina y valina (Figura 185).

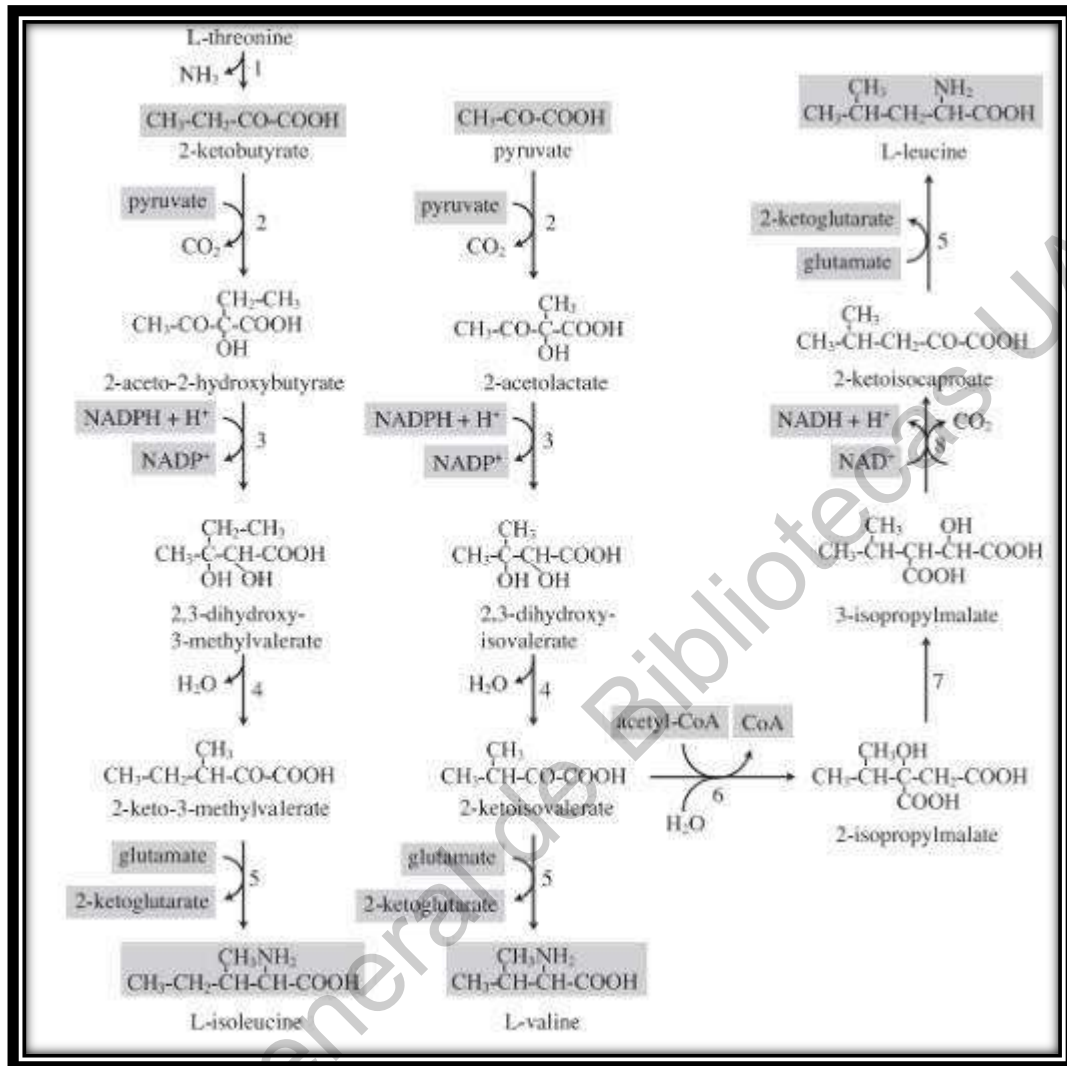


Figura 185. Biosíntesis de Isoleucina, valina y leucina, (Kim, 2008).

6.2.2 Familias del fosfoglicerato

El 3-fosfoglicetato intermediario de la vía EMP es convertido a Serina y más adelante a glicina y cisteína (Figura 186).

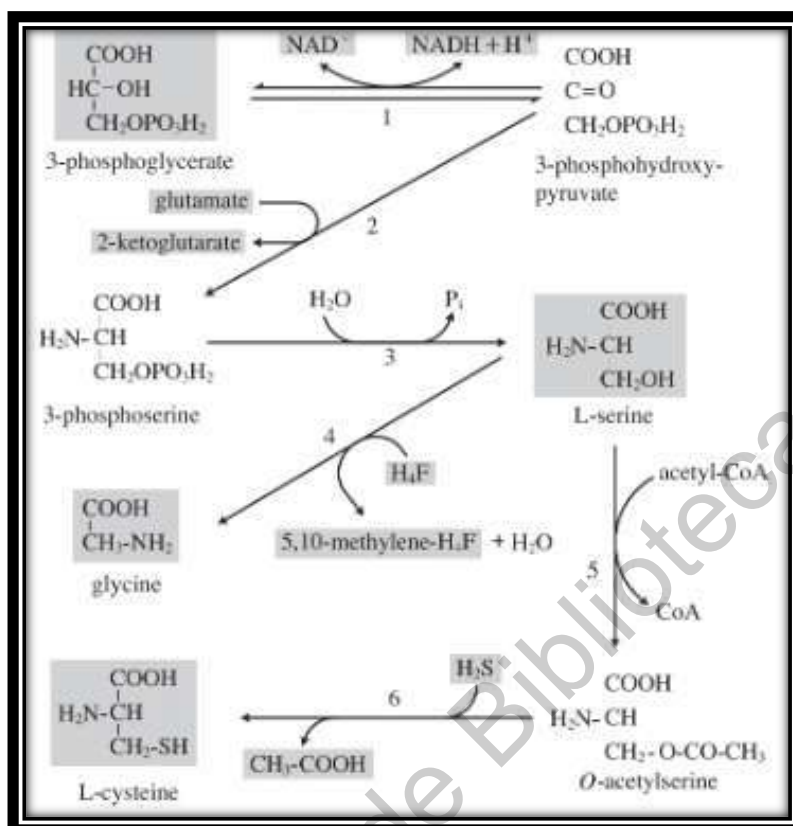


Figura 186. Biosíntesis de glicina, serina y cisteína a partir de 3-fosfoglicerato, (Kim, 2008).

6.2.3 Familias del 2-cetoglutarato

El glutamato sintetizado de 2-cetoglutarato a través de reacciones catalizadas por glutamato deshidrogenasa es el precursor para la síntesis de prolina, arginina y glutamina (Figura 187). La N-acetilornitina deacetilasa no se ha detectado en bacterias corineformes, *Pseudomonas aeruginosa* y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En su lugar, la reacción es catalizada por N-acetilglutamato-acetilornitina acetiltransferasa acoplando las reacciones 6 y 9 en ese organismo.

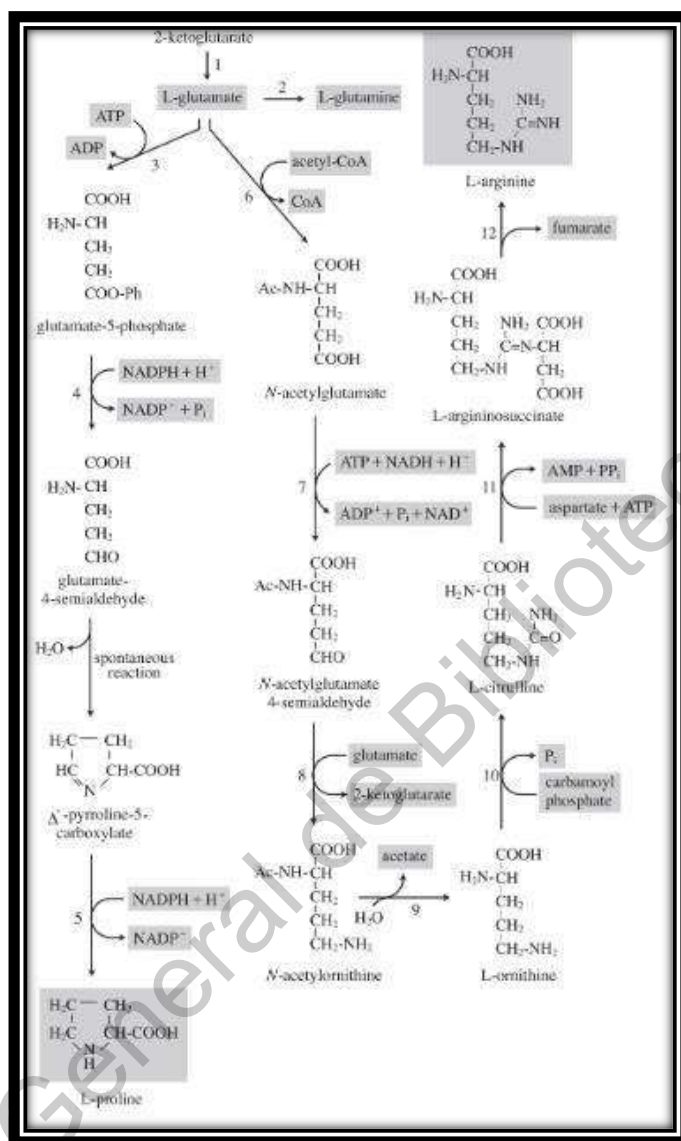


Figura 187. Biosíntesis de glutamato, glutamina, prolina y arginina de 2-cetoglutarato, (Kim, 2008).

6.2.4 Aminoácidos aromáticos

El benceno de los aminoácidos aromáticos está formado por Shikimato, el cual es producido por la condensación de eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato. El Shikimato es metabolizado más adelante a fenilpiruvato y *p*-hidroxifenilpiruvato antes de ser transaminado a fenilalanina y tirosina respectivamente (Figura 188).

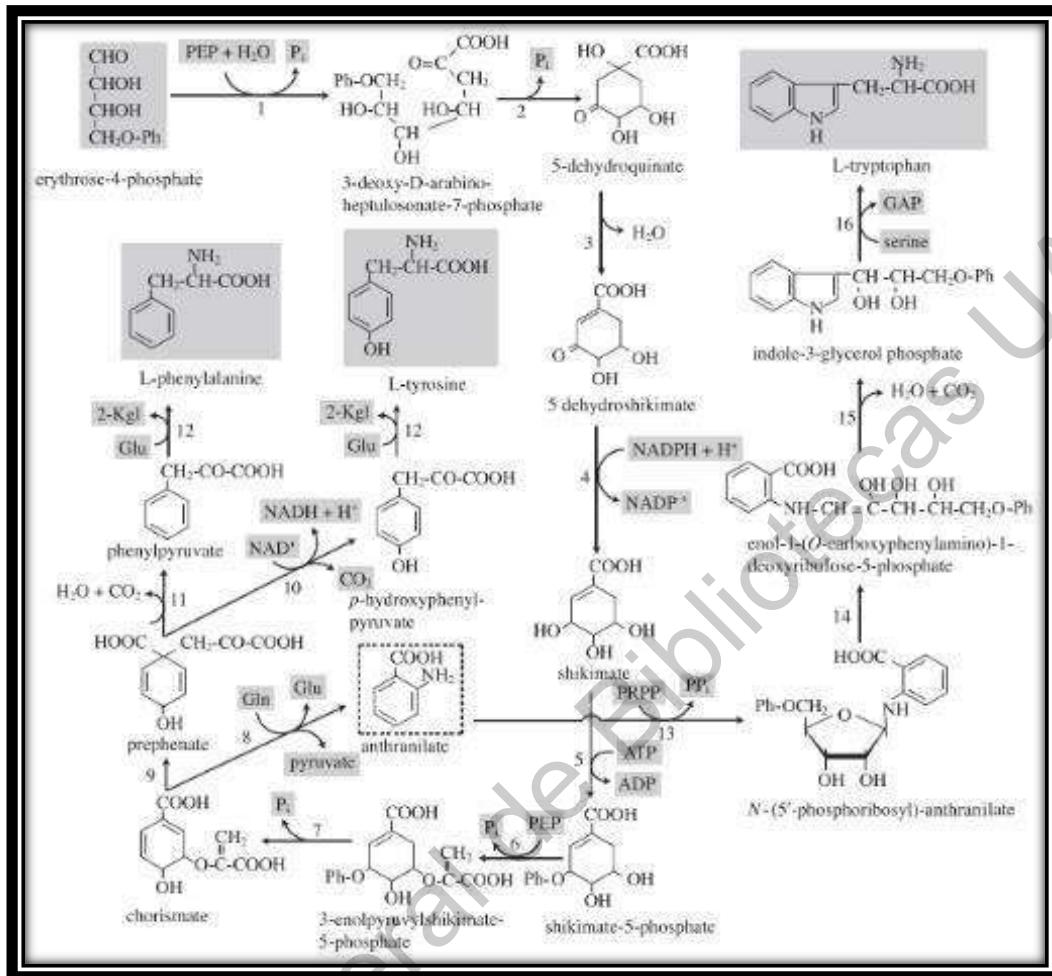


Figura 188. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos, (Kim, 2008).

6.2.5 Biosíntesis de histidina

La histidina es producida por 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP).

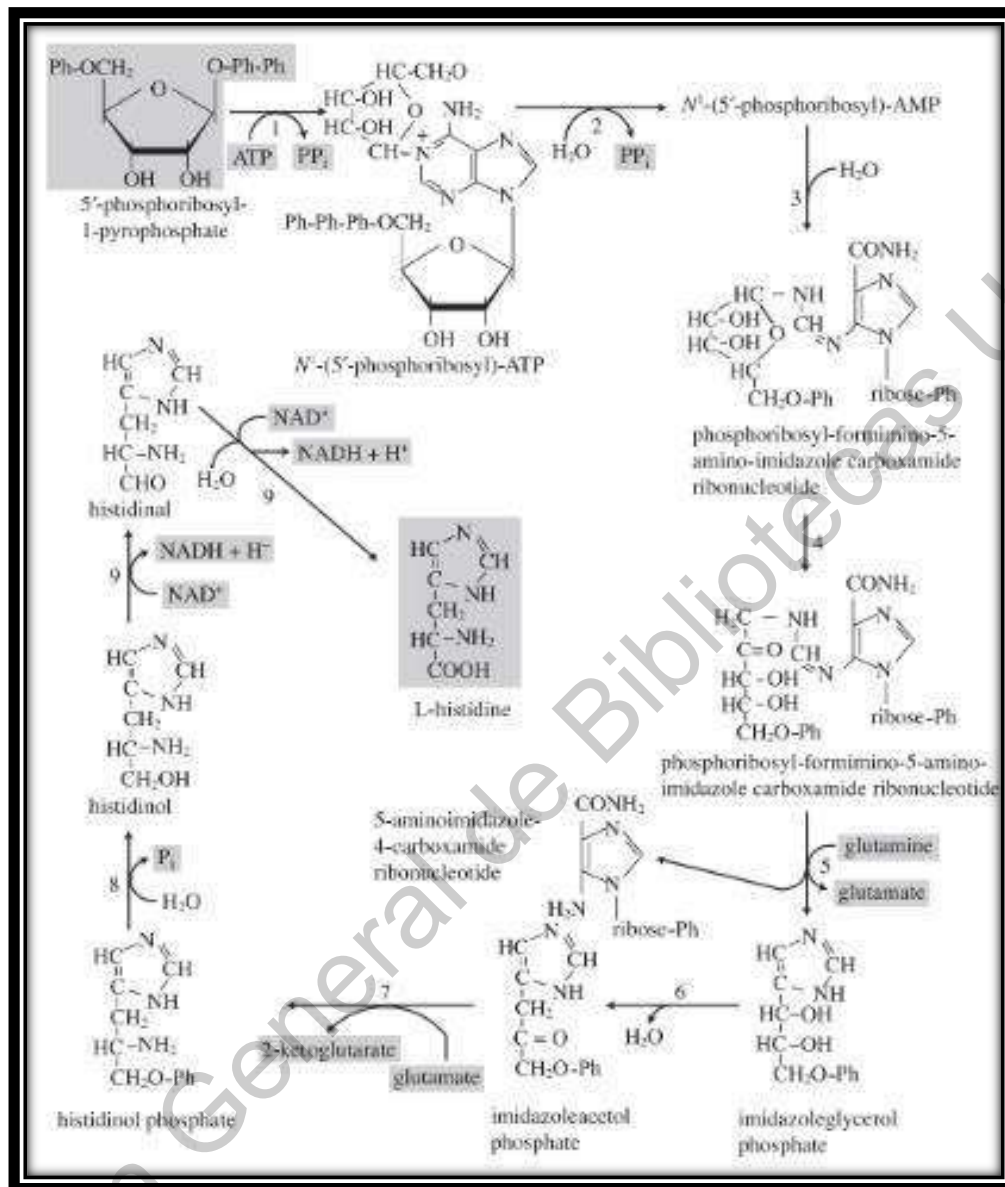


Figura 189. Biosíntesis de la histidina, (Kim, 2008).

6.3 Biosíntesis de ácidos nucleicos.

Los nucleótidos son sintetizados en una vía de novo desde el principio o vía de salvamento, de esta forma se reciclan las bases.

6.3.1 Vías de salvamento

Normalmente la vida media del ARNm es corta porque continuamente se sintetiza y regenera. Las bases que surgen de la rotación de los ácidos nucleicos son reciclados a nucleótidos en las vías de salvamento. En esta reacción una base reemplaza el 1-pirofosfatofosfato del 5-fosforibosil-1-pirofosfato catalizado por fosforibosil transferasa (White, 2007).



6.3.2 Biosíntesis de nucleótido de pirimidina a través de la vía *de novo*.

La síntesis de pirimidina (Figura 190) empieza con la síntesis de carbamoil fosfato a carbonato. El ATP provee la energía necesaria para la reacción del grupo $-NH_2$ desde glutamina, (White, 2007).



El orotato es sintetizado como precursor de los nucleótidos de piridina antes de unirse a PRPP.

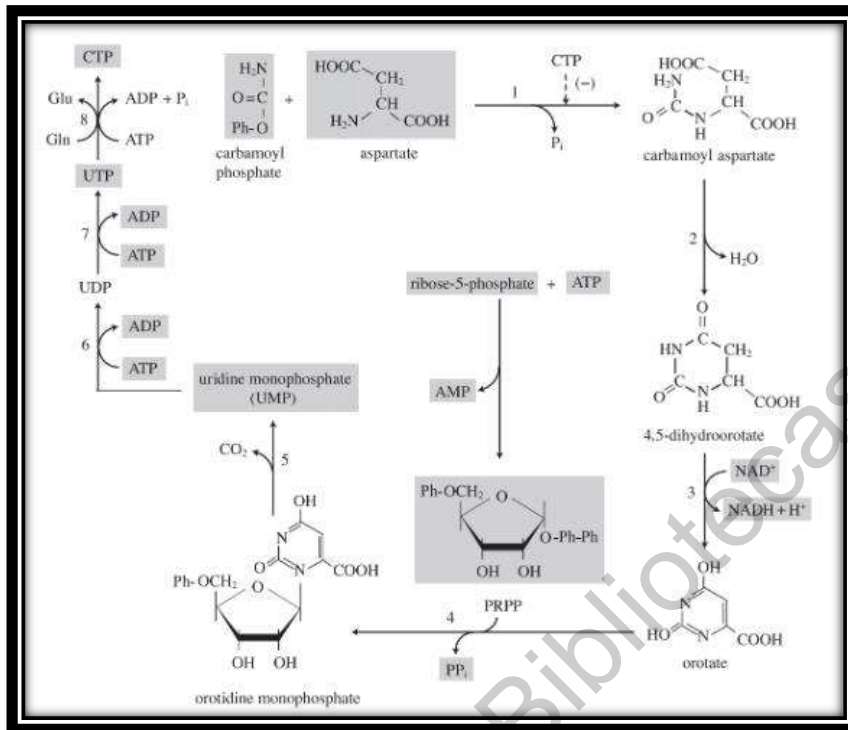


Figura 190. Biosíntesis de *ново* de nucleótidos de piridina, (Kim, 2008).

6.3.2.2 Biosíntesis de *ново* de nucleótidos de Purina

Los nucleótidos de purina (Figura 191) se sintetizan a partir de la glutamina como donador de $-NH_2$ a PRPP, después la inosina-5-monofosfato es sintetizada con la adición de carbonos y nitrógeno en forma de glicina, meteniltetrahidrofolato, glutamina, aspartato y formil tetrahidrofolato. La inosina 5-monofosfato es convertida a guanosina-5-monofosfato y adenosina-5-monofosfato.

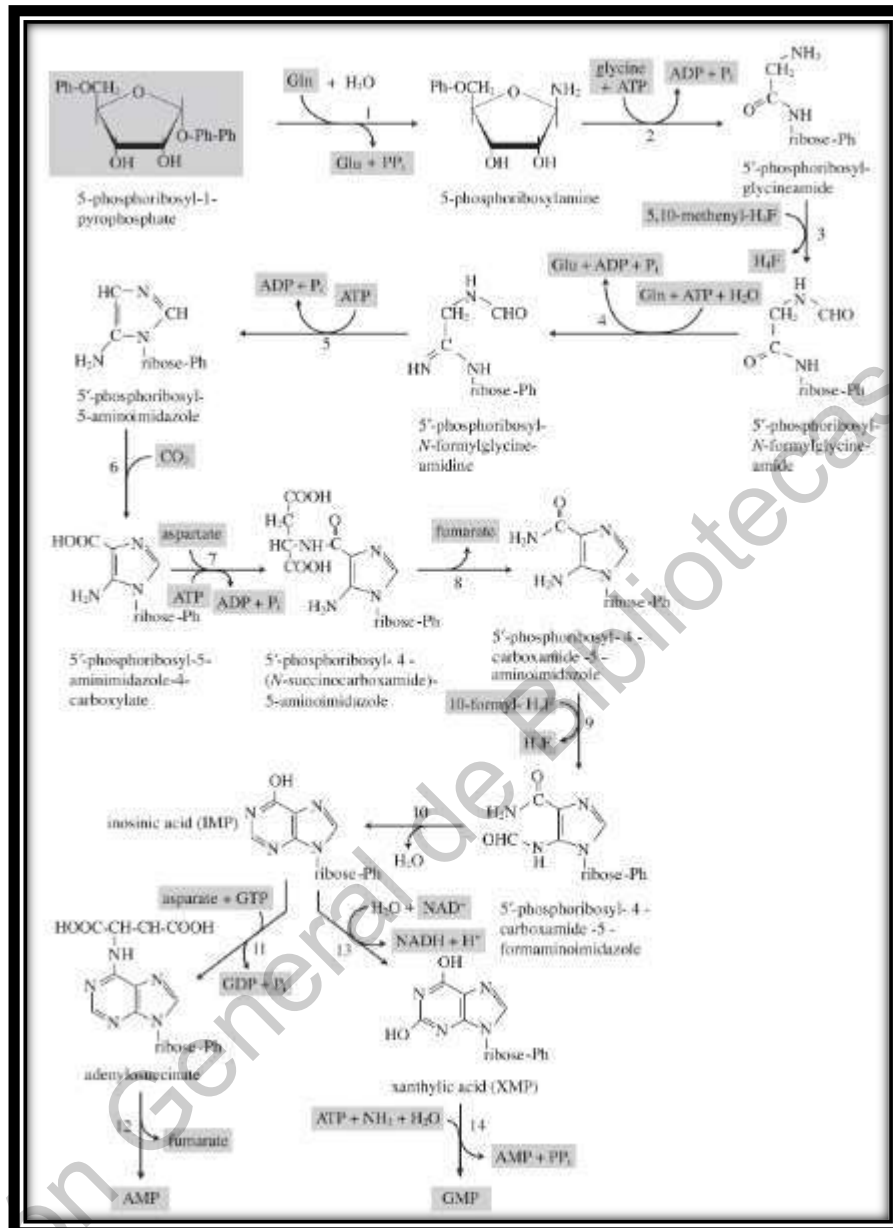
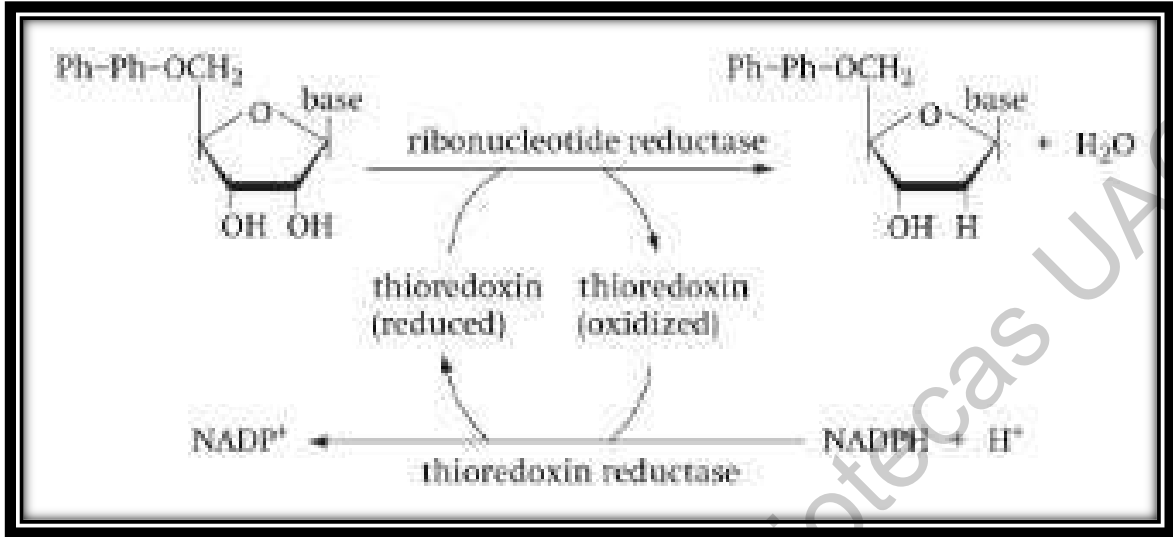


Figura 191. Biosíntesis de nucleótidos de purina, (Kim, 2008).

6.3.3 Biosíntesis de deoxinucleótidos

La síntesis de ARN requiere ATP, guanosina 5'-fosfato, citidina 5'-trifosfato y uridina 5'-trifosfato como bloques de construcción y los deoxinucleótidos trifosfatos son los sustratos para la ADN polimerasa (Figura 191). Los ribonucleótidos son reducidos a deoxinucleótidos por la ribonucleotido reductasa, (White, 2007).



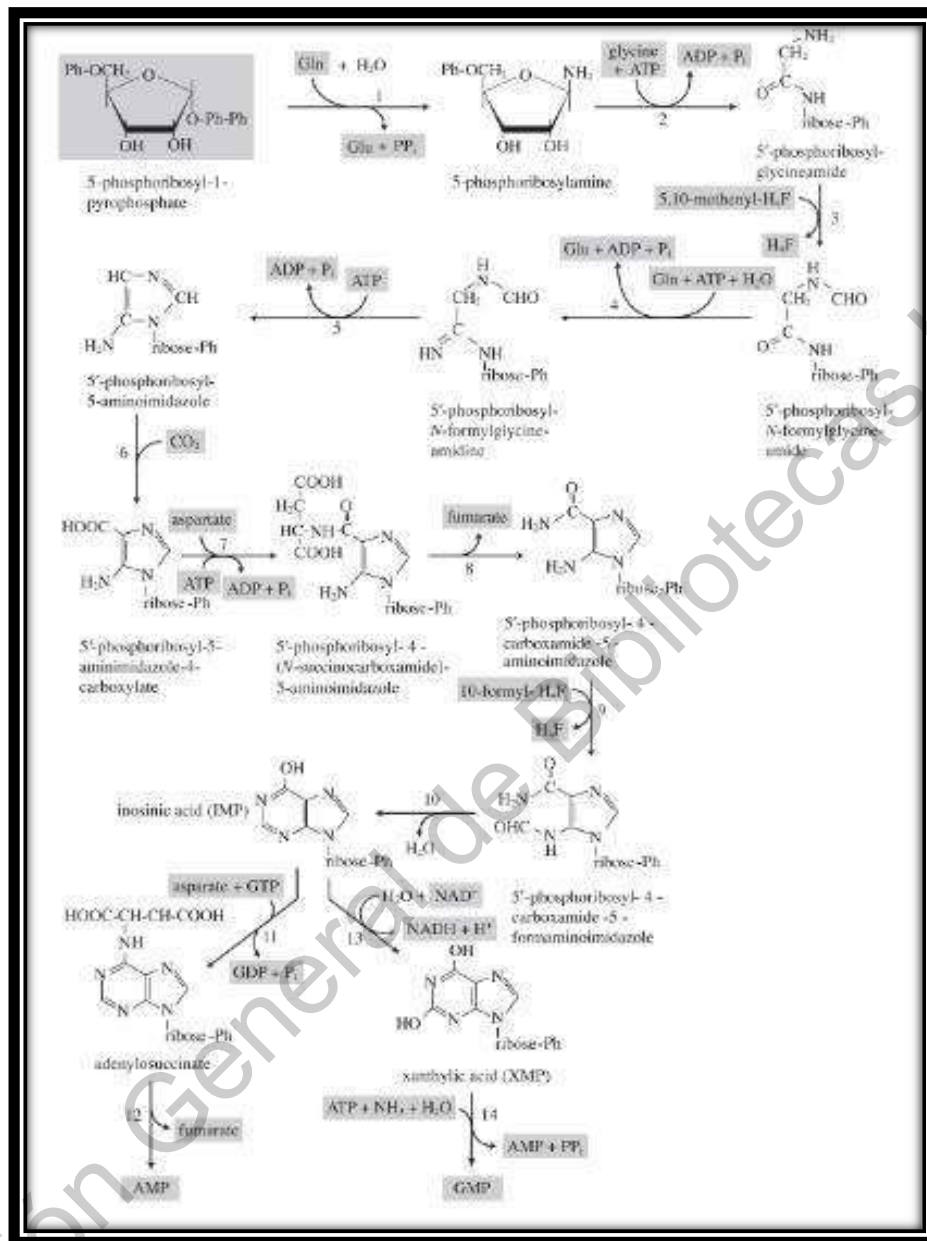


Figura 192. Biosíntesis de nucleótidos de purina, (Kim, 2008).

6.4 Síntesis de lípidos.

Los fosfolípidos son componentes celulares esenciales de la mayor parte de la membrana. Los fosfolípidos bacterianos están compuestos por acilglicerido con un éster unido entre glicerol y ácidos grasos como en una célula eucarionte. Las

membranas de las arqueas contienen fosfolípidos con un éter unido entre un polialcohol y un alcohol poliisoprenoide. Los ácidos grasos y los alcoholes isoprenoides son sintetizados a partir de Acetil CoA.

6.4.1 Biosíntesis de ácidos grasos

El Acetil CoA es convertido a proteína transportadora acil-acil (acil-ACP) a través de la acción de 7 enzimas (Figuras 193 y 194).

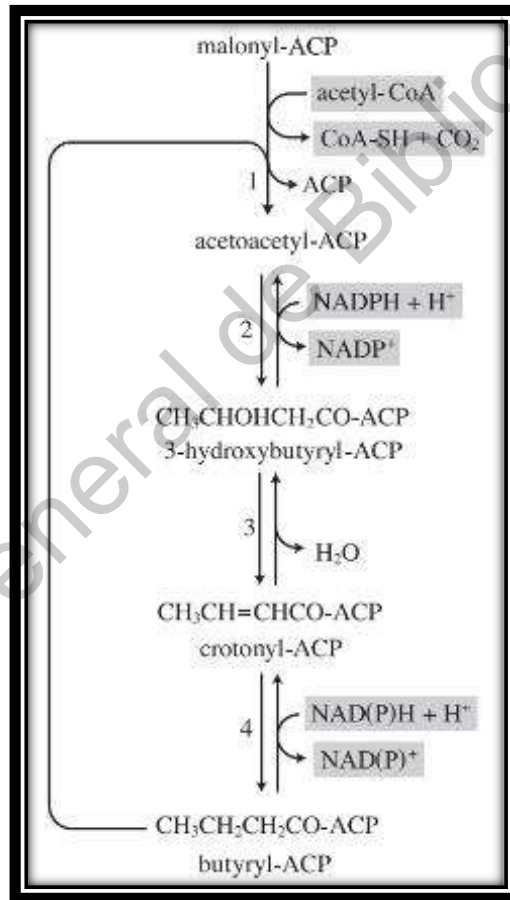


Figura 193. Síntesis de Acil-ACP, (Kim, 2008).

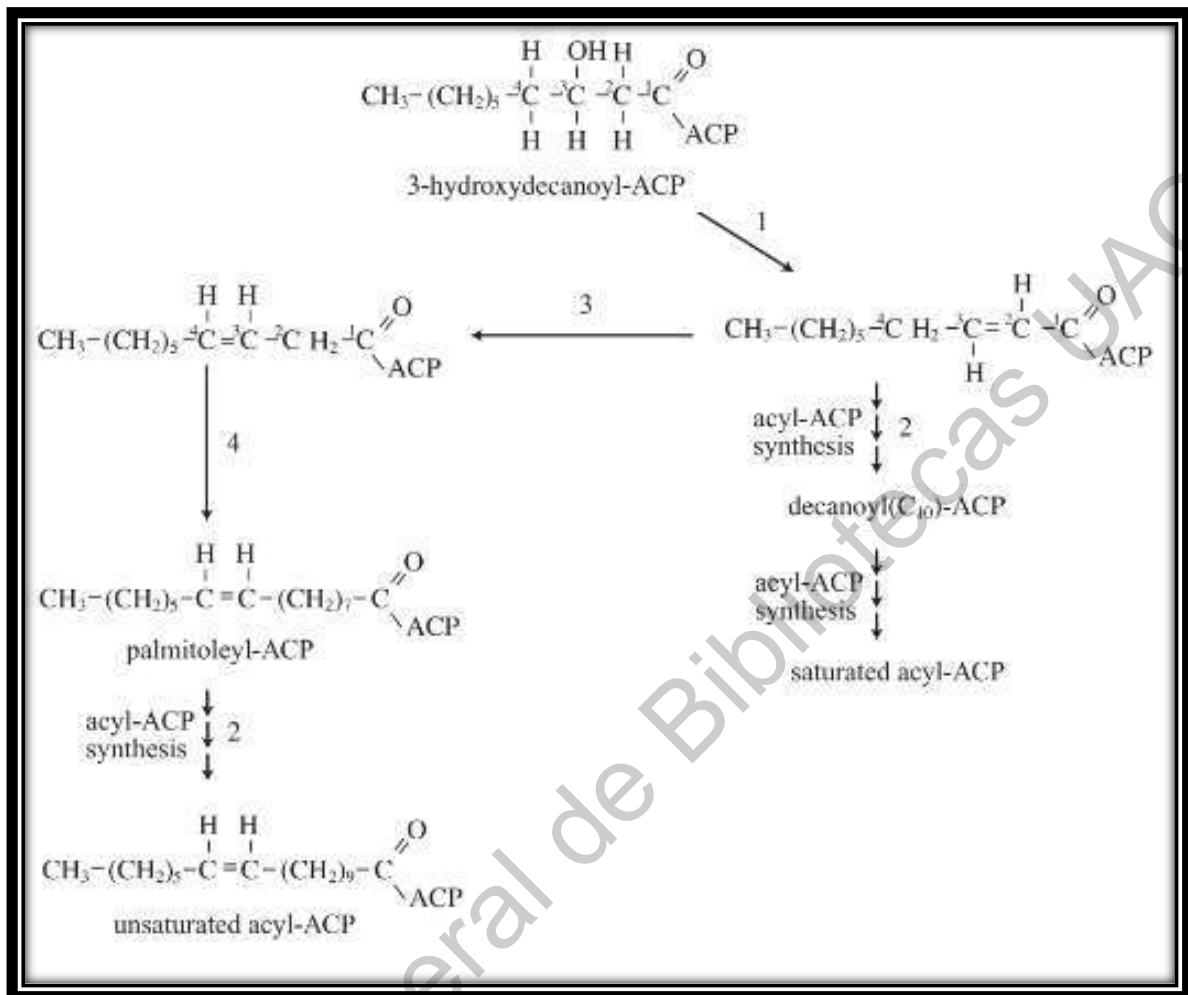
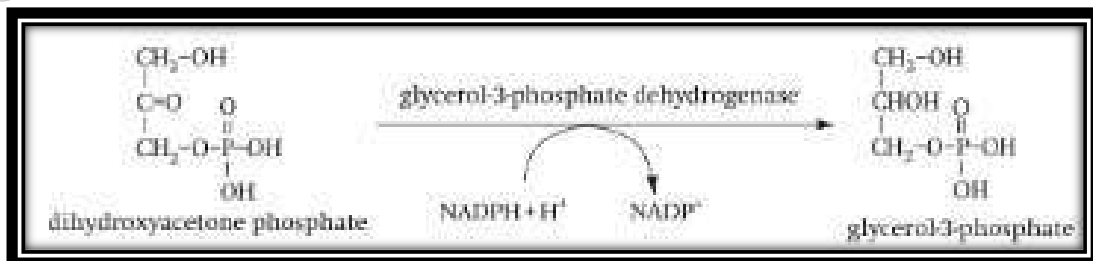


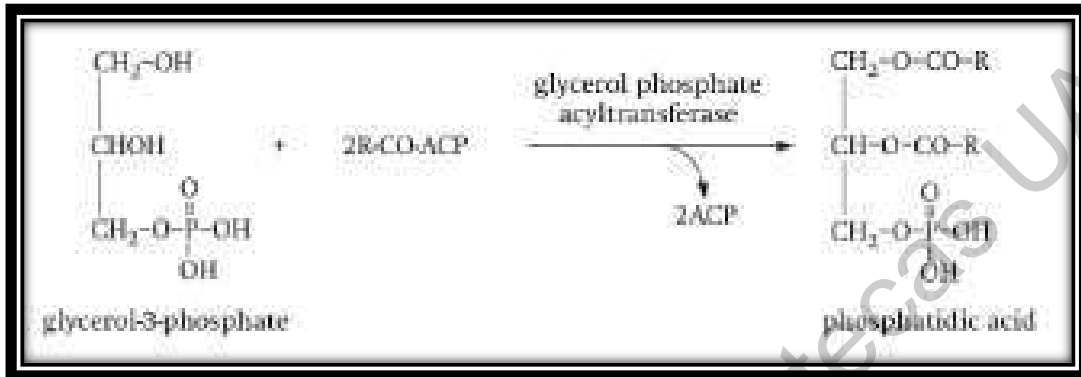
Figura 194. Síntesis de Acil-ACP insaturado por la ruta anaeróbica, (Kim, 2008).

6.4.2 Biosíntesis de fosfolípidos

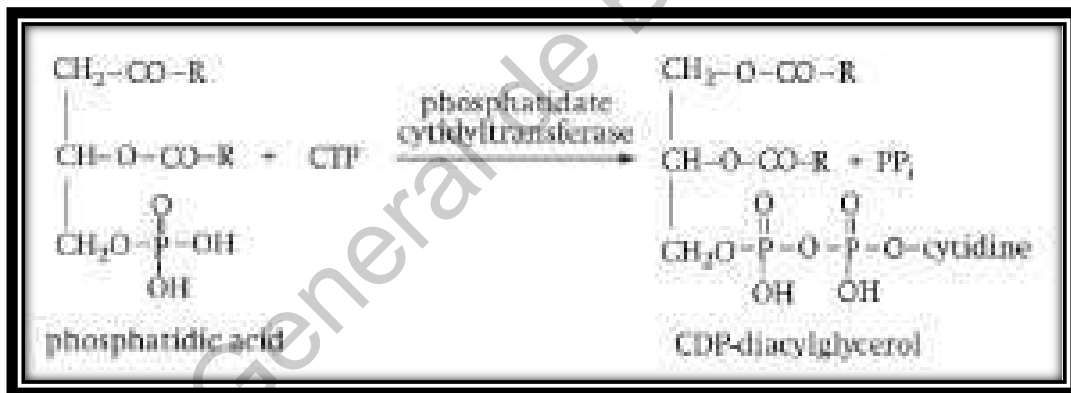
El dihidroxiacetato fosfato (Intermediario de la vía EMP) es reducido a glicerol-3-fosfato, oxidando NADPH:



El glicerol-3-fosfato aciltransferasasintetiza ácido fosfatídico, precursores para la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos.



El ácido fosfatídico en activado CDP-diacilglicerol



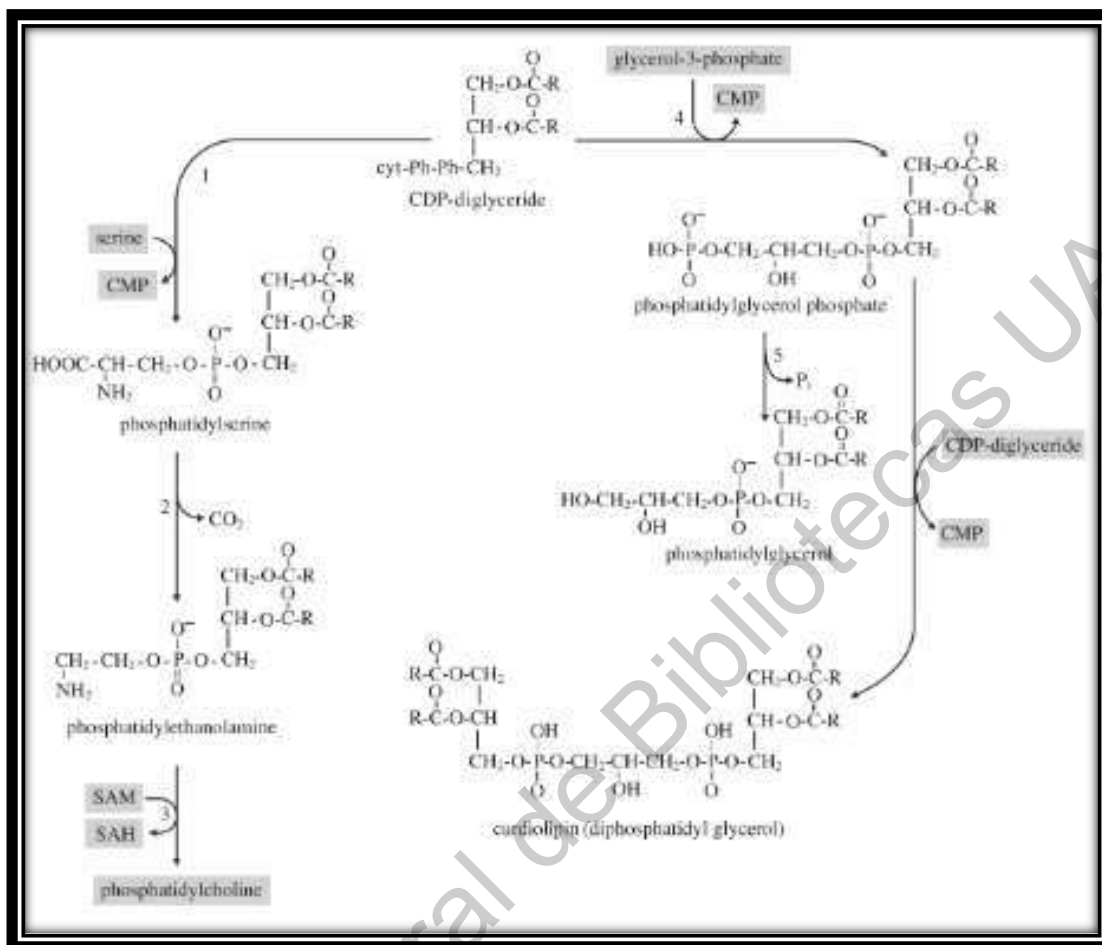


Figura 195. Biosíntesis de fosfolípidos, (Kim, 2008).

6.4.3 Biosíntesis de isoprenoides

Varios isoprenoides son encontrados en células microbianas (Figura 196). Incluyendo residuos de alcohol de *Archeas*, fosfolípidos de membrana citoplasmáticos, quinones y carotenoide. Ellos son sintetizados a través de Isopentil pirofosfato (IPP). Se conocen 2 vías para producir Isopentil pirofosfato: la vía del mevalonato y la vía independiente de mevalonato.

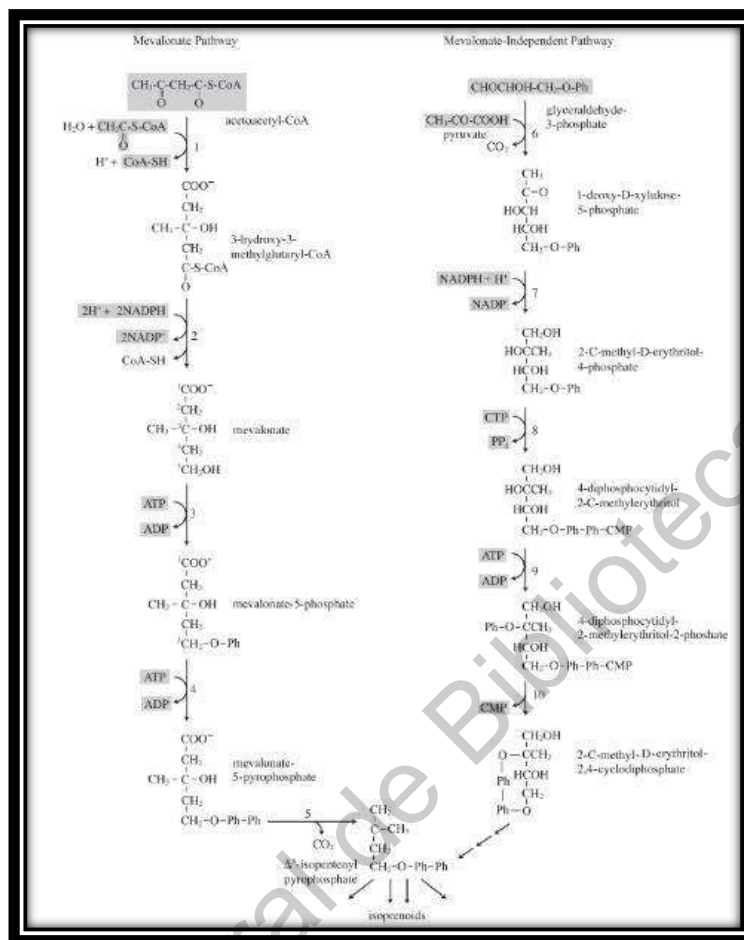


Figura 196. Síntesis de Isopentil pirofosfato (IPP), precursor de isoprenoides a través de la vía mevalonato o a través de la vía independiente de mevalonato, (Kim, 2008).

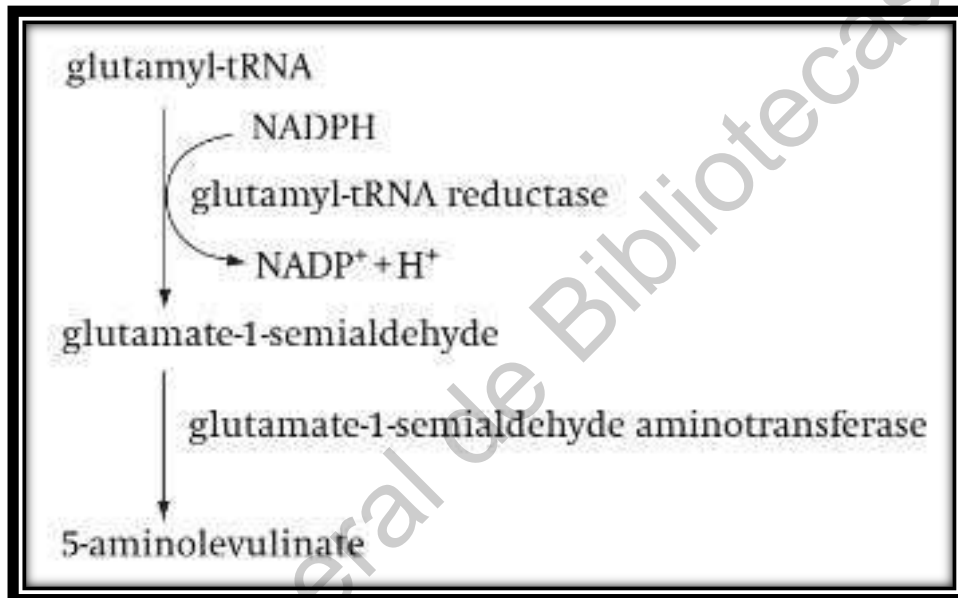
6.5 Formación de tetrapirroles y grupo hemo.

Muchas proteínas contienen grupos hemo, incluyendo citocromo y clorofila, el 5-aminolevulinato es un precursor común en la síntesis de tetrapirroles (Figura 197).

Solamente en *Alphaproteobacteria* se ha encontrado la aminolevulinato sintetasa.



En procariontes el precursor del grupo Hemo es sintetizado de Glutamato-tARN.



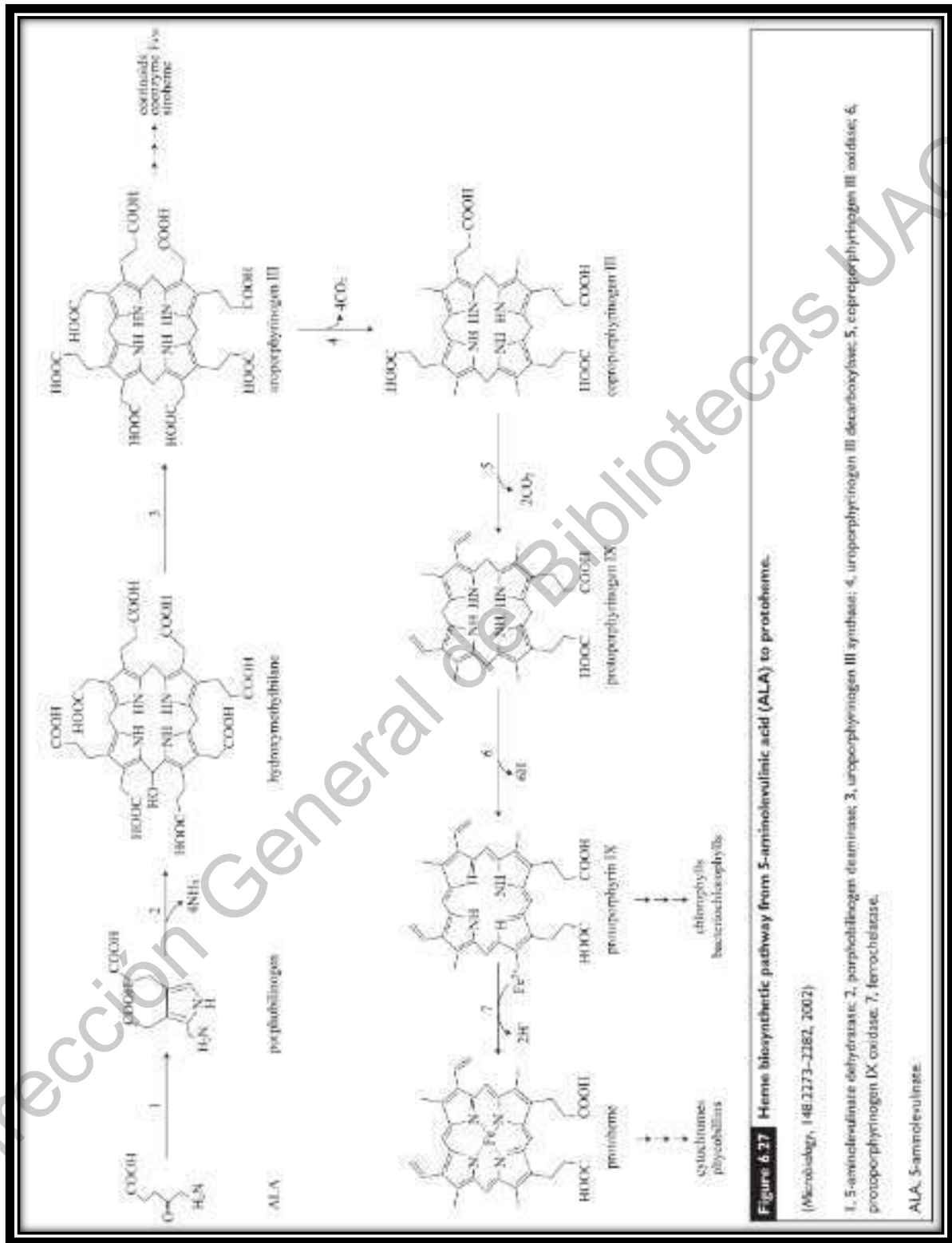


Figure 6.27 Heme biosynthetic pathway from 5-aminolevulinic acid (ALA) to protoheme.

(Microbiology, 148:2173–2182, 2002)

1, 5-aminolevulinic acid dehydratase; 2, porphobilinogen deaminase; 3, uroporphyrinogen III synthase; 4, uroporphyrinogen III decarboxylase; 5, coproporphyrinogen III oxidase; 6, protoporphyrinogen IX oxidase; 7, ferrochelatase.

ALA, 5-aminolevulinic acid

Figura 197. Vía hemo biosintética de ALA a protohemo, (Kim, 2008).

7. INTEGRACIÓN METABÓLICA Y ANÁLISIS DE CULTIVOS

Las células microbianas son un complejo de reacciones anabólicas y catabólicas con muchas vías interconectadas. Cada vía catabólica consiste en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que convierte un sustrato en productos. La regulación metabólica consiste en la organización química que presentan las vías metabólicas, es decir la concentración de enzimas en las vías y la actividad catalítica pueden ser reguladas por el mismo flujo de la vía, por la concentración de cofactores o por la disponibilidad de los sustratos, (Doelle, 2010).

7.1 Regulación enzimática.

Existen 4 factores responsables de la actividad enzimática en las vías metabólicas: disponibilidad de sustrato, disponibilidad de cofactores, eliminación de productos e inhibición por retroalimentación (Figura 199).

Disponibilidad del sustrato. Cualquier vía metabólica puede en teoría, ser regulada simplemente por la disponibilidad del sustrato. La reducción en la concentración del sustrato reducirá la actividad de la enzima y disminuirá el flujo de la vía.

Disponibilidad de cofactores: La regulación es similar a la regulación por disponibilidad del sustrato, la diferencia principal es que la síntesis del cofactor está determinada por el código genético (Figura 198), (Doelle, 2010).

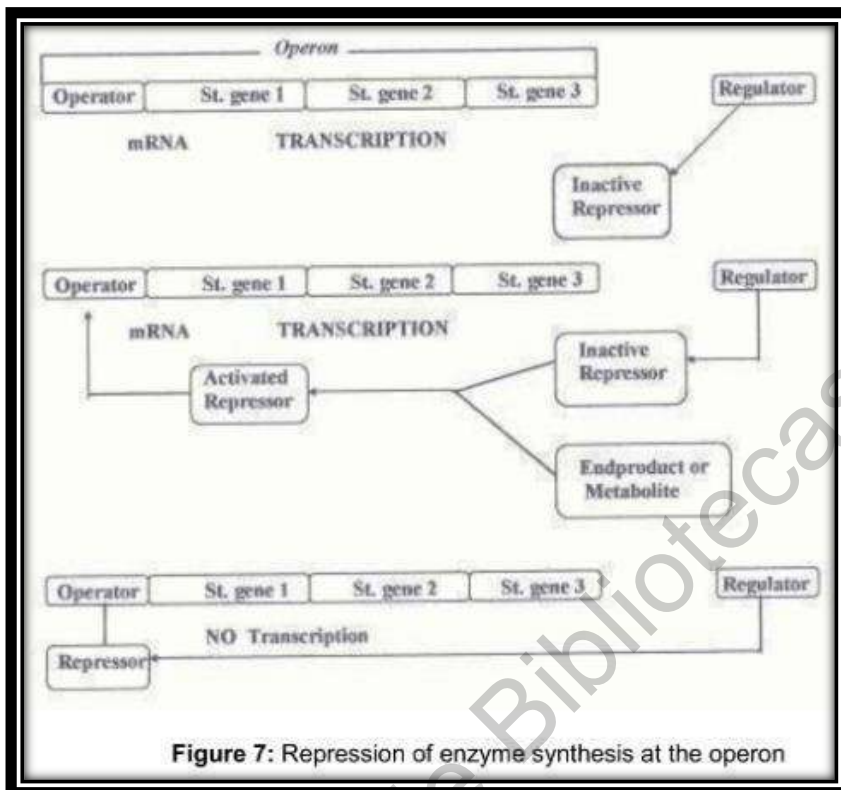


Figura 198. Represión enzimática por operón, (Doelle, 2010).

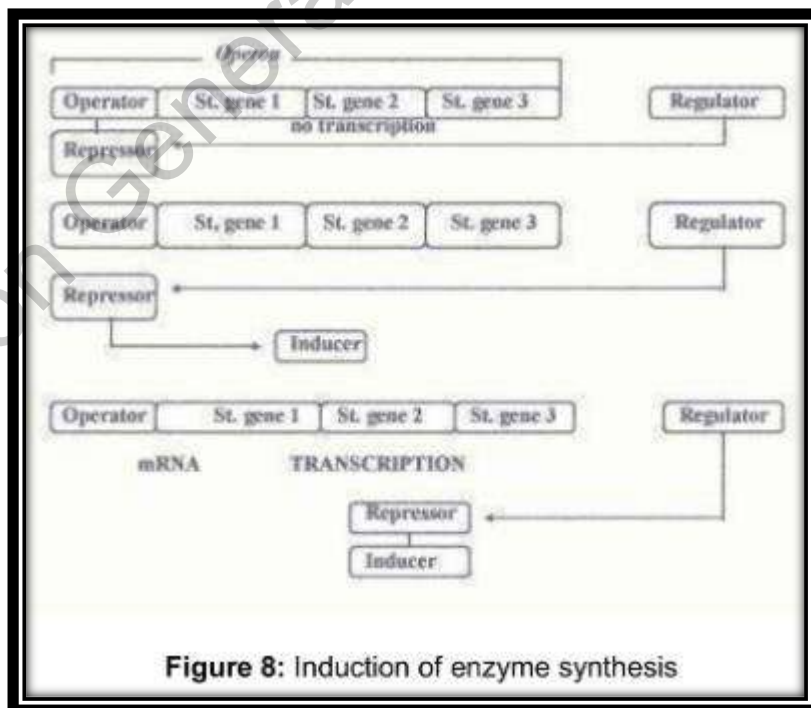


Figura 199. Inducción de síntesis enzimática, (Doelle, 2010).

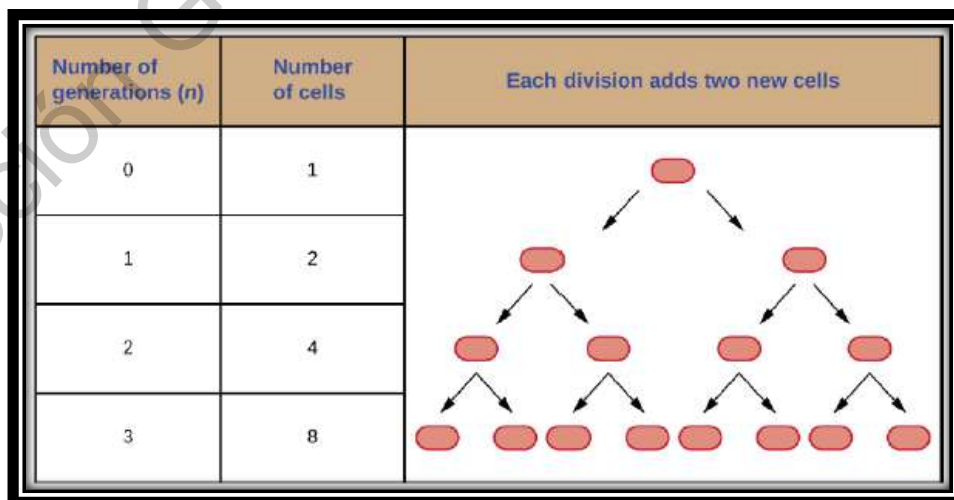
Remoción de productos e inhibición por retroalimentación: La inhibición por retroalimentación ocurre cuando el producto de una reacción enzimática, ya sea al final o en una bifurcación de una vía determinada, actúa como efector alostérico, inhibiendo temporalmente la actividad de una enzima, en un paso anterior de la vía.

7.3 Crecimiento microbiano.

Para que el crecimiento bacteriano tenga lugar es necesario un aporte adecuado de nutrientes. Todos los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y diversos minerales para crecer. Muchos necesitan también nutrientes especiales. Los microorganismos captan estos nutrientes mediante diversos mecanismos de transporte a través de la membrana.

El crecimiento de una población bacteriana está definido por el aumento de la masa bacteriana o del número de individuos (Cuadro 29). Velocidad de crecimiento. Cambio en la masa celular o en el número de células experimentado por unidad de tiempo (Cuadro 30).

Cuadro 29. Esquema del número de células según el número de generaciones, (Madigan, 2015)



Tiempo de generación (g). Tiempo requerido para que la población se duplique. Durante cada generación se duplican la masa y el número de células. Es un parámetro variable para los diferentes microorganismos

Cuadro 30. Tiempo de generación celular, (Madigan, 2015).

Time (h)	Total number of cells
0	1
0.5	2
1	4
1.5	8
2	16
2.5	32
3	64
3.5	128
4	256 (2^8)
4.5	512 (2^9)
5	1,024 (2^{10})
5.5	2,048 (2^{11})
6	4,096 (2^{12})
.	.
.	.
10	1,048,576 (2^{19})

Si el tiempo de generación es constante, el número de células de la población bacteriana se duplica en un período fijo. Se conoce como crecimiento balanceado, crecimiento logarítmico o crecimiento exponencial (Figura 200).

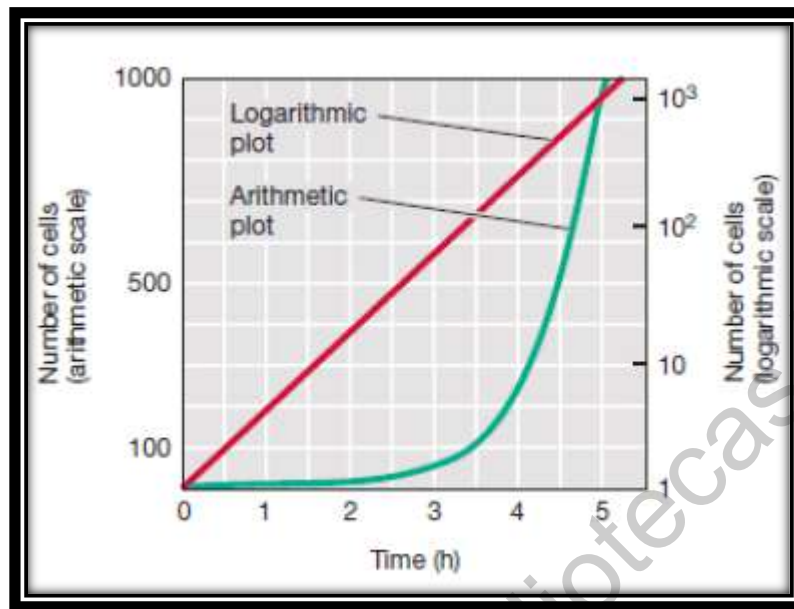


Figura 200. Crecimiento celular logarítmico, (Madigan, 2015).

En una población de bacterias que se encuentre en crecimiento equilibrado (medio adecuado, parámetros nutricionales y ambientales constantes) todos los constituyentes aumentan de manera proporcional en la unidad de tiempo.

$$\text{Velocidad de aumento de células} = \mu \cdot N^{\circ} \text{ o masa de células}$$

μ : velocidad específica de crecimiento

$$\frac{dZ}{dt} = \mu \cdot Z$$

Considerando el número de células N

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot N$$

$$\frac{dN}{N} = \mu \cdot dt$$

$$\int \frac{dN}{N} = \int \mu \cdot dt$$

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu \cdot (t - t_0)$$

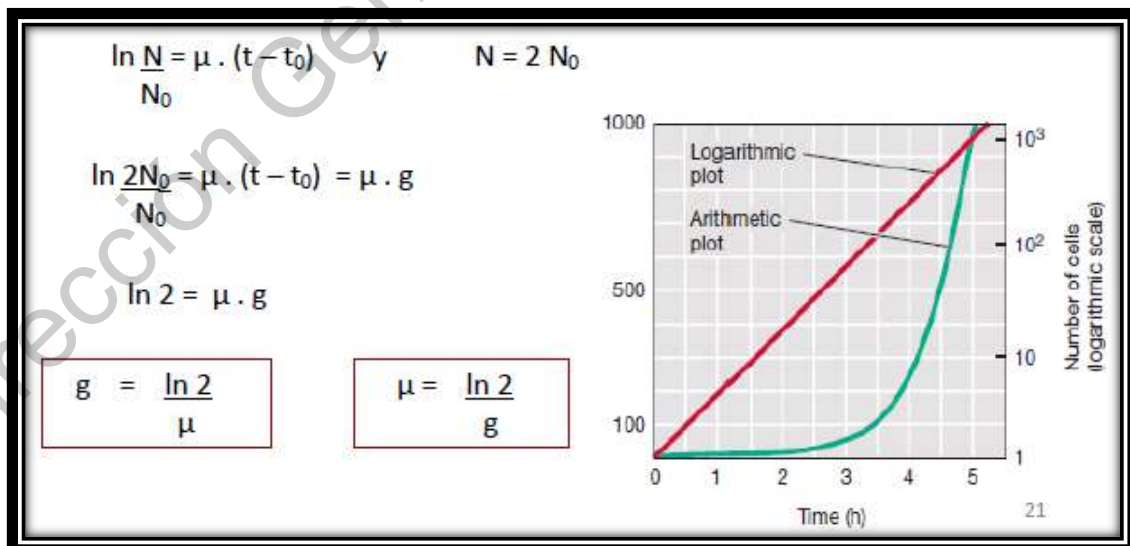
$$\ln N - \ln N_0 = \mu \cdot (t - t_0)$$

$$\ln N = \ln N_0 + \mu \cdot (t - t_0)$$

$$N = N_0 e^{\mu \cdot (t - t_0)}$$

Tiempo de generación o de duplicación (g): tiempo requerido para que los componentes del cultivo se incrementen en un factor de dos.

Si la velocidad específica de crecimiento es constante:



7.4 Sistemas de cultivo de crecimiento.

Existen 2 sistemas de crecimiento de cultivos, estos pueden ser cerrados o continuos. En un laboratorio lo más común es un sistema de cultivo cerrado (Figura 201). EL volumen del medio de cultivo es fijo, no hay aporte de nuevos nutrientes ni forma de eliminar los desechos. Tiene una curva de crecimiento típica cerrado (Figura 201).

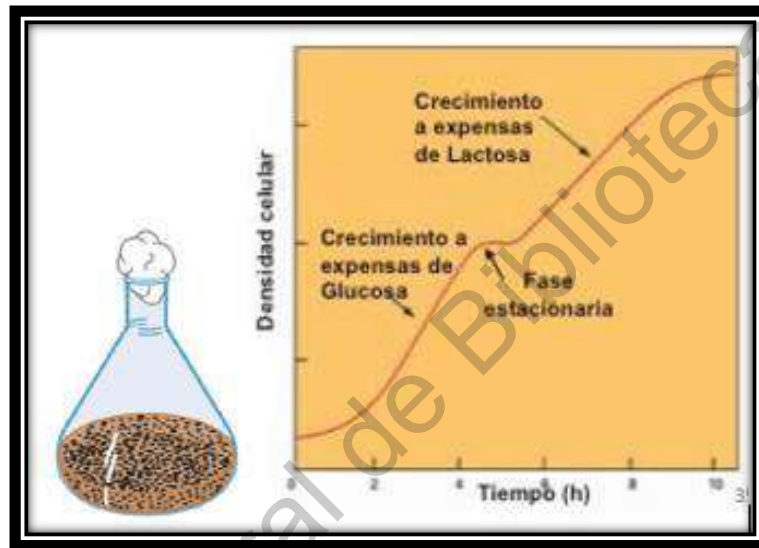


Figura 201. Sistema de cultivo cerrado, (Madigan, 20015).

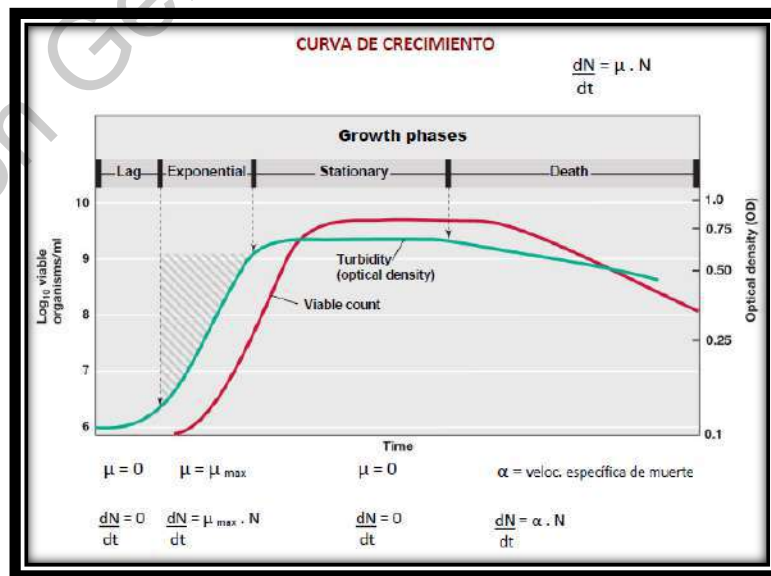


Figura 202. Curva típica de crecimiento en un sistema cerrado, (Madigan, 2015).

En un sistema de cultivo continuo (Figura 203), El medio se renueva y su composición no cambia a lo largo del tiempo, lo que permite mantener el crecimiento de la población de forma indefinida (una vez alcanzado el estado de equilibrio).

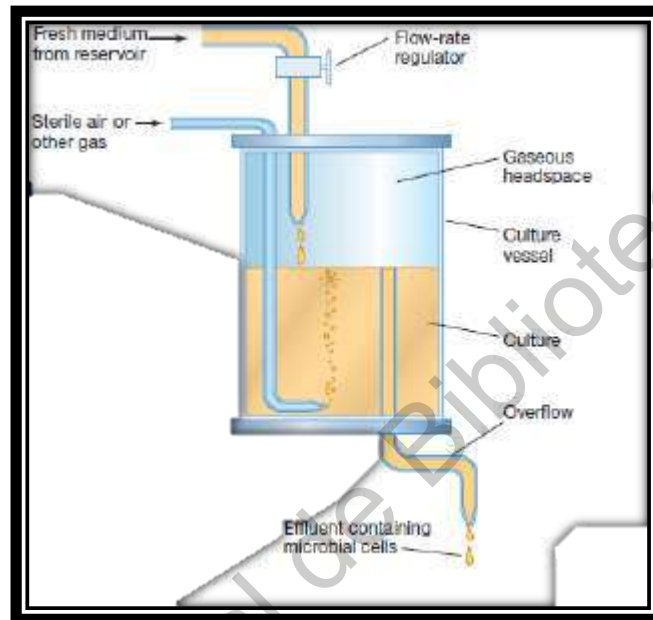


Figura 203. Sistema de cultivo continuo, (Madigan, 2015).

7.5 Factores ambientales.

El crecimiento de los microorganismos está influenciado por los factores ambientales, los cuales determinan la distribución de los microorganismos en la naturaleza y a su vez permiten controlar sus actividades. Los principales factores que afectan al crecimiento bacteriano son: Temperatura (Figura 204 y 205), pH (Figura 206, cuadro 31), Disponibilidad de agua (Cuadro 32) y presión osmótica (Figura 208) y Oxígeno; otros factores pueden ser: presión hidrostática y radiaciones, (Lehninger, 2005).

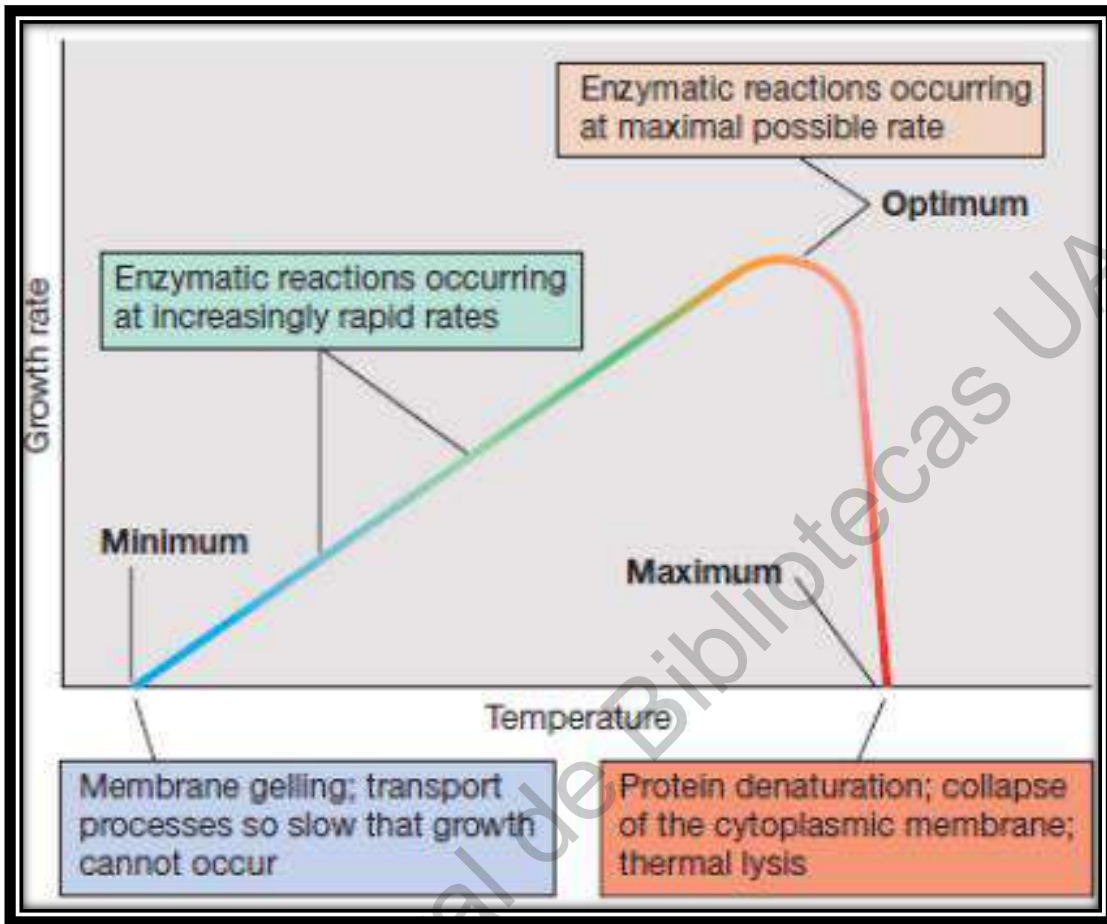


Figura 204. Efecto de la temperatura en el crecimiento celular. La temperatura mínima es la temperatura más baja por la cual ya no hay crecimiento. Por el contrario, la temperatura máxima es la mayor temperatura a la cual ya no hay crecimiento, y la temperatura óptima es la ideal para mayor crecimiento, (Lehninger, 2005).

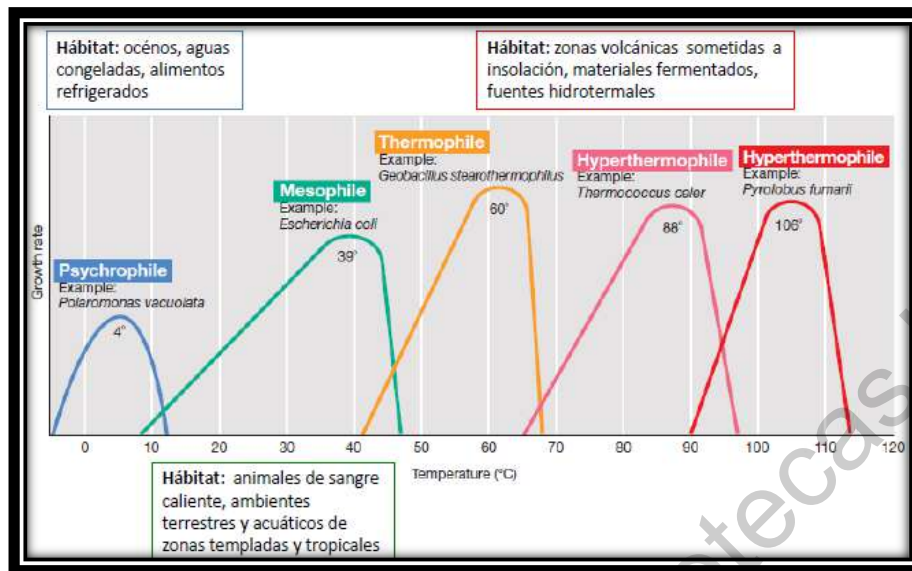


Figura 205. Clases de microorganismos en relación a la temperatura óptima, (Lehninger, 2005).

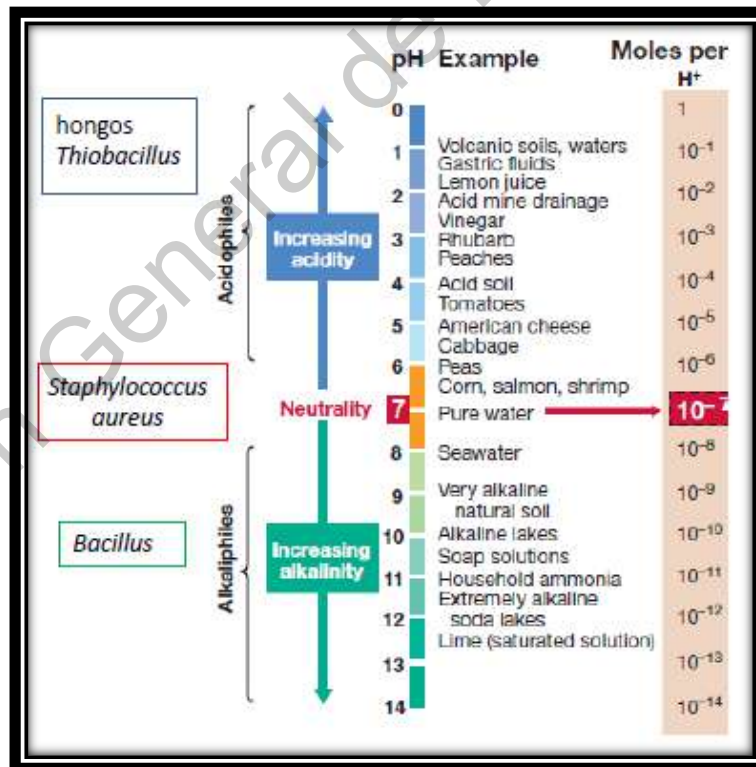


Figura 206. El pH en el crecimiento microbiano. Ejemplos de diversos ambientes con variación en el pH y los microorganismos que pueden crecer en ellos, (Lehninger, 2005).

Cuadro 31. Relación entre los microorganismos y el pH, (Lehninger, 2005).

Physiological class (optima range)	Approximate pH optimum for growth	Example organism ^a
Neutrophile (pH >5.5 and <8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidophile (pH <5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alkaliphile (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

^a *Picrophilus* and *Natronobacterium* are Archaea; all others are Bacteria.

El agua libre se mide por la actividad de agua a_w cuyos valores oscilan entre 0 y 1.

$$a_w = P_s / P_w$$

P_s = presión parcial de vapor de agua en la solución problema
 P_w = presión parcial de vapor de agua destilada

a_w puede disminuir por interacciones con moléculas de soluto (efecto osmótico). El agua difunde de regiones de alta concentración de agua a las de baja concentración. Hay ambientes hipertónicos (a_w baja) o hipotónicos (a_w alta), (Lehninger, 2005).

Cuadro 32. Actividad del agua para diferentes sustancias, (Lehninger, 2005).

Water activity (a_w)	Material	Example organisms ^a
1.000	Pure water	<i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0.995	Human blood	<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i>
0.980	Seawater	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
0.950	Bread	Most gram-positive rods
0.900	Maple syrup, ham	Gram-positive cocci such as <i>Staphylococcus</i>
0.850	Salami	<i>Saccharomyces rouxi</i> (yeast)
0.800	Fruit cake, jams	<i>Saccharomyces bailii</i> , <i>Penicillium</i> (fungus)
0.750	Salt lakes, salted fish	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
0.700	Cereals, candy, dried fruit	<i>Xeromyces bisporus</i> and other xerophilic fungi

^a Selected examples of prokaryotes or fungi capable of growth in culture media adjusted to the stated water activity.

A menor valor de a_w más dificultad tienen las bacterias para sobrevivir.

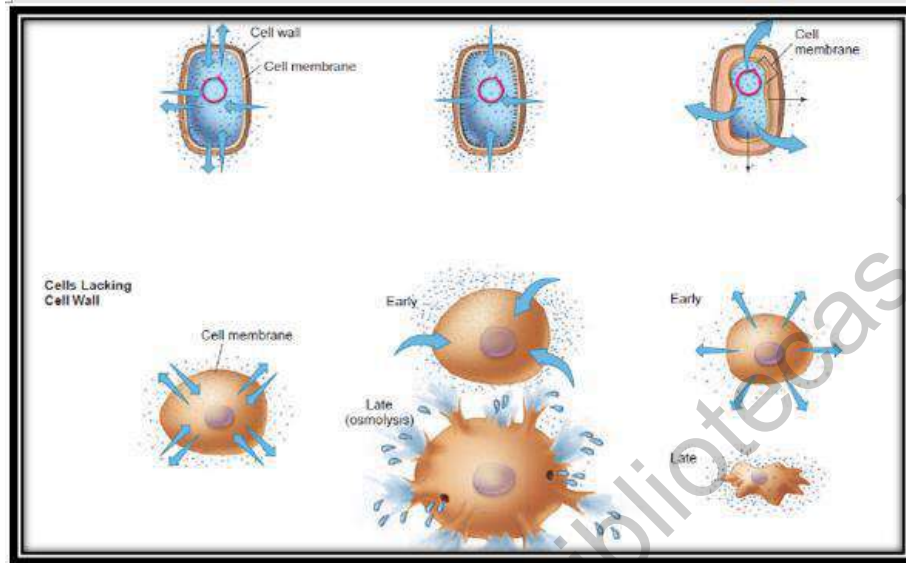


Figura 207. Efecto de soluciones (Isotónica, Hipotónica e Hipertónica) sobre la pared celular de las bacterias, (Lehninger, 2005).

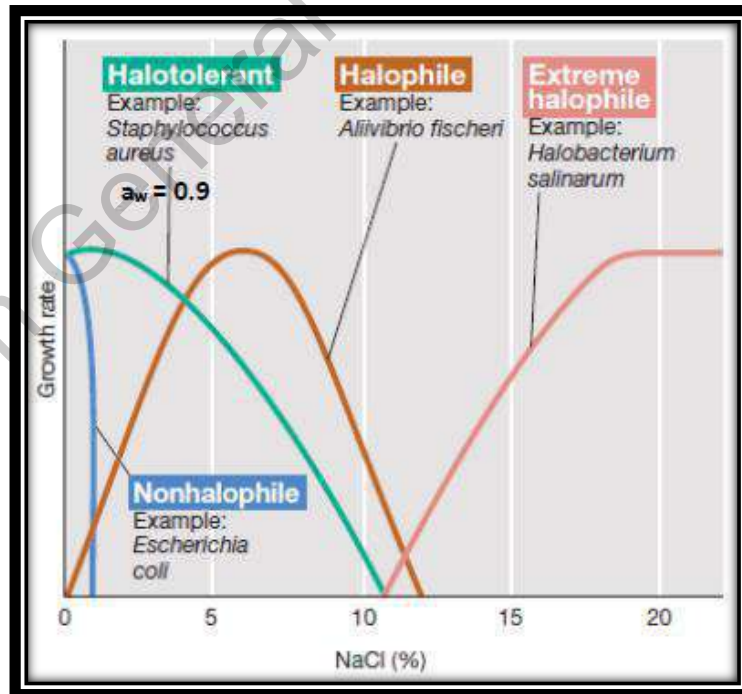


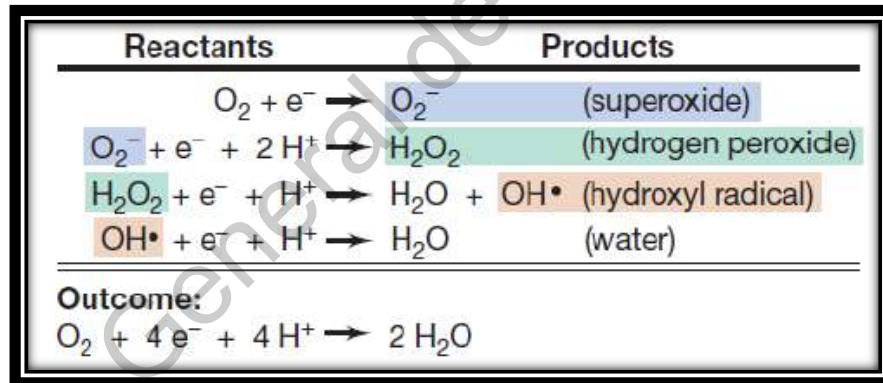
Figura 208. Efectos de la presión osmótica y la disponibilidad del agua en los microorganismos, (Lehninger, 2005).

-Aerobios: requieren oxígeno para vivir. Pueden ser aerobios estrictos o microaerófilos.

-Anaerobios: no requieren oxígeno para vivir. Existen anaerobios estrictos o anaerobios aerotolerantes.

-Microorganismos facultativos: pueden vivir con o sin oxígeno.

El oxígeno es un potente oxidante y es el mejor aceptor de electrones para la respiración (Cuadro 33), pero puede ser letal para las bacterias y a que durante el proceso de reducción hasta agua se generan formas tóxicas (radical superóxido y peróxido de hidrógeno). Las flavoproteínas, quinonas y hierro-sulfoproteínas, pueden también catalizar la reducción de oxígeno a superóxido, aunque no haya respiración aeróbica. Estos productos oxidan los compuestos orgánicos celulares, incluyendo las macromoléculas, (Lehninger, 2005).



Cuadro 33. Efecto del oxígeno sobre el crecimiento bacteriano, (Lehninger, 2005).

Group	Relationship to O ₂	Type of metabolism	Example ^a	Habitat ^b
Aerobes				
Obligate	Required	Aerobic respiration	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Skin, dust
Facultative	Not required, but growth better with O ₂	Aerobic respiration, anaerobic respiration, fermentation	<i>Escherichia coli</i> (B)	Mammalian large intestine
Microaerophilic	Required but at levels lower than atmospheric	Aerobic respiration	<i>Spirillum volutans</i> (B)	Lake water
Anaerobes				
Aerotolerant	Not required, and growth no better when O ₂ present	Fermentation	<i>Streptococcus pyogenes</i> (G)	Upper respiratory tract
Obligate	Harmful or lethal	Fermentation or anaerobic respiration	<i>Methanobacterium formicicum</i> (A)	Sewage sludge, anoxic lake sediments

8. APLICACIONES ADICIONALES DEL METABOLISMO MICROBIANO

8.1 Metagenómica y biotecnología.

La definición esencial de la metagenómica es el análisis de ADN genómico a partir de toda una comunidad (Figura 209), lo que difiere de la genómica, que es el análisis de ADN genómico de un organismo o célula individual (Figura 210). En el sentido estricto, meta proviene del griego “más allá”, de ahí que el término significa literalmente “más allá del estudio del genoma” (Gilbert, 2011).

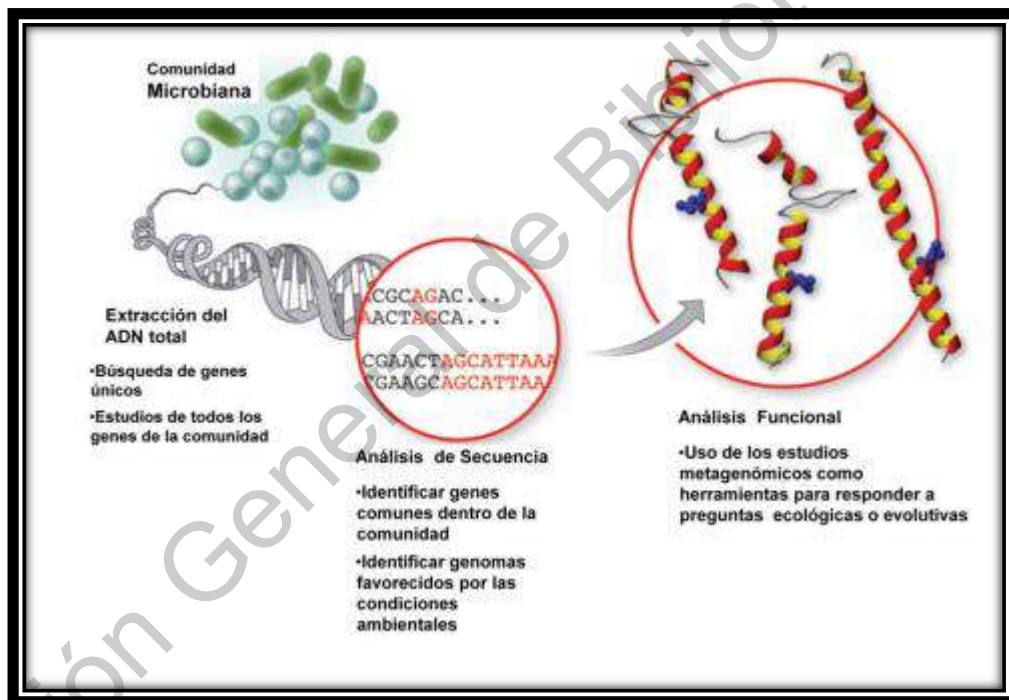


Figura 209. Aplicaciones de la metagenómica, (Gilbert, 2011).

Busca satisfacer las demandas biotecnológicas industriales mediante la aplicación de nuevas enzimas y biomoléculas de interés (Wilson, 2013) (Cuadro 34).

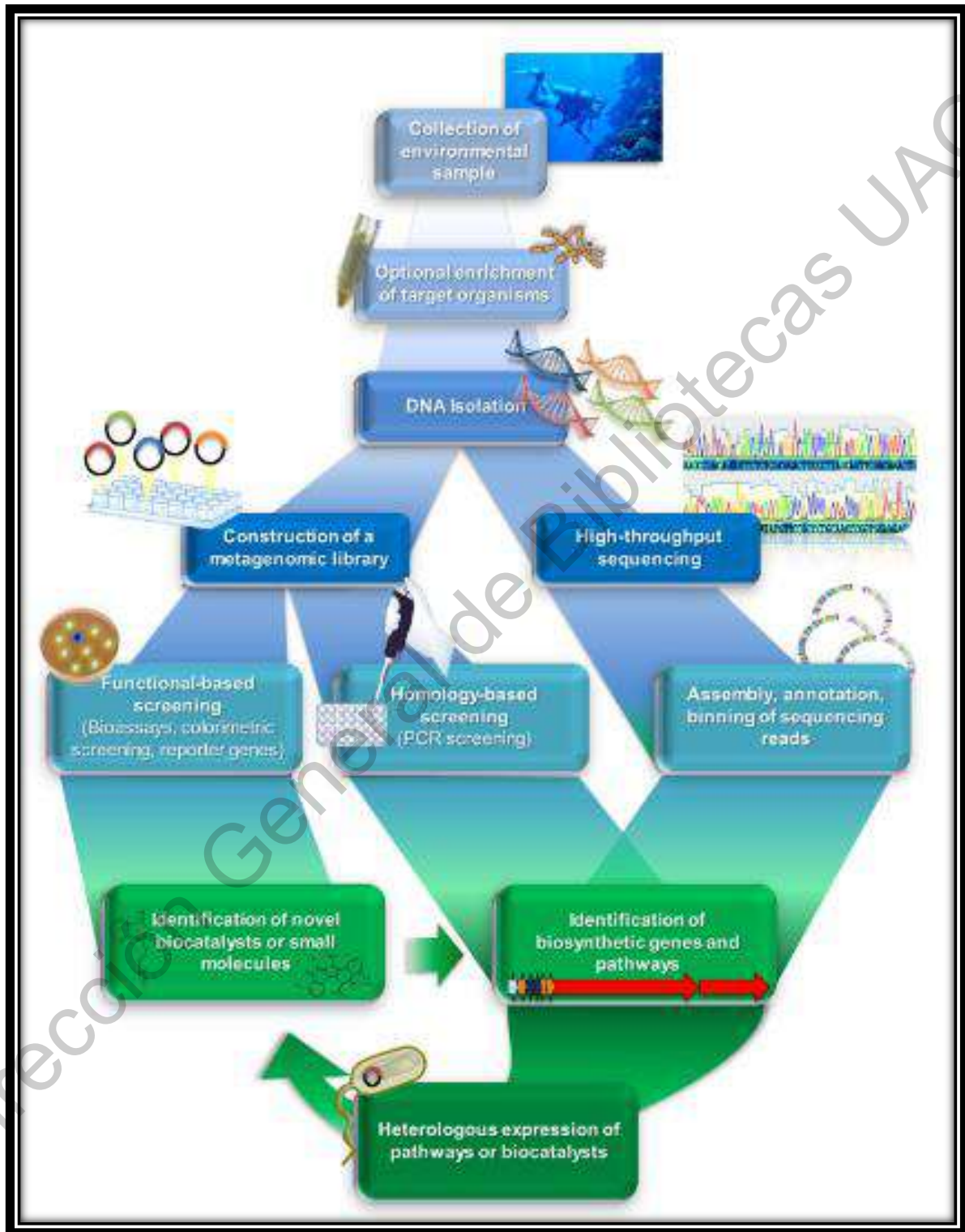


Figura 210. Flujo de trabajo general de estudio metagenómico, (Wilson, 2013).

Cuadro 34. Trabajos relevantes sobre actividades biológicas encontradas en bibliotecas metagenómicas de suelos, (Hernández-León, 2010).

Tabla 1. Trabajos relevantes sobre actividades biológicas encontradas en bibliotecas metagenómicas de suelos.
Table 1. Major research works on biological activities found in metagenomics soil libraries.

Descripción del suelo	Tipo de vector/Huésped	Actividad biológica encontrada	Referencia
Suelo de Madison, Wisconsin	pBeloBAC11/ <i>E. coli</i>	Lipasa, Amilasa, ADNasa, Hemolítica	Rondon et al., 2000
Suelo de Madison, Wisconsin	pBeloBAC11/ <i>E. coli</i>	Antibacteriana de amplio espectro	Gillespie et al., 2002
Suelo de bosque	<i>E. coli</i>	Celulasa	Wang et al., 2009
Suelo	pJWC1/ <i>R. metallidurans</i>	Antibacteriana	Craig et al., 2009
Suelo	<i>Streptomyces lividans</i>	Nuevos metabolitos	Wang et al., 2000
Suelo	Cósmido/ <i>E. coli</i>	Antimicrobiana	Brady et al., 2000
Suelo	pEpiFOS-5/ <i>E. coli</i>	Lipolítica	Lee et al., 2004

La metagenómica ha transformado la forma en que los microbiólogos enfrentan muchos problemas de la actualidad. Con el desarrollo de análisis funcionales se ha logrado identificar nuevas enzimas (Figura 211), antibióticos y otras moléculas de interés en las bibliotecas de diversos ambientes, facilitando un mayor alcance en el descubrimiento de nuevos genes, los cuales nos brindan una idea sobre la estructura en las comunidades microbianas y su función. El potencial de aplicación para la metagenómica en la biotecnología parece no tener fin. Estudios desarrollados desde su aparición han permitido encontrar respuesta para muchos problemas en diversas áreas, como en medicina, agricultura, la industria, biorremediación o los biocombustibles (Lorenz, 2005). Es precisamente en el área de la biotecnología ambiental, donde estudios en metagenómica han logrado múltiples aplicaciones y avances en disciplinas como la biorremediación y los biocombustibles.

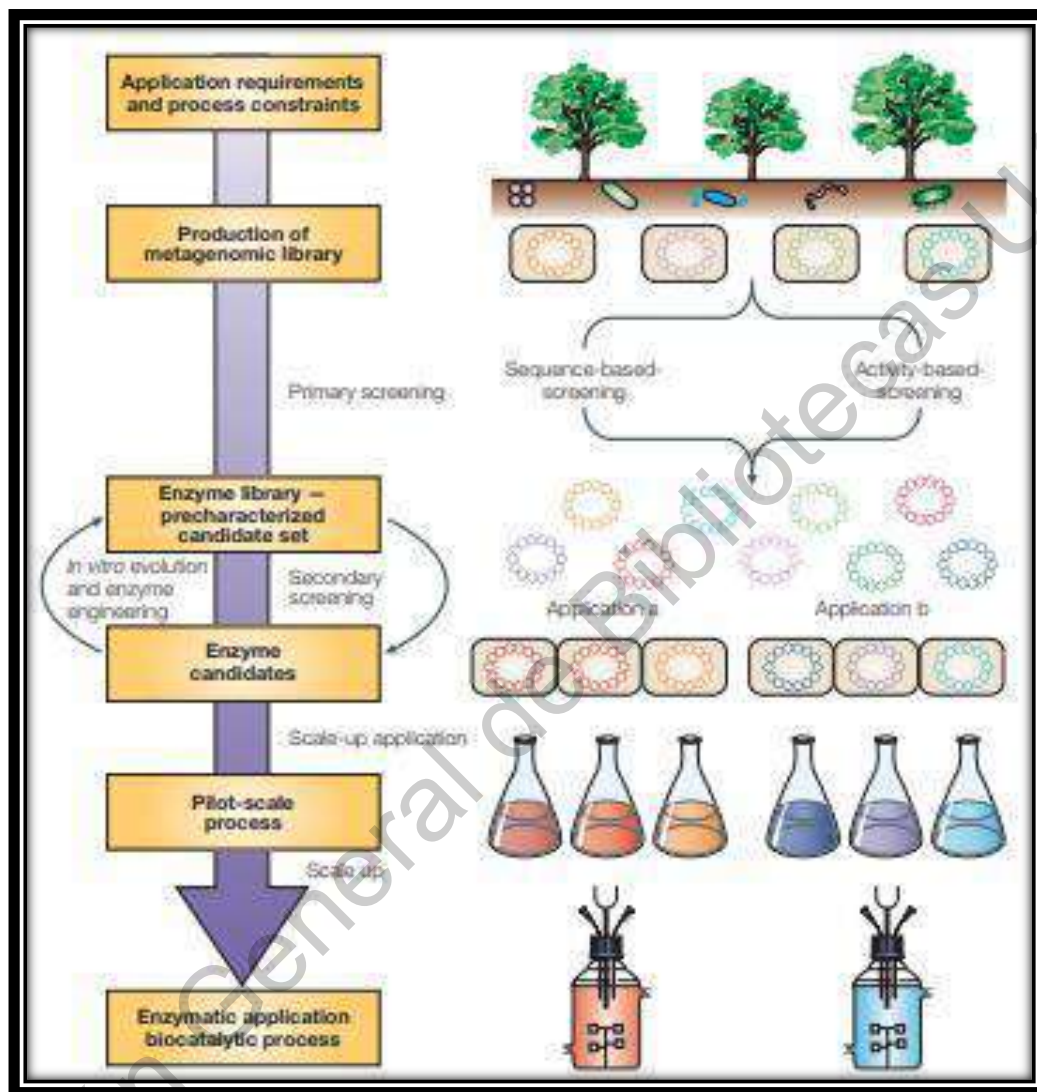


Figura 211. Enzimas industriales obtenidas del metagenoma, para aplicaciones y procesos industriales (Lorenz, 2005).

8.2 Ecofisiología microbiana.

El objetivo principal de la ecofisiología microbiana es entender la estructura y la función de una comunidad microbiana a detalle y las interacciones entre los microorganismos y su entorno en diversos nichos ambientales. La metagenómica

representa un concepto estratégico que incluye investigaciones en tres grandes niveles interconectados (procesamiento de la muestra, la secuenciación del ADN y el análisis funcional), con un objetivo final de obtener una visión integral del funcionamiento de las comunidades microbianas en todos los ecosistemas (Figura 212), que nos permitan responder a las preguntas: ¿Quién está allí? y ¿Qué están haciendo?

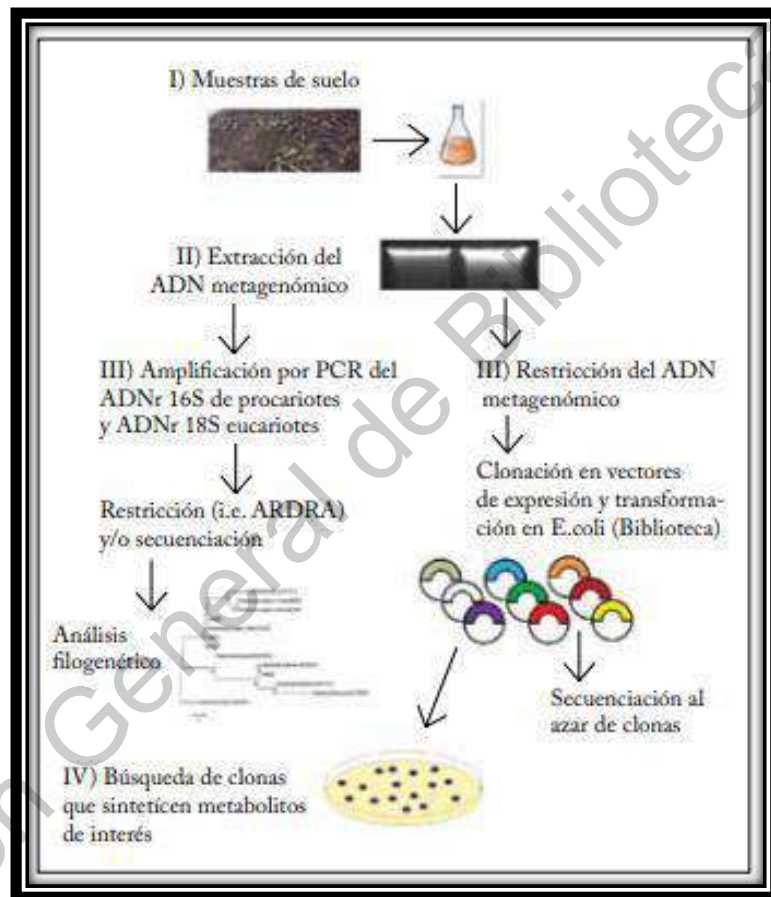


Figura 212. Diagrama de flujo del análisis del metagenoma de una muestra de suelo en laboratorio, (Hernández-León, 2010).

La metagenómica tiene una amplia incidencia en estudios ecológicos de regiones poco comunes (Figura 232). Un ejemplo es el estudio de diversidad microbiana realizado en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México (CC). CC es un conjunto de 300 pozas de agua salada en el desierto de Chihuahua, muchas de ellas termales (30-

40°C) y algunas ricas en sales, pero pobres en nutrientes (oligotrófico) con condiciones ambientales semejantes a la tierra primitiva. Mediante el uso de metagenómica se descubrió que la diversidad acuática comparable con la localizada en comunidades rizosféricas, las cuales son de las más diversas del planeta. Se destacan las comunidades formadoras de estromatolitos (cianobacterias), son la base de la cadena trófica (Peimbert, 2012).

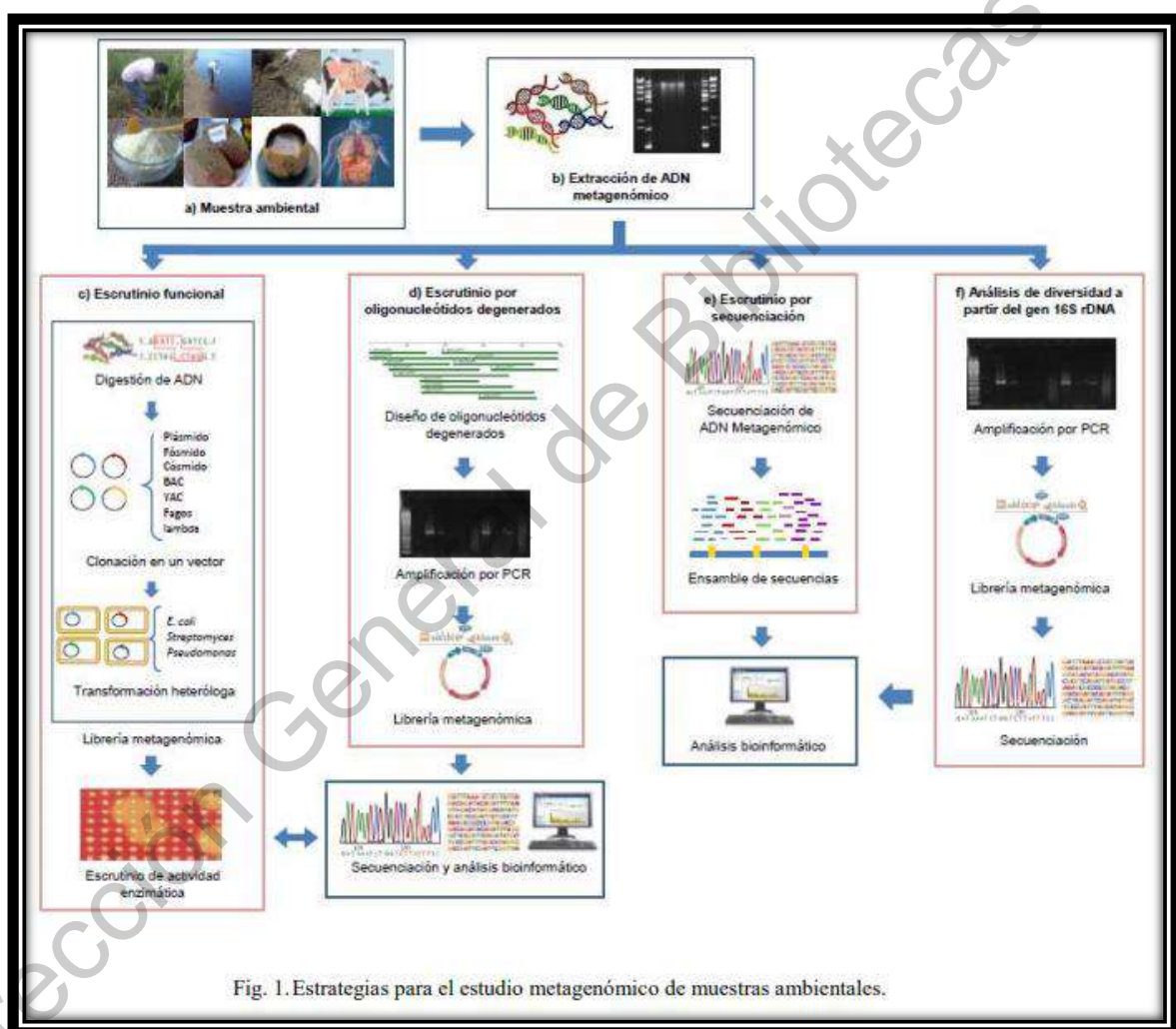


Fig. 1. Estrategias para el estudio metagenómico de muestras ambientales.

Figura 213. Estrategias para el estudio metagenómico de muestras ambientales. (Cortes-López, 2014).

8.3 Organismos no cultivables.

Los métodos clásicos de cultivo sólo permiten recuperar entre el 0.1 y el 10% de los microorganismos ambientales (microorganismos cultivables). Lo anterior se debe a que se desconocen los requerimientos nutricionales necesarios de todos ellos, las condiciones fisicoquímicas precisas de su ambiente natural y la información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que se mantienen en una comunidad microbiana. Debido a esta problemática, se han buscado metodologías alternativas para determinar la diversidad de una población que no dependan del cultivo de microorganismos sino del estudio y análisis de su información genética. Un método pionero fue el análisis del gen 16S mediante el uso de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y de técnicas electroforéticas como DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización), ARDRA (Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado), RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), RADP (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), entre otras.

La principal tarea de la metagenómica basado en la secuenciación es reconstruir el metabolismo de los organismos que componen la comunidad y predecir sus roles funcionales en el ecosistema (Figura 214), mediante las llamadas etiquetas de genes ambientales, es decir, fragmentos de genes que codifican dominios conservados o motivos de familias de proteínas, (Handelsman, 2014).

8.4 Sistema de metagenómica y selección

La metagenómica se emplea como medio sistemático para investigar, clasificar y manipular todo el material genético aislado a partir de muestras ambientales. Este es un proceso de múltiples etapas, del cual depende la eficacia de cinco principales pasos. El procedimiento (Figura 215) consiste en: (1) la selección de un nicho ambiental, (2) el aislamiento del material genético directamente de la muestra ambiental, (3) la manipulación del material genético, (4) la construcción de una

librería, y (5) el análisis del material genético en la librería creada para el metagenoma (Wilson, 2013).

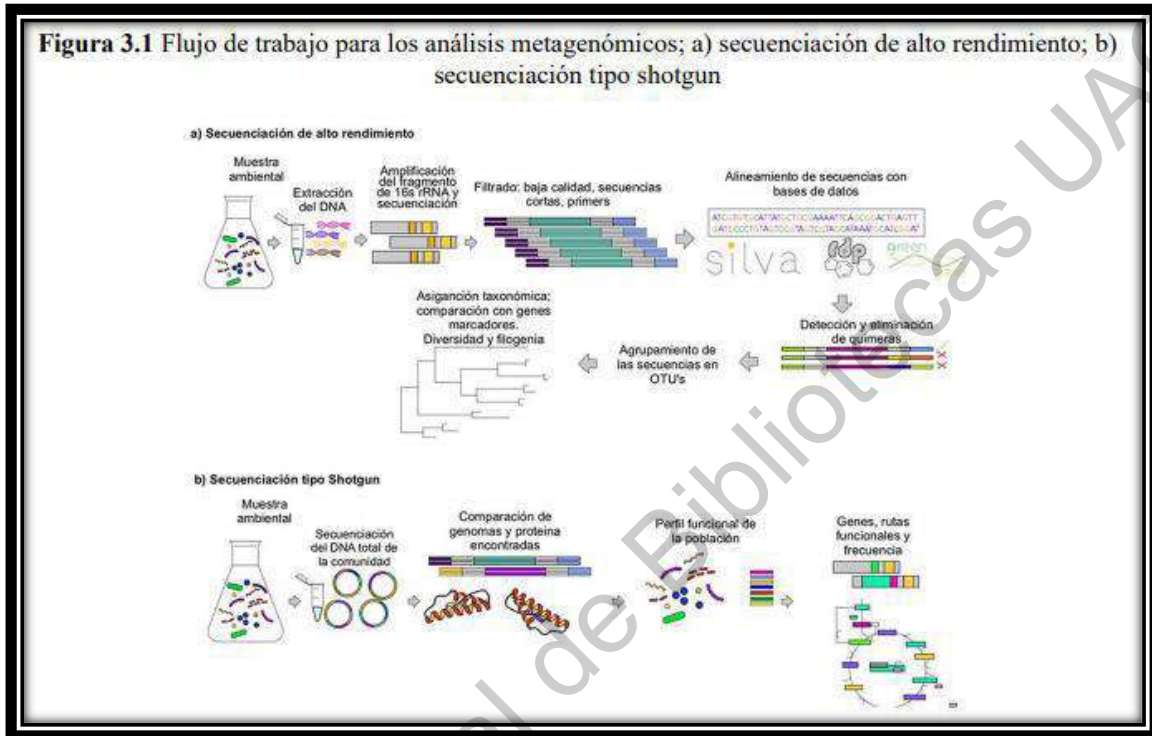


Figura 215. Flujo de trabajo para los análisis metagenómicos; a) secuenciación de alto rendimiento; b) secuenciación tipo shotgun, (Cortes-López, 2014).

Estos estudios buscan principalmente caracterizar la estructura taxonómica de una comunidad microbiana, ya sea mediante el empleo de un gen marcador, como lo es el 16S ARNr o mediante el uso de la secuenciación aleatoria. La secuenciación aleatoria para un metagenoma puede ser dividida en dos grupos técnicamente distintos (Cuadro 35). Por un lado, la metodología basada en la clonación utilizando vectores, tales como fósmidos, cósmidos y los cromosomas bacterianos artificiales, adecuados para la clonación de insertos de gran tamaño (10-100 Kpb), o el uso de vectores plasmídicos para insertos pequeños (< 5 Kpb), la secuenciación directa basada en las tecnologías de secuenciación de siguiente generación, las cuales renuncian a las estrategias tradicionales de clonación para el aislamiento del ADN,

basándose en cambio, en la fragmentación y captura de ADN a través de diversas estrategias de ligación (Gilbert, 2011).

Cuadro 35. Comparación de métodos de secuenciación, (Hernández-León, 2010).

Tabla 1. Comparación de los métodos de secuenciación de siguiente generación y sus características (Masoudi-Nejad *et al.*, 2013)

Plataforma	Longitud de lectura (nucleótidos)	No. de secuencias	Resultados (Gb)	No. de muestras	Tiempo de corrida	Ventajas	Desventajas
Roche 454 GS FLX+	700	1×10^6	0.7	192	23 h	Corto tiempo de corrida	Costoso
Illumina HiSeq2000	100	3×10^8	600	384	11 días	Alto rendimiento	Limitado número de etiquetas
Life technologies SOLiD 5500xl	75	15×10^6	180	1,152	14 días	Corrección de errores	Lecturas cortas
Roche 454 GS Junior	400	1×10^7	0.035	132	9 h	Lecturas largas	Costoso
Illumina MiSeq	150	5×10^6	15	96	27 h	Corto tiempo de corrida, sencillo de usar	Costoso por pares de bases
Ion torrent PGM ion 316 chip	>100	1×10^6	0.1	16	2 h	Corto tiempo de corrida, bajo costo de reactivos	No bien evaluado
Helicos biosciences HeliScope	35	1×10^5	35	4,800	8 días	SSM, secuencias de ARN	Alta tasa de errores
Pacific biosciences PacBios RS	>1,000	1×10^5	0.1	1	90 min	SSM, corto tiempo de corrida	Alta tasa de errores, baja productividad

SSM = Secuenciación de una sola molécula

8.5 Principios de ingeniería metabólica

El principal objetivo de la ingeniería metabólica es el control del flujo metabólico, éste se define como la tasa a la que el material se convierte vía reacciones y rutas metabólicas. Para ello debemos comprender los factores que influyen en el flujo y conocer el metabolismo microbiano, para poder alterar el genotipo de la célula en la esperanza de lograr el fenotipo deseado. Algunos de los objetivos que se pretenden alcanzar al modificar un genotipo son:

1. Aumentar la producción de metabolitos demasiado caros de obtener por síntesis química o para introducir una nueva capacidad.
2. Organismos con nuevas capacidades catabólicas, de gran interés en aplicaciones ambientales o en microorganismos industriales que puedan

crecer usando sustratos diferentes y más baratos para la obtención de vitaminas, aminoácidos, antibióticos, etc.

3. Propiedades celulares que sean beneficiosas en el proceso industrial: evitación de productos tóxicos como el acetato y desvío hacia productos menos tóxicos (etanol, acetolactato). *Escherichia coli* con compuestos portadores de oxígeno, lo que le permite mejorar en condiciones de limitación de oxígeno.

La ingeniería metabólica busca el mejoramiento de la actividad celular mediante la manipulación del metabolismo, utilizando la tecnología del ADN recombinante (Bailey, 1991).

8.5.1 Ejemplos de aplicación de la ingeniería metabólica

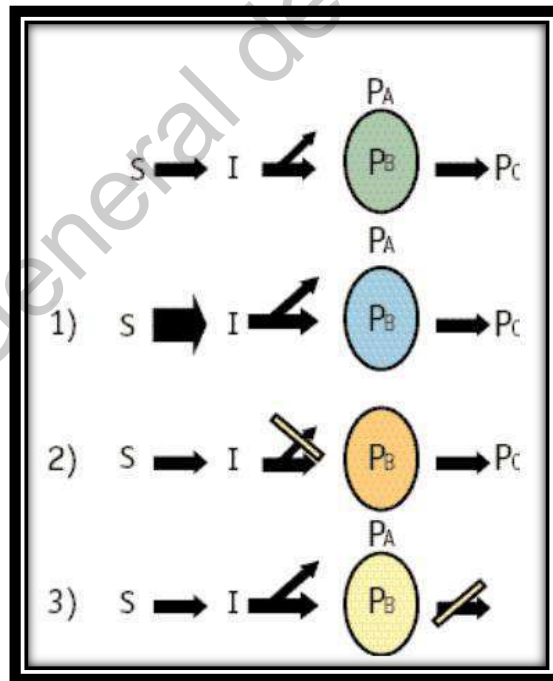


Figura 216. Estrategias para aumentar la acumulación de carbono en un producto determinado. El sustrato S da lugar al intermediario I que es común para la síntesis de PA y PB. PB está sujeto, además, a otra modificación para formar PC. Existen tres posibilidades para incrementar la formación de PB: 1) aumentar el flujo de S en toda

la vía, 2) bloquear el paso que conduce a la formación de P_A, y 3) bloquear el paso que lleva a la formación de P_C, (Vázquez, 2004).

La forma más evidente para incrementar el nivel de actividad de una enzima es aumentar varias veces la cantidad de la misma, para que ocurra una catálisis continua. No obstante, algunos factores que deben conocerse antes de iniciar esta empresa incluyen la arquitectura de la ruta metabólica, el tipo de regulación que opera sobre las enzimas que participan, y su distribución en el interior de la célula y a través de los diferentes tejidos de la planta.

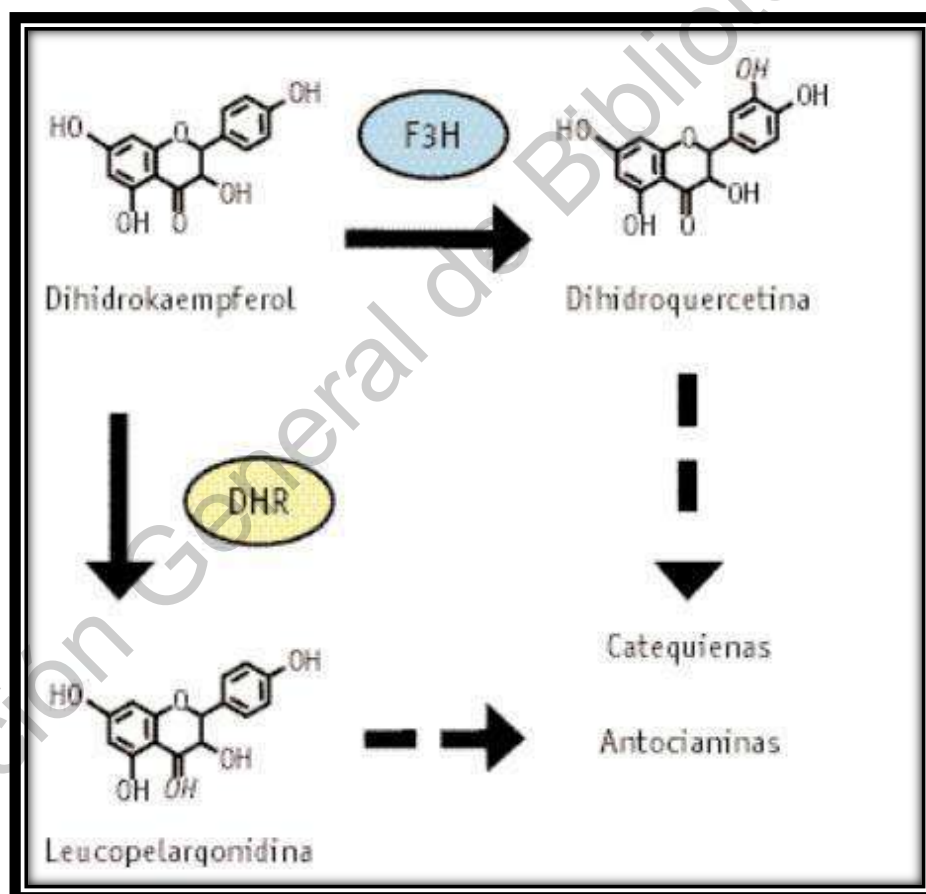


Figura 217. Un mismo intermediario (dihidrokaempferol) puede dar lugar a dos tipos de productos diferentes: antocianinas, vía leucopelarqonidina, o catequinas, vía dihidroquercetina, dependiendo de la eficiencia de las enzimas que lo utilizan: DHR, dihidrokaempferol 4-reductasa; F3H, flavonol 3'-hidroxilasa, (Vázquez, 2004).

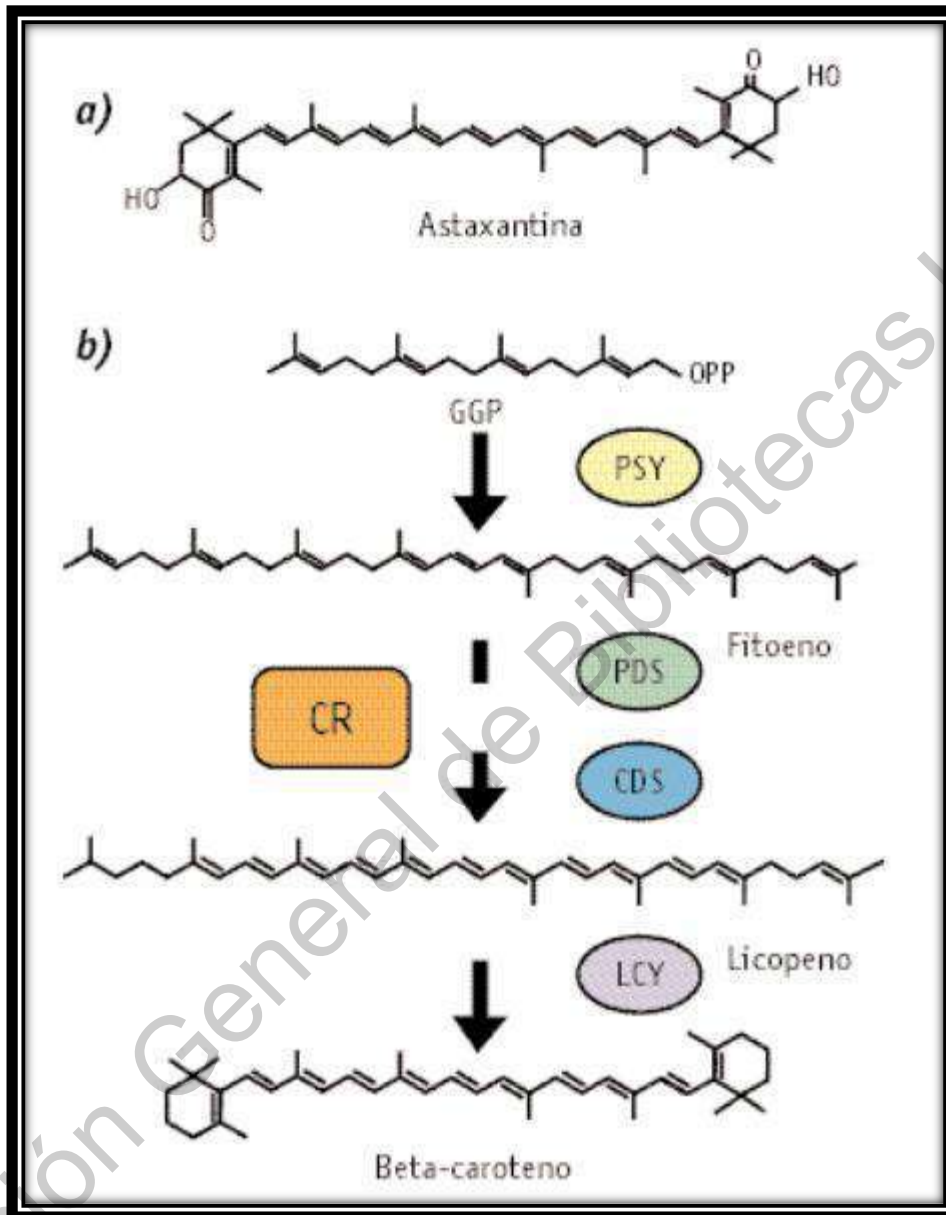


Figura 217. La síntesis de flavonoides es un ejemplo del éxito de la ingeniería metabólica, dado el profundo conocimiento que se tiene de esta vía, (Vázquez, 2004).

Los carotenoides son compuestos derivados del pirofosfato de isopentenilo que se producen en los plásticos. Dan color a los frutos y funcionan como pigmentos auxiliares en la fotosíntesis. Sus rutas de síntesis se conocen ampliamente, y por ello se encuentran entre los blancos de la ingeniería metabólica (Figura 218-220).

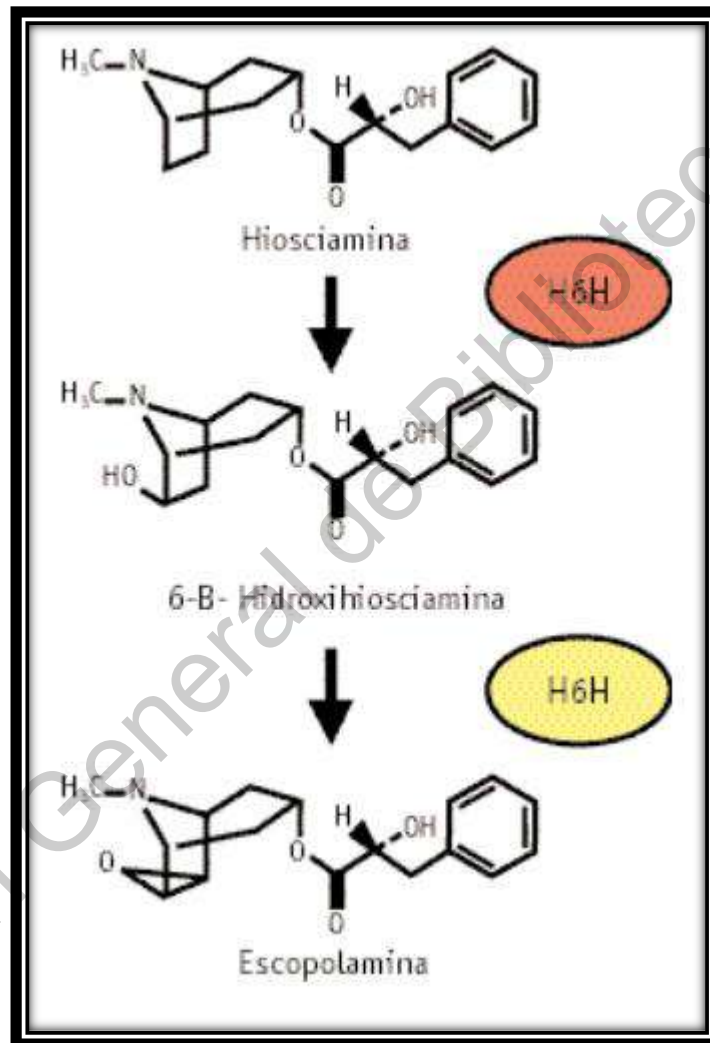


Figura 219. Transformación de la hiosciamina en escopolamina, (Vázquez, 2004).

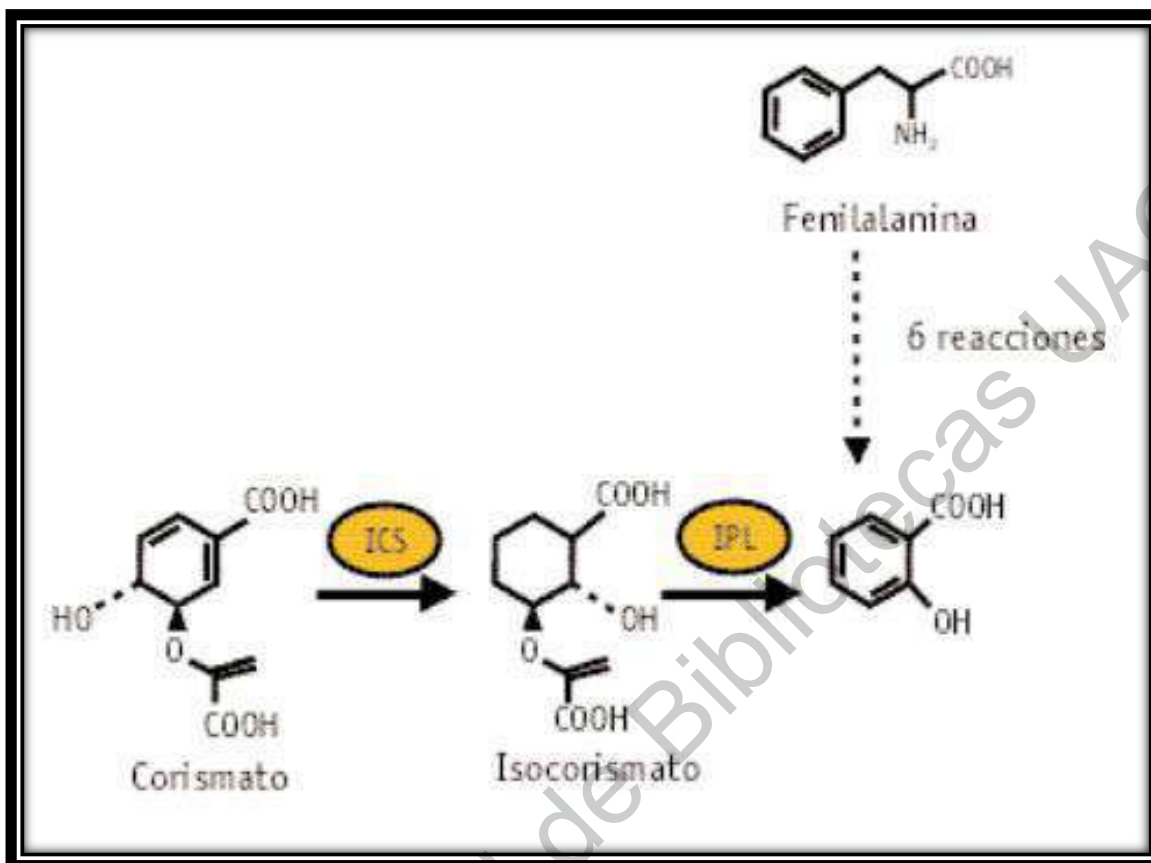


Figura 220. Síntesis de ácido Salicílico a partir de fenilalanina, requiere de 6 reacciones en plantas mientras que en bacterias sólo 2, (Vázquez, 2004).

9. HERRAMIENTAS VIRTUALES

Las tecnologías de la información sin duda alguna han revolucionado la forma de enseñar y aprender. En medio de una crisis sanitaria como la que el mundo atraviesa por la pandemia generada por el COVID-19, usar las herramientas digitales para la enseñanza se convirtió en una necesidad apremiante. Estas herramientas son diversas, en las más innovadoras tenemos los laboratorios virtuales, que permiten recrear las prácticas de laboratorio a través de experiencias en realidad virtual, también existen los videos educativos a través de plataformas como YouTube, dando la oportunidad a presenciar virtualmente Congresos de todo el mundo en tiempo real. Con el uso de los dispositivos inteligentes el desarrollo de las Apps (Aplicaciones)

para la ciencia también ha tenido auge. Y los cursos en línea a través de plataformas especializadas son cada vez más frecuentes. A continuación, se recomiendan las siguientes herramientas virtuales para complementar el aprendizaje sea éste presencial o virtual.

9.1 Laboratorios Virtuales

PhET ofrece simulaciones divertidas, gratuitas e interactivas de ciencias y matemáticas que se basan en la investigación (Figura 221). Las simulaciones funcionan con Java, Flash o HTML5 y se pueden ejecutar en línea o descargar en un computador. Todas las simulaciones tienen código abierto.

URL: <https://phet.colorado.edu/>

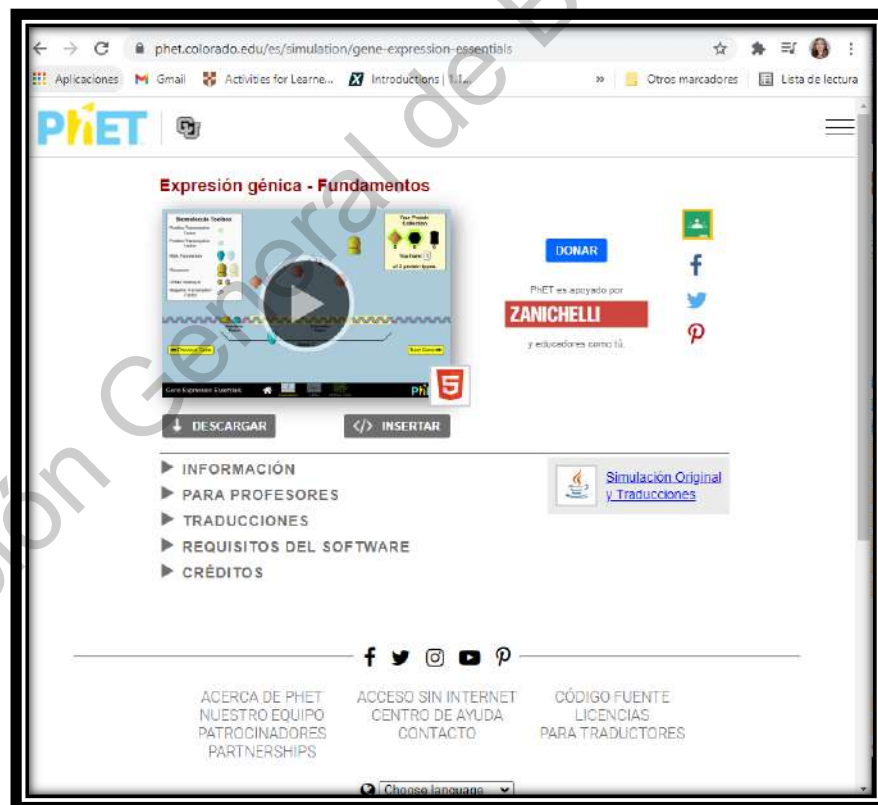


Figura 221. Laboratorio virtual de Expresión génica de PhET. Es un ejemplo de simulador o laboratorio virtual. URL: <https://phet.colorado.edu/es/simulation/gene-expression-essentials>

Biovlab provee acceso remoto a varios laboratorios de diferentes ciencias e ingenierías incluyendo de biotecnología, además contiene recursos como video lecturas animaciones y autoevaluaciones (Figura 222-224). Para acceder basta con ingresar a la siguiente liga:

URL: <https://www.vlab.co.in/broad-area-biotechnology-and-biomedical-engineering>

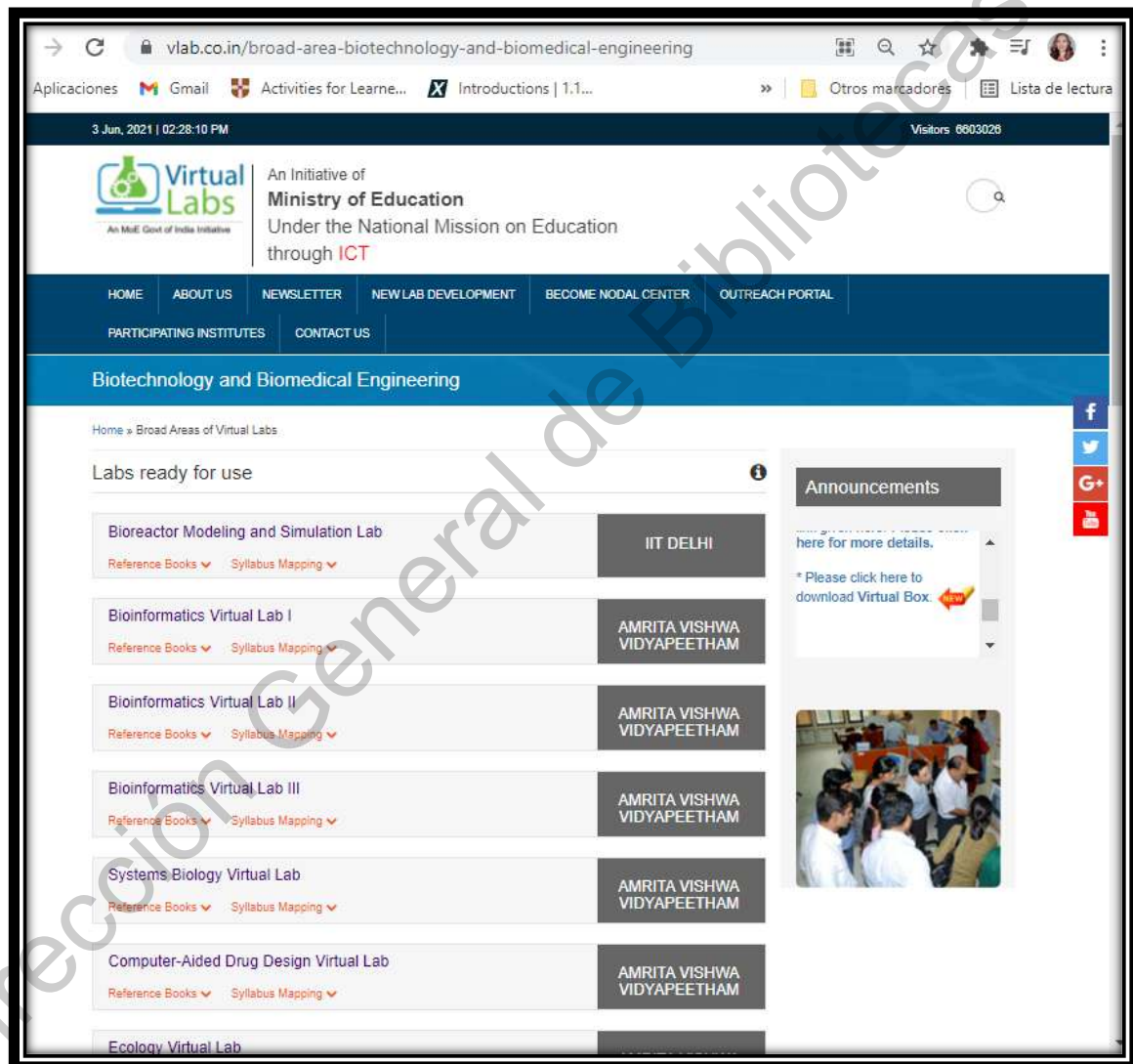


Figura 222. Virtual Labs. Es una plataforma que compila diferentes laboratorios virtuales especializados. URL:<https://www.vlab.co.in/broad-area-biotechnology-and-biomedical-engineering>

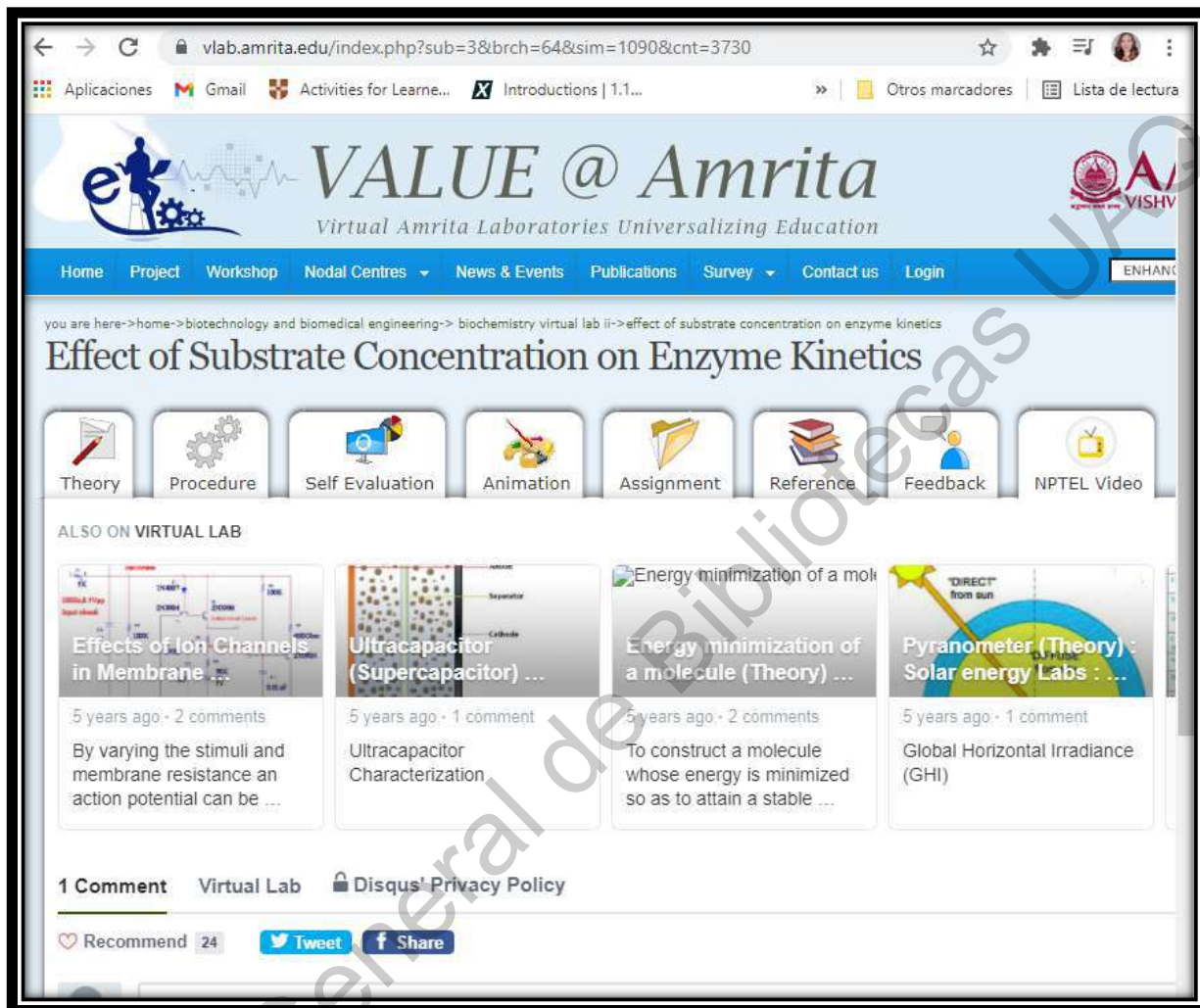


Figura 223. VALUE @ Amrita. Virtual Amrita Laboratories Universalizing Education es un ejemplo de laboratorios virtual de bioquímica, la imagen muestra pestañas de cada actividad para la práctica de laboratorio “Effect of Substrate Concentration on Enzyme Kinetics”.

URL: <https://vlab.amrita.edu/index.php?sub=3&brch=64&sim=1090&cnt=3730>



Figura 224. Lista de experimentos del laboratorio virtual de Biorreactores, Sakshat Virtual lavas del Indian Institute of Technology Delhi. URL: <http://38.100.110.143/model/index.html>

9.2 Canales de YouTube

Microbiology Videos es un canal de animación que explica de manera clara y concisa la microbiología (Figura 225).

URL: https://www.youtube.com/channel/UCD361ecAEjm_DYqNzVp8F7w

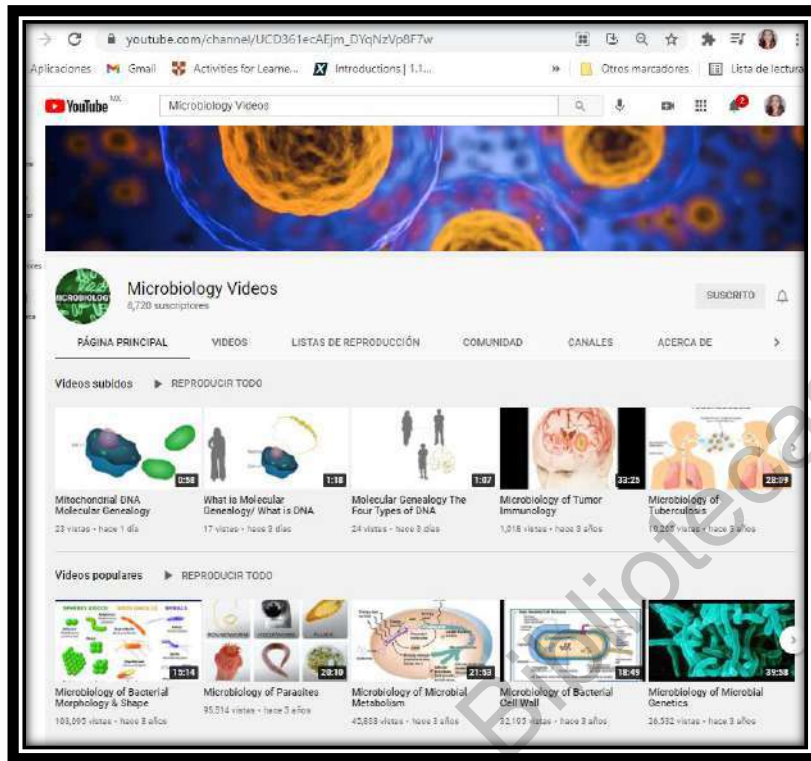


Figura 225. Canal Microbiology Videos.

Khan Academy también cuenta con su canal de YouTube.

URL: <https://www.youtube.com/watch?v=juM2ROSLWfw&t=2s>

9.3 Cursos en línea

El Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT) a través de su plataforma MITOPENCOURSEWARE (Figura 226) ofrece múltiples cursos de Ingeniería biológica.

URL: <https://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/>

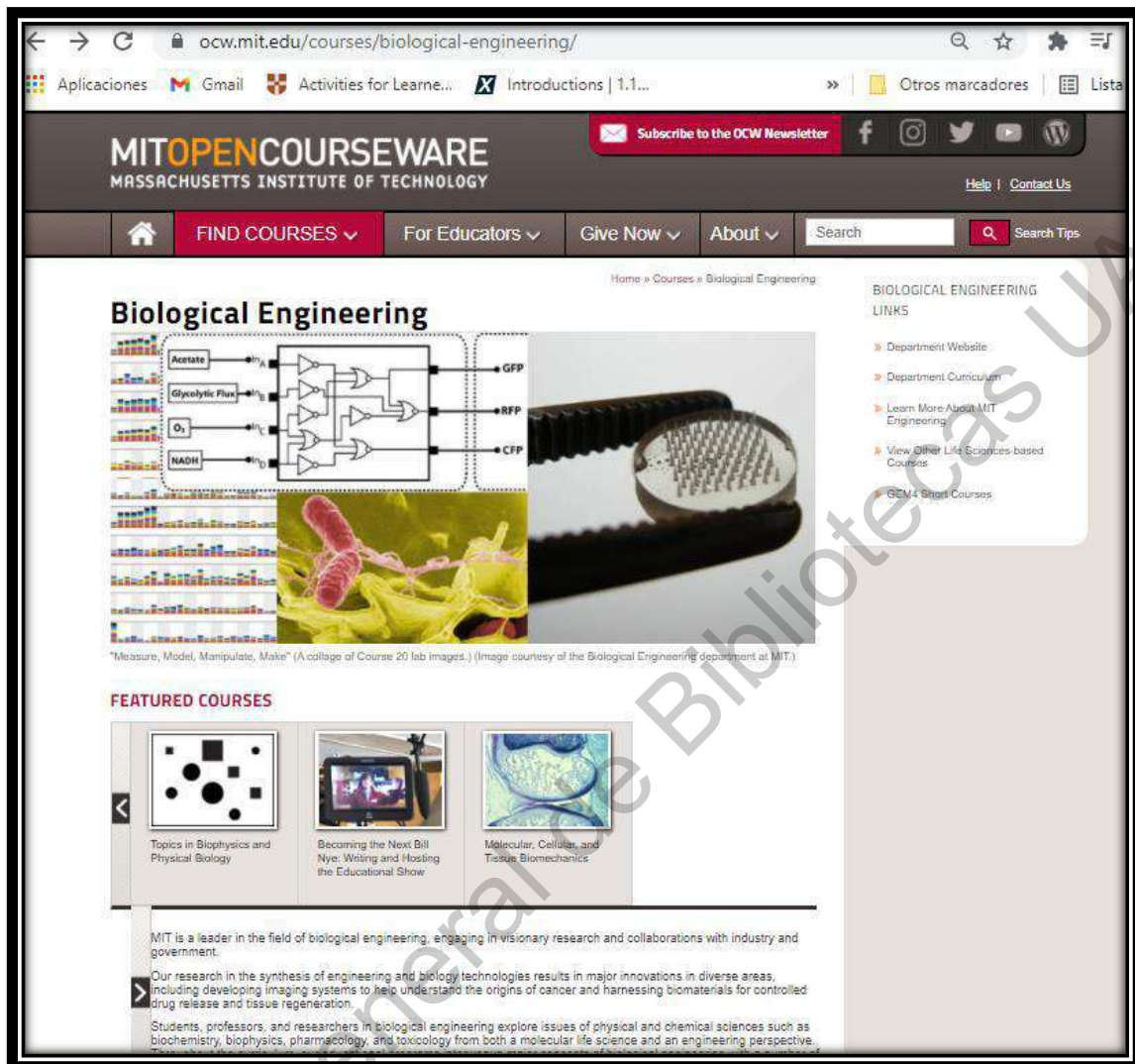


Figura 226. MITOPENCOURSEWARE. Es la plataforma del MIT (Massachusetts Institute of Technology) especializada en cursos de ciencia y tecnología, por ejemplo, Ingeniería biológica. <https://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/>

OpenWetWare es un sitio Web para promover el intercambio de información y conocimientos entre investigadores y grupos que trabajan en biología e ingeniería biológica (Figura 227).

URL: https://openwetware.org/wiki/Main_Page

The screenshot shows a web browser window with the URL `openwetware.org/wiki/BE.180`. The page title is "BE.180 Biological Engineering Programming". The page content includes a navigation menu on the left, a search bar, and a list of announcements. The announcements are as follows:

1. Assignment 5 has been posted [\[1\]](#). It is due at 5p on May 4.
2. Assignment 4 solutions have been posted
3. Assignment 4 has been posted: [BE.180:Assignment4](#). It was due at 5pm on April 25.
4. Rolling Stone article on Asilomar rDNA conference posted [\[1\]](#).
5. Exam 1 solutions posted. Endy 01:08, 4 April 2006 (EDT)
6. Assignment 3 is cancelled; please study the [Devices](#) page and prepare for our in class review on Tuesday. Endy 15:53, 18 March 2006 (EST)
7. Old Announcements: [BE.180:Old Announcements](#)

Figura 227. OpenWetWare ofrece cursos como el de programación para Ingeniería Biológica, a través de una plataforma amigable con el usuario. https://openwetware.org/wiki/Main_Page

Khan Academy es un centro de aprendizaje gratuito que oferta diversos cursos de ciencias (Figura 228).

URL: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-energy-and-transport/hs-introduction-to-metabolism/v/introduction-to-metabolism-anabolism-and-catabolism>

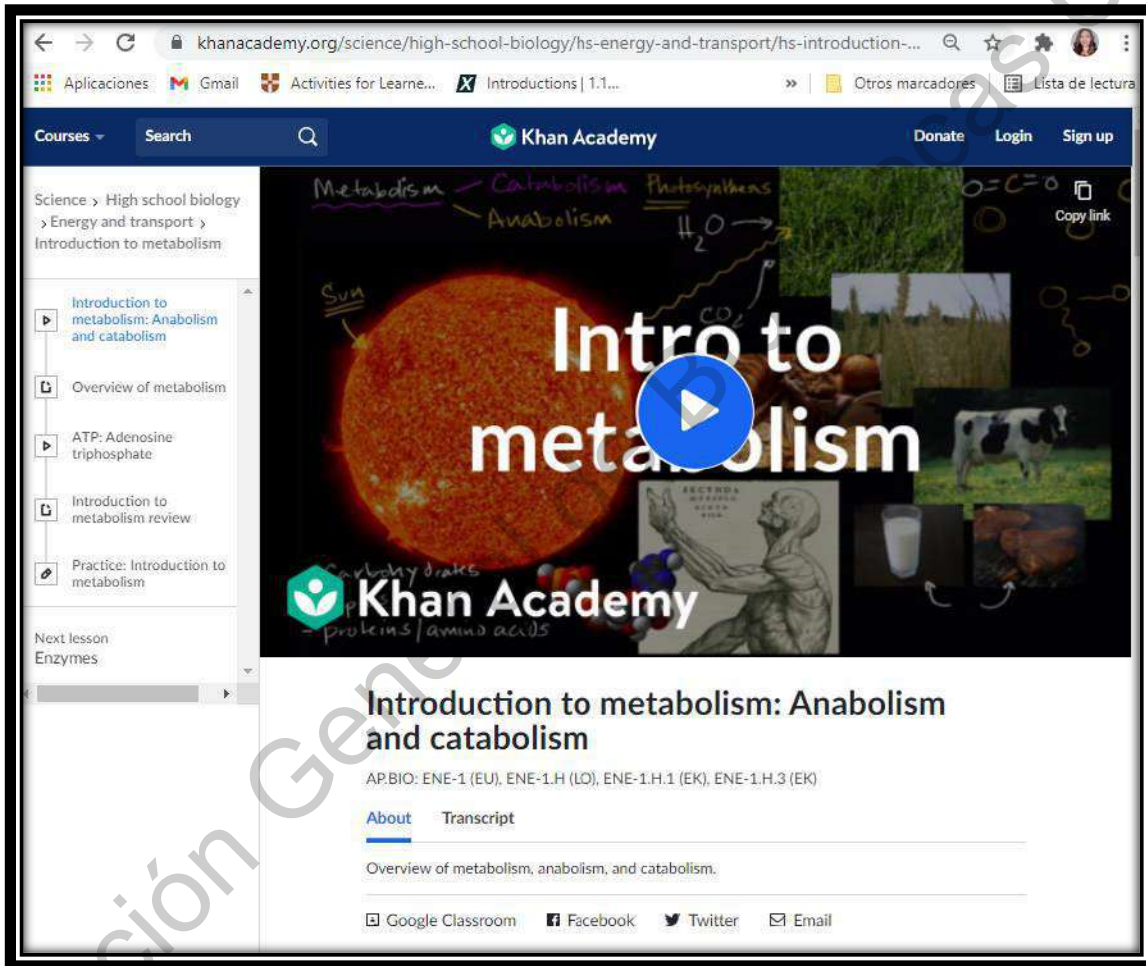


Figura 228. Curso de Introducción al metabolismo por Khan Academy.

9.4 Apps

Los teléfonos inteligentes también facilitan el aprendizaje a través de las herramientas denominadas Aplicaciones o APPS (Figura 229), disponibles para todos los dispositivos móviles.

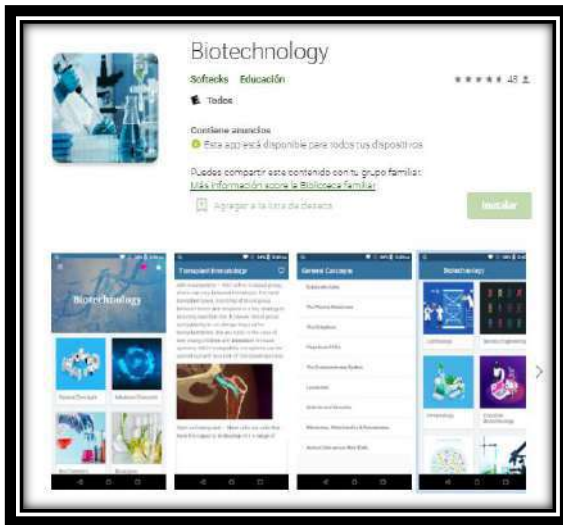


Figura 229. Aplicaciones para dispositivos móviles que apoyaran el aprendizaje.

9.5 Bibliotecas digitales

NCBI (National Center for Biotechnology Information), el Centro Nacional para la Información Biotecnológica es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos, y es una importante fuente de información de biología molecular.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Mendeley es una aplicación web y de escritorio, gratuita. Permite gestionar y compartir referencias bibliográficas y documentos de investigación, encontrar nuevas referencias y documentos y colaborar en línea (Figura 230).

URL: <https://www.mendeley.com/search/>

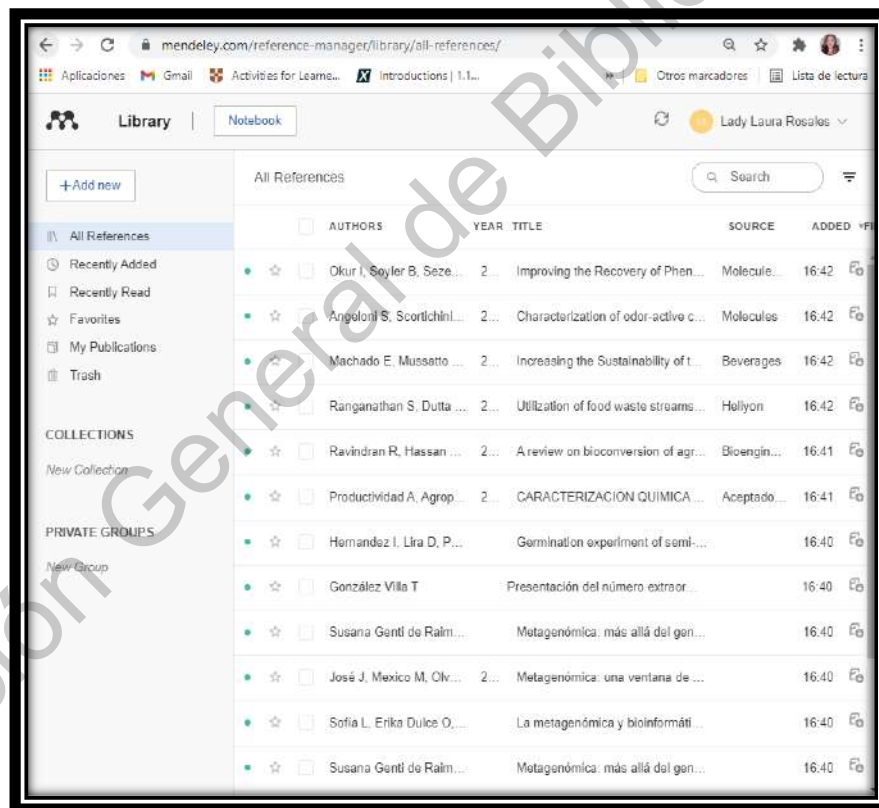


Figura 230. Mendeley una biblioteca web personalizada.

9.6 Software especializado

GEMDOCK es un programa para calcular la conformación y orientación de un ligando en relación con el sitio activo de la proteína diana.

URL: <http://gemdock.life.nctu.edu.tw/dock/>

3D-BLAST es un método muy rápido y preciso para descubrir las proteínas homólogas y las clasificaciones evolutivas de una estructura de proteína recién determinada. El 3D-BLAST tiene las ventajas de la herramienta BLAST para escanear rápidamente la estructura de la base de datos de proteínas.

URL: <http://3d-blast.life.nctu.edu.tw/>

Interacción proteína-proteína

Ingrese un par de proteínas que interactúan como una consulta para buscar sus interacciones homólogas en múltiples especies.

URL: <http://140.113.15.76/ppisearch/>

10. BIBLIOGRAFÍA

Alberts BM, Labov JB, The future of biotechnology depends on quality science education. *Electronic J. Biotechnology*, **2003**.

Aldor IS, Keasling JD. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current opinion in biotechnology*, **2003**;14(5):475-483.

Bailey JE. Toward a science of metabolic engineering. *Science*. **1991**-1675.

Borodina I, Kildegaard KR, Jensen NB, Blicher TH, Maury J, Sherstyk S, Öberg F. Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine. *Metabolic engineering*, **2015**;27:57-64.

Bouguettoucha A, Balannec B, Nacef S, Amrane A. A generalised unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**;41(3):377-382.

Brakhage AA. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **1998**;62(3):547-585.

Capello R, Donovarros C, Giono S. La diversidad microbiana en México. *CONABIO. Biodiversitas*, **2000**;32:6-10.

Cortes-López N, Montor-Antonio J, Olvera-Carranza C, et. Al. Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos. *Revista Iberoamericana de ciencias*, **2014**;1(7):45-58.

Corzo V. Metabolismo y nutrición Bacteriana, *Microbiología*. **2014**

Dawes EA. *Microbial energetics*. Glasgow:Blackie; New York: Distributed in the USA by Chapman and Hall, **1986**.

Doelle HW, DaSilva EJ, *Biotechnology: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. UNESCO, **2010**.

Du J, Shao Z, Zhao H. Engineering microbial factories for synthesis of value-added products. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **2011**;38(8):873-890.

Faraldo-Gómez JD, Sansom MS. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2004**;4:105-116.

Fan Z, Wu W, Hildebrand A, Kasuga T, Zhang R, Xiong X. A novel biochemical route for fuels and chemicals production from cellulosic biomass. *PLoS One*, **2012**;7(2):e31693.

Gilbert JA, Dupont CL. Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review Marine Science*. **2011**;3:347-71.

González GV, Zapiain SÁ. La enseñanza de la glucólisis orientada a la ingeniería metabólica y apoyada con imágenes. *Mensaje bioquímico*, **2004**;28.

Handelsman J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*. **2004**;68(4):669-685.

Hernández-León R, Velázquez-Sepúlveda I, Orozco-Mosqueda MC, Santoyo G. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Revista internacional de botánica experimental*. **2010**;79:133-139.

Jeffries TW. Ethanol fermentation on the move. *Nature biotechnology*, **2005**;23(1):40.

Jiménez A, Santos MA, Pompejus M, Revuelta JL. Metabolic engineering of the purine pathway for riboflavin production in *Ashbya gossypii*. *Applied and environmental microbiology*, **2005**;71(10):5743-5751.

Jin Q, Bethke CM. The thermodynamics and kinetics of microbial metabolism. *American Journal of Science*, **2007**;307(4):643-677. 34

Kawai F. The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **2010**;74(9):1743-1759.

Kaye Y, Grundman, Leu S, Zarka A, Zorin B, Didi-Cohen S, Boussiba S. Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous $\Delta 12$ desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG. *Algal research*, **2015**;11:387-398.

Kenneth WW, Davis RE. Química, Edición en español. Cengage Learning Editores, **2008**.

Kim BH, GADD GM, Bacterial physiology and metabolism. Cambridge University Press, 1st Edition, **2008**.

Kulis-Horn RK, Persicke M, Kalinowski J. Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum*. Microbial biotechnology, **2014**;7(1):5-25.

Kumar V, Shriram V, Hossain MA, Kishor PK. Engineering proline metabolism for enhanced plant salt stress tolerance. Managing salinity tolerance in plants: molecular and genomic perspectives. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2015**:353-372.

Lee, SJ, Lee SJ, Lee DW. Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy. Frontiers in microbiology, **2013**;4:92.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. Macmillan, **2005**.

Liolios K, Mavromantis K, Tavernarakis N. The Genomes On Line Database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. Nucleic acids Research, **2008**;36:475-479.

Lorenz P, Eck J.. Metagenomics and industrial applications. Nature Reviews Microbiology, **2005**;3:510-516

Ma Q, Zhang Q, Xu Q, Zhang C, Li Y, Fan X, Chen N. Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids. Synthetic and systems biotechnology, **2017**;2(2):87-96.

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA, Brock T. Brock Biology of microorganisms. 14^o edición. Nueva York: Pearson, 2015.

Margulis L, Chapman M, Kingdoms and Domains. 4th Edition, Academic Press, **2009**.

Moat AL, Foster JW, Spector MP. Microbial Physiology. Fourth edition, Wiley-Liss, **2002**.

Panichkin VB, Livshits VA, Biryukova IV, Mashko SV. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tryptophan production. Applied Biochemistry and Microbiology, **2016**;52(9):783-809.

Patil KR, Rocha I, Förster J, Nielsen J. Evolutionary programming as a platform for in silico metabolic engineering. BMC bioinformatics, **2005**;6(1):308. 35

Peimbert M, Alcaraz LD, Olmedo AG, García OF, Segovia L, et al. “Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas basin I: ancient lessons on how to cope with an environment under severe nutrient stress”. *Astrobiology*, **2012**;12:648-658.

Peterhansel C, Niessen M, Kebeish RM. Metabolic engineering towards the enhancement of photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology*, **2008**;84(6):1317-1323.

Poolman B. Precursor/product antiport in bacteria. *Molecular Microbiology*, **1990**;4:1629-1636.

Pohlmann A, Fricke W, Reinecke, F. *et al.* Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol.* **2006**;24:1257–1262. <https://doi.org/10.1038/nbt1244>

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiología*. 5ª edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, **2002**.

Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, **2004**;22:238-245.

Sauer U, Eikmanns BJ. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, **2005**;29(4):765-794.

Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. *Principles of fermentation technology*. Third edition, Elsevier, **2016**.

Stephanopoulos G. Metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*. **1988**;58(2-3):119-120.

Stephanopoulos G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, **1999**;1(1):1-11.

Tang JKH, You L, Blankenship RE, Tang YJ. Recent advances in mapping environmental microbial metabolisms through ¹³C isotopic fingerprints. *Journal of The Royal Society Interface*, **2012**.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: an introduction*. 11ª edición. Nueva York: Pearson, **2013**.

Turner P, Mamo G, Karlsson EN. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial cell factories*, **2007**;6(1):9.

Tyagi N, Saini D, Guleria R, Mukherjee KJ. Designing an *Escherichia coli* Strain for Phenylalanine Overproduction by Metabolic Engineering. *Molecular biotechnology*, **2017**;59(4-5):168-178.

Vázquez FA, Miranda ML. Ingeniería metabólica: controlando la química vegetal. *Ciencia*, **2004**;55: 76-86.

Vuoristo KS, Mars AE, Sanders JP, Eggink G, Weusthuis RA. Metabolic engineering of TCA cycle for production of chemicals. *Trends in biotechnology*, **2016**;34(3):191-197.

Wiechert, W. Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *Journal of biotechnology*, 94(1):37-63. **2002**.

Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. 7ª edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, **2008**.

Wilson MC, Piel J. Metagenomic approaches for exploit uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. *Chemistry & Biology*. **2013**;20:636-647.

Whitaker RH, *New Concepts of Kingdoms of Organisms*. *Science*, **1969**;163:150-160.

White D. *Physiology and biochemistry of procarotes*. 3rd Edition, Oxford University Press, **2007**.

Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1977**; 74 (11):5088-5090.

10.1 BIBLIOGRAFIA DIGITAL

PhET <https://phet.colorado.edu/>

<https://phet.colorado.edu/es/simulation/gene-expression-essentials>

Biovlab

<https://www.vlab.co.in/broad-area-biotechnology-and-biomedical-engineering>

<https://www.vlab.co.in/broad-area-biotechnology-and-biomedical-engineering>

<https://vlab.amrita.edu/index.php?sub=3&brch=64&sim=1090&cnt=3730>

<http://38.100.110.143/model/index.html>

Microbiology Videos

https://www.youtube.com/channel/UCD361ecAEjm_DYqNzVp8F7w

Khan Academy

[:https://www.youtube.com/watch?v=juM2ROSLWfw&t=2s](https://www.youtube.com/watch?v=juM2ROSLWfw&t=2s)

MITOPENCOURSEWARE

<https://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/>

<https://ocw.mit.edu/courses/biological-engineering/>

OpenWetWare

https://openwetware.org/wiki/Main_Page

https://openwetware.org/wiki/Main_Page

Khan Academy

<https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-energy-and-transport/hs-introduction-to-metabolism/v/introduction-to-metabolism-anabolism-and-catabolism>

NCBI

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Mendeley

<https://www.mendeley.com/search/>

GEMDOCK

<http://gemdock.life.nctu.edu.tw/dock/>

3D-BLAST

<http://3d-blast.life.nctu.edu.tw/>

Interacción proteína-proteína

<http://140.113.15.76/ppisearch/>

ANEXOS

Anexo 1: Diversidad Microbiana



Cite como:

Queló, R., C. Coronado y B. Gilón. 2001. La diversidad microbiana en México. CONABIO. *Biodiversitas* 23(6):12.

LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN MÉXICO

LA VIDA EN LA TIERRA no sería posible sin la actividad continua de los microorganismos. Los mecanismos que mantienen la diversidad microbiana de la biosfera son la base de la dinámica de los sistemas terrestres, acuáticos y aéreos. Es decir, la base de la existencia de las selvas y de los sistemas agrícolas, entre otros. Por ejemplo, la diversidad microbiana del suelo es la base de la fertilidad del mismo. Esto es más allá del papel que se le adjudicaba tradicionalmente, al cual se restringía a la degradación y reciclaje de la materia orgánica y al mantenimiento de los principales ciclos de nitrógeno, carbono y liberación de algunos elementos químicos y sus principales compuestos. Constantemente se concibe la estructura de las comunidades microbianas (diversa o opaca); sin embargo, el impacto de esta posibilidad será evidente cuando desajuste las funciones ecosistémicas reguladas por los microorganismos.

El vertiginoso desarrollo de la biología molecular provocó que la microbiología quedara relegada a fungir como una herramienta de trabajo y fuera abordada con enfoques independientes y muy específicos, como un medio para resolver problemas concretos. Actualmente, la microbiología se halla ante nuevos paradigmas. En la década de los noventa se han iniciado tanto la

convergencia como la fusión de que diferentes áreas (medicina, biotecnológica, agrícola, de biomedicina, de alimentos industrial) y sus metodologías, con una fuerte tendencia a mejorar su tratamiento a partir del reconocimiento de la importancia por sí de la diversidad de microorganismos que existen en el planeta.

En los albores del siglo XXI se urge reconsiderar el desarrollo de la microbiología sobre la base de los nuevos paradigmas, sobre la Diversidad Biológica – y el Protocolo de Bioseguridad –, y la globalización mundial, tanto comercial como industrial y económica. Estas iniciativas tienen intereses diferentes en el estado de los microorganismos. Sin embargo, coinciden en la necesidad de incrementar el conocimiento de la diversidad microbiana. Cuando se alude a diversidad biológica, viene a la mente sólo la multiplicidad de plantas y animales, cuando –paradójicamente– la mayor diversidad corresponde a los microorganismos (bacterias, hongos, algas, protozoos y virus). Se estima que tan sólo se ha aislado entre 1 y 2% de los microorganismos que existen, de los cuales muy pocos han sido estudiados.

Las fuerzas que promueven la obtención de nuevos conocimientos en el área de la diversidad microbiana son la científica, la industrial

y la ambiental (con sus consistentes implicaciones sociales, económicas y políticas), las cuales convergen en la necesidad de aumentar el conocimiento sobre la diversidad microbiana, sin dejar de lado sus propios flujos (Fig. 1). En el punto de convergencia de estas tres fuerzas se encuentra la disputa por el acceso directo a dicha diversidad; mientras que la industria biotecnológica la requiere para transformarla en bienes de consumo novedosos (innovación tecnológica) y así generar riqueza, para las políticas ambientales, como el Convenio sobre la Diversidad Biológica, lo importante es incorporarla a los procesos de desarrollo sustentable y la conservación de la biodiversidad misma. Es importante señalar que aunque las tres fuerzas pueden perseguir distintos, sus interdependencias para su participación para construir algún beneficio de la diversidad microbiana, debido a la magnitud que supone el problema de estudiar la microbiodiversidad. Sin embargo, en el fondo está latente definir quién controlará los beneficios.

Hasta hace poco la acción sobre diversidad microbiana prácticamente no figuraba de forma consistente en los programas ambientales, e incluso para los biólogos y para los microbiólogos ésta era una realidad poco conocida. Entonces

Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms

(archaeobacteria/eubacteria/urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny)

CARL R. WOESE AND GEORGE E. FOX*

Department of Genetics and Development, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801

Communicated by T. M. Sonneborn, August 18, 1977

ABSTRACT A phylogenetic analysis based upon ribosomal RNA sequence characterization reveals that living systems represent one of three aboriginal lines of descent: (i) the eubacteria, comprising all typical bacteria; (ii) the archaeobacteria, containing methanogenic bacteria; and (iii) the urkaryotes, now represented in the cytoplasmic component of eukaryotic cells.

The biologist has customarily structured his world in terms of certain basic dichotomies. Classically, what was not plant was animal. The discovery that bacteria, which initially had been considered plants, resembled both plants and animals less than plants and animals resembled one another led to a reformulation of the issue in terms of a yet more basic dichotomy, that of eukaryote versus prokaryote. The striking differences between eukaryotic and prokaryotic cells have now been documented in endless molecular detail. As a result, it is generally taken for granted that all extant life must be of these two basic types.

Thus, it appears that the biologist has solved the problem of the primary phylogenetic groupings. However, this is not the case. Dividing the living world into *Prokaryotae* and *Eukaryotae* has served, if anything, to obscure the problem of what extant groupings represent the various primeval branches from the common line of descent. The reason is that eukaryote/prokaryote is not primarily a phylogenetic distinction, although it is generally treated so. The eukaryotic cell is organized in a different and more complex way than is the prokaryote; this probably reflects the former's composite origin as a symbiotic collection of various simpler organisms (1-5). However striking, these organizational dissimilarities do not guarantee that eukaryote and prokaryote represent phylogenetic extremes.

The eukaryotic cell *per se* cannot be directly compared to the prokaryote. The composite nature of the eukaryotic cell makes it necessary that it first be conceptually reduced to its phylogenetically separate components, which arose from ancestors that were noncomposite and so individually are comparable to prokaryotes. In other words, the question of the primary phylogenetic groupings must be formulated solely in terms of relationships among "prokaryotes"—i.e., noncomposite entities. (Note that in this context there is no suggestion *a priori* that the living world is structured in a dichotomous way.)

The organizational differences between prokaryote and eukaryote and the composite nature of the latter indicate an important property of the evolutionary process: Evolution seems to progress in a "quantized" fashion. One level or domain of organization gives rise ultimately to a higher (more complex) one. What "prokaryote" and "eukaryote" actually represent are two such domains. Thus, although it is useful to define phylogenetic patterns within each domain, it is not meaningful

to construct phylogenetic classifications between domains. Prokaryotic kingdoms are not comparable to eukaryotic ones. This should be recognized by an appropriate terminology. The highest phylogenetic unit in the prokaryotic domain we think should be called an "urkingdom"—or perhaps "primary kingdom." This would recognize the qualitative distinction between prokaryotic and eukaryotic kingdoms and emphasize that the former have primary evolutionary status.

The passage from one domain to a higher one then becomes a central problem. Initially one would like to know whether this is a frequent or a rare (unique) evolutionary event. It is traditionally assumed—without evidence—that the eukaryotic domain has arisen but once; all extant eukaryotes stem from a common ancestor, itself eukaryotic (2). A similar prejudice holds for the prokaryotic domain (2). [We elsewhere argue (6) that a hypothetical domain of lower complexity, that of "progenotes," may have preceded and given rise to the prokaryotes.] The present communication is a discussion of recent findings that relate to the urkingdom structure of the prokaryotic domain and the question of its unique as opposed to multiple origin.

Phylogenetic relationships cannot be reliably established in terms of noncomparable properties (7). A comparative approach that can measure degree of difference in comparable structures is required. An organism's genome seems to be the ultimate record of its evolutionary history (8). Thus, comparative analysis of molecular sequences has become a powerful approach to determining evolutionary relationships (9, 10).

To determine relationships covering the entire spectrum of extant living systems, one optimally needs a molecule of appropriately broad distribution. None of the readily characterized proteins fits this requirement. However, ribosomal RNA does. It is a component of all self-replicating systems; it is readily isolated; and its sequence changes but slowly with time—permitting the detection of relatedness among very distant species (11-13). To date, the primary structure of the 16S (18S) ribosomal RNA has been characterized in a moderately large and varied collection of organisms and organelles, and the general phylogenetic structure of the prokaryotic domain is beginning to emerge.

A comparative analysis of these data, summarized in Table 1, shows that the organisms clearly cluster into several primary kingdoms. The first of these contains all of the typical bacteria so far characterized, including the genera *Acetobacterium*, *Actinobacter*, *Acholeplasma*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Anaerobaculum*, *Aphanocapsa*, *Bacillus*, *Bdellovibrio*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Leptospira*, *Micrococcus*, *Mycoplasma*, *Paracoccus*, *Photobacterium*, *Propionibacterium*,

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U. S. C. §1734 solely to indicate this fact.

* Present address: Department of Biophysical Sciences, University of Houston, Houston, TX 77004.

New Concepts of Kingdoms of Organisms

Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms.

R. H. Whittaker

There are those who consider questions in science which have no unequivocal, experimentally determined answer scarcely worth discussing. Such feeling, along with conservatism, may have been responsible for the long and almost unchallenged dominance of the system of two kingdoms—plants and animals—in the broad classification of organisms. The unchallenged position of these kingdoms has ended, however; alternative systems are being widely considered (1-18) and are appearing in many introductory biology texts (19-24). My purpose in this article is to discuss the merits of two classifications which depart from the traditional two kingdoms, the systems of Copeland (1-3) and Whittaker (4, 5).

Two-Kingdom System

Man is terrestrial, and he sees around him two major groups of organisms of very different adaptation to nutrition on land—the photosynthetic, rooted, higher plants, and the food-ingesting, motile, higher animals. So distinct in way of life, direction of evolution, and kind of body organization are these groups that a concept of dichotomy—plants versus animals—is almost inescapable if they are considered by themselves. The two groups became the nuclei around which concepts of the plant and animal kingdoms were developed by early naturalists. The kingdoms have been part of the formal classification of living things since Linnaeus (25).

Mosses, liverworts, and macroscopic algae are clearly plants in their photosynthetic and nonmotile way of life, and (though the photosynthetic process itself was not understood by early naturalists) these forms were grouped

with the higher land plants. The higher fungi on land are nonmotile, and their apparently "rooted" manner of growth suggested the plants. It thus seemed reasonable to assign fungi to the plant kingdom, and some students believed that they had evolved from algae. The wealth of unicellular life discovered by microscopists offered greater difficulty. Some forms were motile and ingested food, however, and were naturally regarded as one-celled animals or protozoans. Others were nonmotile and photosynthetic, hence one-celled plants. There remained a wide range of unicellular forms in which nonmotility and flagellate or pseudopodial motility, and ingestive, photosynthetic, and absorptive nutrition, were combined in various ways which were neither clearly plant-like nor animal-like. In a number of cases plant-like and animal-like unicells were connected by a series of closely related intergrading forms within the same major taxon. There remained also the bacteria which, though few are photosynthetic and many are motile, seemed better treated as plants because of their walled cells. The plant and animal kingdoms are products of a process of concretion, by which groups of organisms which were aquatic, or fungal, or microscopic, or more than one of these, were added around the nuclear concepts of plant and animal derived from higher land organisms.

It was recognized that the two-kingdom system came into difficulties in treatment of the unicellular organisms, since some groups of these were claimed both for the plant kingdom by botanists and for the animal kingdom by zoologists. The system seemed, however, a reasonable treatment of the living world in terms of two kingdoms and evolu-

tionary directions (Fig. 1). In time the system seemed not reasonable but axiomatic; suggestions of other kingdoms were regarded as the idiosyncrasies of individuals. There were such suggestions, however, as the limitations of the two-kingdom system became more evident. I have reviewed proposals for other kingdoms in more detail elsewhere (5).

Limitations of the Two-Kingdom System

The difficulties of the two-kingdom system may be summarized in relation to four points.

1) *The protists.* The most obvious difficulty is that for which we use *Euglena* and its relatives as the exemplar for students—the intergrading combinations of plant and animal characters, the fusion of the kingdoms, among unicellular organisms. Because of the impossibility of clear division of the unicells into plants and animals, a number of authors suggested third kingdoms of lower organisms (26-32). Hogg (26) observed the intergradation of plants and animals among lower forms and proposed for them the *Regnum Primigenum* and the term "Protoctista." Haeckel (29) proposed separating the lower organisms as the kingdom "Protista." Haeckel included the sponges in this kingdom in one treatment (29), and the fungi in another (30); but the kingdom comprised primarily, and in later treatments (31, 32) only, the unicellular organisms.

Although content of the third kingdom of lower organisms and use of "Protoctista" and "Protista" have varied, two principal possibilities may be distinguished. The lower kingdom may either comprise only unicellular organisms (including those forming colonies of unicells), the kingdom Protista of Haeckel (29-32) and others (33, 20, 21, 5, 14), or the lower kingdom may comprise the unicells plus other organisms which lack the kind and degree of tissue differentiation characteristic of higher plants and animals, thus including fungi and most or all algae, the kingdom Protoctista of Hogg (26) and Copeland (3). (In either of these concepts bacteria and blue-green algae may be excluded as indicated below.)

Some authors (10, 12, 13, 19, 22) prefer the more familiar term "Protista" for the second concept. Different inter-

The author is professor of biology in the Section of Ecology and Systematics, Cornell University, Ithaca, New York 14853.

Anexo 4: Sideroforos

Published: 01 February 2003

Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria

José D. Faraldo-Gómez[✉] & Mark S. P. Sansom

Nature Reviews Molecular Cell Biology 4, 105–116 (2003) | Cite this article

898 Accesses | 249 Citations | 3 Altmetric | Metrics

Key Points

- Iron is one of the most important nutrients of bacteria, because of its essential metabolic role. However, iron is scarcely available under physiological conditions; first, because of its propensity to form insoluble complexes, and second, as a result of the existence of numerous iron-binding proteins that the host itself uses to store and transport iron.
- Bacteria have evolved a wide range of strategies to overcome iron shortage and to ensure sufficient uptake. One of these relies on the synthesis and excretion of siderophores, or small compounds that either bind free iron or sequester it from iron-binding proteins in the bacterial environment.
- In Gram-negative bacteria, recovery of iron-loaded siderophores involves a sophisticated uptake mechanism. At the outer-membrane level, high-affinity receptors capture siderophores and mediate their translocation into the periplasmic space. This is powered by the Ton complex, which resides in cytoplasmic membrane and is coupled to the proton-motive force. Siderophores are subsequently transported across the periplasm and the cytoplasmic membrane by periplasmic-binding proteins and ATP-dependent membrane transporters.
- In recent years important advancements have been made in the characterization of the siderophore uptake system, owing to the combination of structural, biophysical, biochemical and genetic approaches. Among these, it is worth noting the determination of the atomic structure of several outer-membrane receptors and the use of spectroscopic techniques to monitor the uptake process *in vivo*.
- However, fundamental questions concerning almost every aspect of the uptake process remain unclear and are the subject of continued debate between researchers.

Abstract

The outer membrane of Gram-negative bacteria constitutes a permeability barrier that protects the cell from exterior hazards, but also complicates the uptake of nutrients. In the case of iron, the challenge is even greater, because of the scarcity of this indispensable element in the cell's surroundings. To solve this dilemma, bacteria have evolved sophisticated mechanisms whereby the concerted actions of receptor, transporter and energy-transducing proteins ensure that there is a sufficient supply of iron-containing compounds, such as siderophores.

Precursor/product antiport in bacteria

B. Poolman

First published: October 1990 | <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00539.x> |

Citations: 42



PDF



TOOLS



SHARE

Summary

Many microorganisms metabolize their substrates (precursors) only partially and excrete the products of the metabolism into the medium. Although uptake of precursor and exit of product can proceed as two independent steps, there is increasing evidence that these processes are often linked and that transport is facilitated by a single antiport mechanism. Features of antiport mechanisms and advantages for the organism of catalysing precursor/product antiport will be illustrated by discussing a number of well-characterized systems. Based on precursor-product conversion stoichiometries, structural relatedness between precursors and products, and energetic and kinetic considerations, new examples of antiport systems will be proposed.

The Genomes On Line Database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata

Konstantinos Liolios¹, Konstantinos Mavromatis², Nektarios Tavernarakis³
and Nikos C. Kyrpides^{2,4}

¹University of Chicago, Department of Medicine, Chicago, ²Genome Biology Program, Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, USA and ³Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology, Heraklion, Crete, Greece

Received September 18, 2007; Revised and Accepted October 1, 2007

ABSTRACT

The Genomes On Line Database (GOLD) is a comprehensive resource that provides information on genome and metagenome projects worldwide. Complete and ongoing projects and their associated metadata can be accessed in GOLD through pre-computed lists and a search page. As of September 2007, GOLD contains information on more than 2900 sequencing projects, out of which 639 have been completed and their sequence data deposited in the public databases. GOLD continues to expand with the goal of providing metadata information related to the projects and the organisms/environments towards the Minimum Information about a Genome Sequence (MIGS) guideline. GOLD is available at <http://www.genomesonline.org> and has a mirror site at the Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Crete, Greece at <http://gold.imbb.forth.gr/>

HISTORY AND GROWTH

Since its inception in 1997, GOLD (1–3) has continuously monitored genome-sequencing projects worldwide and has provided the community with a unique centralized resource that integrates diverse information related to Archaea, Bacteria, Eukaryotic and more recently Metagenomic sequencing projects.

In contrast to what was anticipated in the previous report of the database 2 years ago (3), the total number of projects has not yet doubled, with a total of 2905 projects recorded as of September 2007 (compared to 1575 in September 2005). However, if only the archaeal and bacterial projects are considered, then the total number of recorded projects is 1950, only 36 short of double the number of such recorded projects 2 years ago. The advent

of new sequencing technology platforms, such as pyrosequencing (4), has significantly contributed to the increase in the number of new microbial sequencing projects. In fact, 134 GOLD projects are now reported using 454 technology platform as part of the Whole Genome Sequencing (WGS) project.

Two major large-scale microbial genome sequencing programs that have been launched during the last 2 years account for the majority of the reported 454 sequencing projects. The first program is the Human Gut Microbiome Initiative (HGMI) (http://genomic.wustl.edu/hgm/HGM_frontend.cgi) at the Genome Sequencing Center of the Washington University in St. Louis. This program aims to provide deep draft genome sequences for 100 cultured representatives of the phylogenetic diversity documented by 16S rRNA surveys of the human gut microbiota. From these, the sequencing for 45 organisms is already in progress and the information available in GOLD (the list is available through the search page with the term 'Human gut microbiome' as the Relevance search field). The second program is the Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea (GEBA), launched in May 2007 by the Department of Energy (DOE)–Joint Genome Institute (JGI) (<http://www.jgi.doe.gov/programs/GEBA/index.html>). GEBA aims the systematic filling in the sequencing gaps along the bacterial and archaeal branches of the tree of life and represents the first systematic attempt to use the tree of life itself as a guide for sequencing target selection. To test the feasibility of such a large-scale project, DOE-JGI has initiated a pilot project to sequence 100 bacterial and archaeal organisms based on their phylogenetic position in the tree of life. The GEBA pilot project is carried out in collaboration with the German Resource Centre for Biological Material (DSMZ) (<http://www.dsmz.de/>), which provides the DNA for the selected organisms. As of September 2007, 79 GEBA projects are reported in GOLD (the list is available

*To whom correspondence should be addressed. Tel: 925 296 3718; Fax: 925 296 5898; Email: nckyrpides@jgi.gov

© 2007 The Author(s)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Anexo 7: Transporte y energía

Microbial Physiology, Albert G. Mast, John W. Foster and Michael P. Spector
Copyright © 2002 by Wiley-Liss, Inc.
ISBN: 0-471-39483-1

CHAPTER 9

ENERGY PRODUCTION AND METABOLITE TRANSPORT

ENERGY PRODUCTION

The second law of thermodynamics states that systems will spontaneously change from states of higher order to lesser order. The cell, however, must do the opposite to survive. It must make order out of chaos. To accomplish this feat, cells first unleash and then harness the energy trapped within molecules encountered in the environment and use that energy to increase order (e.g., synthesize macromolecules or move chemicals into or out of the cell against a gradient). In this chapter, we discuss how cells steal energy from the environment.

Any discussion of energy must begin with a definition of **entropy**. Entropy (S), simply put, is the measure of disorder; the larger the value of S , the greater the disorder. Chemical reactions that cause a large increase in S [where the difference between product and precursor entropies (ΔS) is greater than zero] are favored and will occur spontaneously with the *release* of energy. Reactions that cause a decrease in S [$\Delta S < 0$] increase order. These reactions require the input of energy and thus cannot occur spontaneously. An accounting device used to deduce the entropy change that occurs following a reaction is called the **Gibbs free energy (G)**. G combines all the physical properties of a system including heat, pressure, volume, and energy. The free-energy change (ΔG) during a reaction (i.e., the G of the products minus the G of the starting materials) is a measure of the *disorder* created when the reaction occurs. Energetically favored reactions are those in which a large amount of free energy is released (i.e., they have a large *negative* ΔG), creating much disorder. In contrast, reactions with a large positive ΔG (such as would occur during peptide bond formation) create order and thus cannot occur spontaneously.

The goal of the cell is to harness the $-\Delta G$ that results from converting glucose (a highly ordered compound) into CO_2 and H_2O and to use that energy to drive biosynthetic reactions that have a positive ΔG . Since ATP is the fuel used for most anabolic reactions, a major objective of the cell is to synthesize this high-energy

MICROBIAL METABOLISM AND BIOTECHNOLOGY

Horst W.Doelle, DSc, DSc [hc]

**Deputy-Director, MIRCEN-Biotechnology Brisbane and the Pacific Regional Network;
Past Chairman, International Organisation of Biotechnology and Bioengineering**

Chapter 8

Thermodynamics, Solute Transport and Enzyme Catalysis

Content:

1. Concept of thermodynamics of biological systems

1.1 Modes of Energy Production

1.2 Modes of Energy Conservation

1.2.1 Proton-translocating electron transport chain

1.2.2 Proton-translocating ATPase complex

2. Membrane and Solute Transport Mechanisms

2.1 Passive Diffusion

2.2 Facilitated Diffusion

2.3 Active Transport

2.4 Group Translocation

3. Concepts of Metabolism

3.1 Photosynthesis

3.2 Aerobic Respiration

3.3 Anaerobic Respiration

3.4 Fermentation

4. Concept of Enzyme Catalysis

5. Bibliography

Anexo 9: Metabolismo central

Human Physiology, Albert G. Kluge, John W. Foster and Michael P. Sponzo
Copyright © 2010 by Wiley-Liss, Inc.
ISBN: 1-4071-3493-1

CHAPTER 8

CENTRAL PATHWAYS OF CARBOHYDRATE METABOLISM

The study of carbohydrate metabolism involves consideration of the following factors:

1. Central pathways of carbohydrate metabolism
2. Conversion of compounds to intermediates usable in central pathways
3. Mechanisms of energy (ATP) production
 - a. Substrate-level phosphorylation
 - b. Oxidative phosphorylation
 - c. Other mechanisms of energy transfer
4. Metabolic steps involved in the generation and use of reducing activity
 - a. Reduction of pyruvate or other substrates to fermentation end products
 - b. Biosynthetic reactions requiring reducing action
5. Oxygen involvement in energy-generating reactions
 - a. Aerobic metabolism
 - b. Anaerobic metabolism
 - c. Facultative metabolism
6. Metabolic intermediates serving as biosynthetic precursors
7. Reactions that replenish biosynthetic intermediates (anaplerotic reactions)
8. Metabolic and genetic regulatory systems

Carbohydrates are not the only compounds utilized as sources of energy by microorganisms. Fatty acids, lipids, amino acids, purines, pyrimidines, and a wide variety of other compounds can also serve as carbon and energy sources. Generally, utilization of an alternate substrate involves its conversion to an intermediate intrinsic to one of the central pathways of carbohydrate metabolism. Some of these alternate pathways are discussed in Chapter 10. The details of energy production and metabolite transport are discussed in Chapter 9.

Anexo 10 : Metabolismo de otros azúcares

Microbial Physiology, Albert L. Khan, John W. Foster and Michael P. Spector
Copyright © 2002 by Wiley-Liss, Inc.
ISBN: 0-471-39483-1

CHAPTER 10

METABOLISM OF SUBSTRATES OTHER THAN GLUCOSE

UTILIZATION OF SUGARS OTHER THAN GLUCOSE

Glucose is the preferred carbon source for most of the common heterotrophic bacteria. Nevertheless, microorganisms possess remarkable versatility in their ability to use a wide range of other compounds as sources of carbon and energy. Most (if not all) of these pathways invariably lead to the production of intermediates that can enter one of the central pathways described in Chapter 8 (i.e., EMP, Entner-Doudoroff, pentose shunt, TCA cycle, or glyoxylate cycle). Many of these alternate carbon sources are utilized only after a period of **induction** of the enzymes required for their transport and metabolism. The presence of glucose in the growth medium generally inhibits the expression of catabolic enzymes for these substrates.

Monod first described this glucose effect in 1947 for the inhibition of β -galactosidase synthesis in *Escherichia coli*, and in 1961 Magasanik coined the term **catabolite repression** for this phenomenon. In media containing glucose and another carbohydrate, bacteria exhibit two complete growth cycles (diauxic growth) separated by a lag period. Glucose prevents entry of the second substrate by a process known as **inducer exclusion** and represses induction of the genes coding for the enzymes required for utilization of the second substrate. The details of the genetic regulation of carbohydrate metabolism are in Chapter 5.

Lactose

In *E. coli*, lactose utilization requires the induction, under the control of the *lac* operon, of a specific permease for its transport, and β -galactosidase, the enzyme that cleaves it to form D-galactose and D-glucose (Fig. 10-1). The D-galactose is phosphorylated to galactose-1-phosphate and metabolized via the Leloir pathway to yield fructose-6-phosphate (Fig. 10-2). Fructose-6-phosphate is ultimately utilized via the EMP pathway.

Anexo 11: Degradación de compuestos recalcitrantes

Pure & Appl. Chem., Vol. 62, No. 4, pp. 769-778 1990.
Printed in Great Britain.
© 1990 IUPAC

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

APPLIED CHEMISTRY DIVISION
COMMISSION ON BIOTECHNOLOGY*

Interrelations of Chemistry and Biotechnology—II

MICROBIAL DEGRADATION OF SYNTHETIC RECALCITRANT COMPOUNDS

Prepared for publication by

RANDI K. ROTHMEL and ANANDA M. CHAKRABARTY

Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois College of Medicine, Chicago, Illinois 60612, USA

*Membership of the Commission during the period (1987-89) in which this document was prepared was as follows:

Chairman: M. Ringbom (GDR); Vice-Chairman: A. M. Chakrabarty (USA); Secretary: L. M. Gierach (USA); *Titular Members*: V. K. Eroshin (USSR); H. K. Kölbl (FRG); H. G. W. Leutenberger (Switzerland); H. Yamada (Japan); *Associate Members*: R. Chaleff (USA); J. Engels (FRG); C. Wandrey (FRG); *National Representatives*: H. N. Torres (Argentina); M. van Montagu (Belgium); V. N. Beshkov (Bulgaria); M. Moo-Young (Canada); L. Kjaergaard (Denmark); H. Dellweg (FRG); L. Pénasse (France); B. Nagel (GDR); J. Holló (Hungary); T. K. Ghose (India); E. Cernis (Italy); G. B. Petersen (New Zealand); A. Fiechter (Switzerland); O. Yenigün (Turkey).

The Commission has chosen this series with a view to intensify the interrelations of chemistry and biotechnology. By improving the knowledge of chemists in the field of biotechnology it is hoped to initiate more ideas for applying biological methods in chemistry, inspire more use of chemical knowledge in the biological sciences and help scientists in both fields to work closer together. In the articles in the series, to be published in this journal, outstanding experts in their respective fields will give (a) an overview on topics related to the practical use of biotechnological methods in organic chemistry, (b) an outlook on upcoming research topics, their impact on existing areas and their potential for future developments.

The Commission solicits comments as well as suggestions for future topics, and will aim to help in providing answers to any questions in this field.

Replication of this report is permitted without the need for formal IUPAC permission on condition that an acknowledgement, with full reference together with IUPAC copyright symbol © 1990 IUPAC, is passed. Publication of a translation into another language is subject to the additional condition of prior approval from the relevant IUPAC National Adhering Organization.

Genome sequence of the bioplastic-producing
"Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16Anne Pöhlmann^{1,3}, Wolfgang Florian Fricke^{1,4,5}, Frank Reinecke^{4,5}, Bernhard Kusian⁶, Heiko Liesegang¹, Rainer Cramm¹, Thomas Eitinger¹, Christian Eversing¹, Markus Fötter¹, Edward Schwartz¹, Axel Strittmatter¹, Inga Voss¹, Gerhard Gottschalk¹, Alexander Steinbüchel¹, Barbel Friedrich¹ & Britta Bösen⁴

The H_2 -oxidizing lithoautotrophic bacterium *Ralstonia eutropha* H16 is a metabolically versatile organism capable of subsisting, in the absence of organic growth substrates, on H_2 and CO_2 as its sole sources of energy and carbon. *R. eutropha* H16 first attracted biotechnological interest nearly 50 years ago with the realization that the organism's ability to produce and store large amounts of poly(*N*-[1-*S*-hydroxybutyrate]) and other polyesters could be harnessed to make biodegradable plastics. Here we report the complete genome sequence of the two chromosomes of *R. eutropha* H16, together, chromosome 1 (4,052,032 base pairs (bp)) and chromosome 2 (2,912,490 bp) encode 6,116 protein-coding genes. Analysis of the genome sequence offers the genetic basis for exploiting the biotechnological potential of this organism and provides insights into its remarkable metabolic versatility.

Ralstonia eutropha H16 is a Gram-negative lithoautotrophic bacterium belonging to the β -subclass of the Proteobacteria. It is a obligate inhabitant of soil and freshwater biotopes and is well adapted to life in habitats subject to transient anoxia¹. One of the keys to the organism's lifestyle is its ability to use—alternatively or concurrently—both organic compounds and molecular H_2 as sources of energy (Fig. 1). *R. eutropha* H16 can make use of the transiently available supplies of H_2 arising, for example, from the metabolic activity of N_2 -fixing microbes, because it is equipped with two strong, conserved hydrogenases². These *H₂* metalloproteins ensure the oxidation of H_2 , providing the organism with energy and reductant. In the absence of environmental O_2 , *R. eutropha* H16 can switch to anaerobic respiration; a complete denitrification pathway allows the organism to exploit alternative electron acceptors such as NO_3^- and NO_2^- . Correlated with the flexible heterotrophy of the organism is its capacity to shift between heterotrophic and autotrophic growth modes. It fixes CO_2 via the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle³. In addition, the bacterium can stockpile organic carbon in the form of poly(*N*-[1-*S*-hydroxybutyrate]) (PHB) in specialized storage granules⁴. This represents an adaptation to fluctuating CO_2 levels, because PHB granules are formed whenever an abundance of carbon is available, but other factors such as O_2 , bound nitrogen or phosphate are growth-limiting.

Aside from its biological significance, this versatile, nonpathogenic organism is also of biotechnological interest. Perhaps the best known application of *R. eutropha* strains is the commercial production of the biodegradable thermoplastic Biopol[®] (<http://www.metabolin.com>). Production of biorecycled labeled with stable isotopes has been

carried out via lithoautotrophic fermentation of *R. eutropha* H16 (ref. 5). Whether cultured under lithoautotrophic or heterotrophic conditions, *R. eutropha* H16 reaches high cell densities (~200 g dry weight per liter)^{6,7}. Very recently an investigation demonstrated the potential application of the O_2 -tolerant, CO_2 -resistant, membrane-bound hydrogenase of *R. eutropha* H16 for the construction of biological fuel cells^{8,9} and for designing light-driven H_2 production complexes¹⁰. Another promising experimental approach documented the usefulness of *R. eutropha* H16 hydrogenase for the construction of an H_2 -sensing device¹¹.

As a basis for future studies we undertook the sequencing and annotation of the genome of *R. eutropha* H16 genome. The sequence of the smallest of the three replicons, the megaplasmid pREG, has been reported¹². Here we present the sequence analysis of the two main chromosomes.

RESULTS

Organization and general features of the genome

The genome of *R. eutropha* H16 consists of three circular replicons: chromosomes 1 (4,052,032 bp), chromosome 2 (2,912,490 bp) and megaplasmid pREG (402,136 bp), adding up to a total size of 7,436,678 bp (Supplementary Fig. 1 online). The number and size of the genomic replicons is in agreement with the physical mapping data obtained by pulsed-field electrophoresis¹³. General features of the three replicons are listed in Table 1. The two chromosomes have an almost identical G+C content and nearly the same proportion of coding regions. Both parameters differ from the corresponding values

¹Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biologie/Biotechnologie, Charitéstrasse 113, 10115 Berlin, Germany. ²Georg-August-Universität Göttingen, Leibniz-Institut für Bioanalytik, Leinstrasse 8, 37077 Göttingen, Germany. ³Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Lemmerstrasse 3, 48149 Münster, Germany. ⁴Georg-August-Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Charitéstrasse 8, 37077 Göttingen, Germany. ⁵These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to A.P. (mailto:anne.pohlmann@uni-bielefeld.de).

Received 12 April; accepted 2 August; published online 10 September 2006; corrected after print 20 March 2007; doi:10.1038/nbt1284



Biotecnología aplicada a la producción de metabolitos secundarios

Iván de la Cruz Chacón¹
Alma Rosa González Esquivel²

ABSTRACT

The plants produce secondary metabolites, they are generally nonessential for the basic metabolic processes, but usually have important ecological functions. Some of these organic compounds can be used and marketed as food additives, nutraceuticals, and pharmaceuticals. In this document, we present and analyze tools main biotechnological for metabolite production, which include extraction of culture *in situ*, culture *in vitro* (cellular suspensions and hairy roots) and metabolic engineering. In addition, these tools are useful to study plant secondary metabolism.

Keywords: biotechnology, plant secondary metabolites, natural products

RESUMEN

Las plantas biosintetizan metabolitos secundarios que no son esenciales para su metabolismo básico, pero que usualmente tienen importantes funciones ecológicas. Algunas de estas moléculas orgánicas se utilizan y comercializan como aditivos alimentarios, nutrimentos y fármacos. En este documento, se mencionan y analizan las principales herramientas

biotecnológicas para su producción, incluyendo extracción de cultivos *in situ*, cultivos *in vitro* (suspensiones celulares y raíces transformadas). Estas tecnologías también son utilizadas para el estudio del metabolismo secundario vegetal.

Palabras Claves: biotecnología, metabolitos secundarios, productos naturales.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología integra disciplinas orientadas al desarrollo e innovación de tecnologías que involucran el manejo de material biológico para la producción de bienes y servicios (SMB, 2009). Centra su atención en el aprovechamiento de las propiedades metabólicas de los organismos vivos, por lo que los bienes pueden ser los mismos organismos (es decir, la biomasa o partes del cuerpo orgánico), los productos del metabolismo celular (es decir, enzimas o metabolitos), o productos formados a partir de sustratos endógenos o exógenos con la ayuda de enzimas solas o de rutas metabólicas complejas (Barz y Oksman, 2002). Los organismos pueden ser desde microbios (bacterias, y hongos) hasta animales y plantas. Emplea técnicas de ingeniería genética (ADN recombinante, manipulación y transferencia de genes), manipulación de embriones, hibridación somática y regeneración vegetal, cultivos celulares, producción de anticuerpos monoclonales, ingeniería de bioprocesos, entre otros (Newell y Re, 2006).

ivanchac@hotmail.com¹
aloequinca@unicach.edu.mx²

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Facultad de Ciencias Biológicas. Lab. de Fisiología y Química Vegetal. Libramiento Norte Poniente S/N, C.P. 29039, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tel. (961) 1200894

Anexo 14: Fermentaciones

Microbial Physiology, Albert G. Moor, John W. Foster and Michael P. Spector
Copyright © 2002 by Wiley-Liss, Inc.
ISBN: 0-471-39483-1

CHAPTER 11

FERMENTATION PATHWAYS

The major pathways used by microorganisms for the dissimilation of carbohydrates and the generation of biologically useful energy (as PMF or ATP) and reducing power (as NADH or NADPH) are delineated in previous chapters. The introductory reactions whereby a variety of alternate sugars and other substrates are metabolized to intermediates that can enter these central metabolic routes are also described. Individual organisms may use the fructose bisphosphate aldolase, phosphoketolase, or ketogluconate aldolase pathways or variations of them. Additional fermentative products may be derived from pyruvate or other intermediates. The fermentative pathways occurring in some of the major groups of microorganisms are outlined in Figure 11-1 and are considered in detail in this chapter.

FERMENTATION BALANCES

A thorough evaluation of the pathways of carbohydrate fermentation requires qualitative identification of and quantitative accounting for the amount of products recovered. To assess the accuracy of the analytical determinations, a **carbon balance** or **carbon recovery** can be calculated, as shown in the sample fermentation in Table 11-1. Under a number of circumstances, the balance may not be ideal because some portion of the carbohydrate may be assimilated into cellular constituents or compounds other than the major substrate added may be utilized to form some portion of the recovered products.

Oxidation-reduction reactions play a major role in the fermentative metabolism of carbohydrates. It is, therefore, advisable to perform an **oxidation-reduction** or **O-R balance** on the products formed. The O-R balance provides an indication as to whether the formed products balance with regard to their oxidized or reduced states. It may not be possible to balance the hydrogen and oxygen of the substrate directly because hydrations or dehydrations may occur as intermediary steps in the fermentation pathway. However, a simple way to achieve the same end is to calculate an **oxidation**

Anexo 15: Biosíntesis de aminoácidos

Worrest Physiology, Albert G. Moss, John W. Foster and Michael P. Spencer
Copyright © 2010 by Wiley-Liss, Inc.
ISBN: 0-471-39481-1

CHAPTER 15

BIOSYNTHESIS AND METABOLISM OF AMINO ACIDS

Amino acid biosynthesis is discussed most conveniently in the context of families of amino acids that originate from a common precursor:

1. **Glutamate or α -Ketoglutarate Family.** Glutamate, glutamine, glutathione, proline, arginine, putrescine, spermine, spermidine, and in yeasts and molds, lysine. A tetrapyrrole (heme) precursor, δ -aminolevulinic acid, arises from glutamate in some organisms.
2. **Aspartate Family.** Aspartate, asparagine, threonine, methionine, isoleucine, and, in bacteria, lysine.
3. **Pyruvate Family.** Alanine, valine, leucine, and isoleucine.
4. **Serine-Glycine or Triose Family.** Serine, glycine, cysteine, and cystine. In yeasts and molds, mammals, and some bacteria, δ -aminolevulinic acid is formed by the condensation of glycine and succinate.
5. **Aromatic Amino Acid Family.** Phenylalanine, tyrosine, and tryptophan. Additional compounds that can originate from the common aromatic pathway include enterochelin, *p*-aminobenzoate, ubiquinone, menaquinone, and NAD.
6. **Histidine.** This amino acid originates as an offshoot of the purine pathway in that a portion of the histidine molecule is derived from the intact purine ring.

In some instances, it is convenient to discuss the catabolic pathways of the amino acids in conjunction with the discussion of their biosynthesis.

THE GLUTAMATE OR α -KETOGLUTARATE FAMILY

Glutamine and Glutathione Synthesis

The importance of glutamate as one of the primary amino acids involved in the assimilation of ammonia is discussed in Chapter 14. Glutamate and glutamine play a

Anexo 16: Arquitectura celular

Chapter 6

MICROBIAL CELL TYPE AND STRUCTURE

[This chapter represents part of the lectures given during lecture courses given at the Prince of Singkla University in Hat Yai, Thailand and the University of Veracruz at Orizaba, Mexico in the 1990s]

Content

1. Introduction
2. Prokaryotes and Eukaryotes

2.1 Prokaryotes

- 2.1.1 Cell structure and functions
- 2.1.2 Gram-negative aerobic chemoheterotrophic rods and cocci
- 2.1.3 Gram-negative aerobic chemolithotrophic rods and cocci
- 2.1.4 Facultative anaerobic gram-negative rods
- 2.1.5 Anaerobic gram-negative rods
- 2.1.6 Aerobic and microaerophilic gram-negative bacteria
- 2.1.7 Other gram-negative bacteria
- 2.1.8 Gram-positive bacteria
- 2.1.9 Non-sporing gram-positive rods
- 2.1.10 Anoxygenic photosynthetic bacteria
- 2.1.11 Oxygenic photosynthetic bacteria
- 2.1.12 Archaeobacteria
- 2.1.13 Actinomycetes

2.2 Eukaryotes

- 2.2.1 Cell structure and functions
- 2.2.2 Algae
- 2.2.3 Yeast
- 2.2.4 Fungi or Moulds

3. Osmoregulation
4. Structure of the Chromosome
5. Viruses
6. Bibliography

1. Introduction

One of the great unifying theories of biology is, that the cell is the fundamental unit of all living matter. A single cell is an entity, isolated from other cells by a cell wall or membrane and containing within it a variety of materials and subcellular structures. Cellular organisms share a common chemical composition, their most distinctive chemical attribute being the presence of three classes of complex macromolecules: deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA) and proteins. DNA is the constituent that carries in coded form all

Anexo 17: Metagenoma



Artículo de Revisión

Metagenómica: más allá del genoma de los microorganismos (*Metagenomics: beyond the genome of the microorganisms*)

Por Susana Gentil de Ramondi

sgentil@unc.edu.ar

Profesor Titular del Dpto. de Bioquímica Clínica, Investigador Independiente del OBIQ (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Resumen:

La "metagenómica literalmente" significa "más allá del genoma". A mediados de los años 80 los microbiólogos comenzaron a cambiar los conceptos de la microbiología clásica y a aceptar la idea de la existencia de una vasta vida de microorganismos no cultivables (99,8% no es cultivable) proponiendo la necesidad de disponer de técnicas no tradicionales para entender el mundo microbiano. Entre los métodos diseñados para acceder al conocimiento de la fisiología y genética de organismos no cultivables, la metagenómica se ha convertido en una poderosa herramienta de estudio. Se refiere al análisis funcional y de secuencia independiente de cultivo de toda la colección de genomas microbianos presentes en diferentes nichos o comunidades ambientales, plantas o animales (humano). En el presente artículo se describen algunos de los avances recientes alcanzados en la aplicación de la metagenómica al conocimiento de la biología humana y ambiental, particularmente a la comprensión del microbioma humano y su potencial uso como herramienta diagnóstica y terapéutica.

Abstract:

Metagenomics literally means "beyond the genome". In the mid-1980s, microbiologists began to change the concepts of traditional microbiology and to accept the idea of the existence of a vast life of uncultured microorganisms (99.8% is uncultured) proposing the need for non-traditional techniques to understand the microbial world. Among the methods designed to access the knowledge of the physiology and genetics of uncultured organisms, metagenomics has become a powerful tool of study. It refers to functional analysis and sequence independent of cultivation of the entire collection of microbial genomes present in different niches, environmental communities, plants or animals (man). The following article describes some of the recent advances achieved in the application of metagenomics to knowledge of human and environmental biology particularly to the understanding of the Human Microbiome and its potential use as a diagnostic and therapeutic tool.

Palabras clave

Metagenómica, organismos no cultivables, microbioma humano, ciclo del nitrógeno, microbiología

Metagenómica: una ventana de oportunidad a nuevos genes y genomas microbianos

Noheми Cortes-López¹, Juan Montor-Antonio¹, Clarita Olivera-Carranza², Julian Peña-Castro¹, Sandra del Moral-Ventura¹

División de Estudios de Posgrado¹, Instituto de Biotecnología²
 Universidad del Papaloapan, Universidad Nacional Autónoma de México
 Taxtepec, Oax.¹, Cuernavaca, Mor.², México
 {juy14_8, noga_cl}@hotmail.com, clarita@ibt.unam.mx, {smoral, juliapc}@upa.edu.mx

Abstract— Metagenomics is a novel tool for the study of microbial genes in a population. Discoveries made through its experimental framework include new antibiotics, genes, enzymes, protein structures, metabolic pathways and population dynamics of several habitats. Metagenomics studies have been performed in different human organs including intestine, mouth and skin and have found interesting relationships between health state and microbiota. In this work, the theoretical and technical bases of metagenomics are analyzed with special emphasis on the new possibilities to widen our current genomic knowledge and reach novel biotechnological applications.

Keywords— Metagenomics, microorganisms, genes, enzymes, biocatalysts.

Resumen— La metagenómica es una herramienta novedosa que estudia los genes microbianos de una población. Sus alcances han sido sorprendentes, ya que ha permitido el descubrimiento de nuevos antibióticos, genes, enzimas, estructuras proteicas y rutas metabólicas, así mismo ha permitido conocer la dinámica poblacional de diversos hábitats. En el humano se han realizado estudios metagenómicos en diversos órganos: intestino, boca, piel, etc., encontrando una relación importante entre el estado de salud del comensal y la microbiota localizada. En este trabajo, se analizan los fundamentos teóricos y técnicos de la metagenómica y las posibilidades que ofrece de ampliar el conocimiento genómico actual y la obtención de aplicaciones biotecnológicas novedosas.

Palabras claves— Metagenómica, microorganismos, genes, enzimas, biocatalizadores.

I. INTRODUCCION

Los microorganismos son una fuente importante de productos y procesos biotecnológicos. Hasta hace unos años, estos procesos se basaban en el análisis de las capacidades metabólicas de los microorganismos que podían ser cultivados en el laboratorio mediante técnicas microbiológicas tradicionales. Los métodos clásicos de cultivo sólo permiten recuperar entre el 0.1 y el 10% de los microorganismos ambientales (microorganismos cultivables) [1, 2, 3]. Lo anterior se debe a que se desconocen los requerimientos nutricionales necesarios de todos ellos, las condiciones fisicoquímicas precisas de su ambiente natural y la información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que se mantienen en una comunidad microbiana [1, 4, 5]. Debido a esta problemática, se han buscado metodologías alternativas para determinar la diversidad de una población que no dependan del cultivo de microorganismos sino del estudio y análisis de su información genética. Un método pionero fue el análisis del gen 16S mediante el uso de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y de técnicas electroforéticas como DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización), ARDRA (Análisis de Restricción de ADN Ribosomal Amplificado), RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), RADP (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), entre otras [6].

La evolución metodológica de las técnicas de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, secuenciación y de ensamblado de secuencias, han hecho posible el desarrollo de una metodología alternativa: la metagenómica. La metagenómica es el análisis del metagenoma, el cual es el conjunto del

Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos

Biotechnological applications of microorganisms

Olga Lucía Otero Ortiz¹, Sonia Marcela Rosas Arango¹, Johanna Lisseth González Devia¹

Resumen

La biodiversidad de los microorganismos así como la naturaleza única y las capacidades biosintéticas en condiciones ambientales específicas hacen que los microorganismos sean los probables candidatos para resolver problemas de escases de alimentos, control de plagas, biodegradación de los xenobióticos, descomposición de la basura, las pilas de desechos producidas, entre otros.

Los microorganismos ofrecen un gran potencial para la exploración de moléculas y procesos, y el conocimiento de las especies no convencionales, especialmente dentro del grupo Archaea, ha estimulado la investigación molecular de genes de interés. Estos nuevos genes pueden incorporarse mediante tecnología recombinante en especies biológicamente conocidas, como *E. coli* y *S. cerevisiae*, para la síntesis a gran escala de productos.

La microbiología tecnológica tiene grandes potenciales para explorar y obstáculos por superar. Por lo tanto, solo la investigación en esta área resulta prometedora para científicos en todo el mundo.

En la presente revisión se presentan las aplicaciones más significativas de los microorganismos en la industria de alimentos, la agricultura, compuestos químicos, combustibles, farmacología y materiales.

Palabras claves: biotecnología, microbiología de alimentos, biocombustibles, vacunas, biopolímeros, biosensores, microbiología ambiental, biofábricas.

¹ Unidad de Investigación Universidad Santo Tomás, Bogotá, Colombia.

ORCID: O.L.O. <https://orcid.org/0000-0002-6477-9670>

ORCID: S.M.A. <https://orcid.org/0000-0002-4799-1753>

ORCID: J.G.D. <https://orcid.org/0000-0003-4180-6676>

Correspondencia: olga.otero.ortiz@gmail.com

Anexo 20: Microbiodiversidad



Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 4 (2): 284-317. Julio-Diciembre, 2013
<http://www.rvcta.org>
ISSN: 2218-4384 (versión en línea)
© Asociación RVCTA, 2013. RIF: J-29910863-4. Depósito Legal: ppi201002CA3536.

Revisión

Importancia biotecnológica de la microbiodiversidad. Los nuevos cazadores de microbios

Biotechnological importance of the microbiodiversity. The new hunters of microbes

Judith Piñero Bonilla

Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez". Ingeniería de Alimentos. Carretera Bejuma-Urama, Sector Los Naranjos, Parroquia Canoabo, Municipio Bejuma, Estado Carabobo, Venezuela.

Correspondencia: unesrcanoabo@gmail.com

Aceptado 20-Diciembre-2013

Resumen

El objetivo de este trabajo está orientado a destacar la importancia biotecnológica de los microorganismos con especial referencia al área alimentaria y agrícola, en el contexto histórico y latinoamericano. Los microorganismos han sido recursos valiosos para la humanidad desde que el hombre comenzó a producir sus alimentos artesanalmente incorporando los procesos fermentativos para la transformación de las materias primas o consumiéndolos directamente. Ya en el siglo XIX, con la ayuda del microscopio se empiezan a entender los principios que rigen estos bioprocesos y los estudios posteriores permitieron determinar la utilidad de los microorganismos y su potencial económico para la producción de insumos comercializables, lo que condujo al desarrollo de la microbiología industrial, la base de la biotecnología, la cual se ha ido fortaleciendo con el uso de las herramientas de la ingeniería genética y de las técnicas de la biología molecular con las que se ha podido detectar e identificar una gran variedad de microorganismos incluso de ambientes extremos en los que los métodos de cultivo convencionales han fallado. El potencial encontrado en la microbiodiversidad es parte de una importante actividad científica conocida como bioprospección, para seleccionar los microorganismos con características que le confieran valor comercial. De esta manera, la búsqueda se ha dirigido principalmente hacia los organismos productores de insumos agrícolas, farmacológicos y alimentarios así como su aplicación en actividades de biorremediación. En este sentido, los microorganismos representan un aporte significativo para la ciencia y la economía de los países latinoamericanos, por lo que algunos de ellos y según sus necesidades, han desarrollado líneas

Anexo 22: Metabolismo microbiano

A LOOK AT

MICROBIAL METABOLISM

Microorganisms are the most abundant life form on earth — both in the number of species and quantity and weight of living organisms. They have a history spanning over 3.5 billion years and have evolved to adapt to a wide range of environmental conditions and to survive with diverse sources of carbon and energy. Microorganisms are so named because they are usually too small to see with the naked eye (which is about a tenth of a millimeter).

In a typical gram of sediment, there are thousands of species of microorganisms and billions of individual organisms. In soils and sediments, microbes play a key role in the degradation of stems, leaves, and roots of plants — leading to the endless cycling of carbon and nitrogen between the atmosphere and terrestrial biosphere. Microorganisms are also present at great depths below the land surface. Recent studies have shown that aquifers and oil reservoirs are inhabited by a diverse assemblage of microorganisms that have learned to live in harsh conditions where it is hot, salty, and food is in short supply.

Microorganisms span the three domains of life: Bacteria, Eukarya, and the recently recognized Archaea. These three domains are divided according to the structure of their cells. The cells of higher animals and plants are eukaryotic and have a true nucleus. The members of multicellular organisms are eukaryotic microorganisms. Eukaryotic microorganisms include algae, fungi, and protozoa. Bacteria and archaea, however, do not have a discrete nucleus and are called, collectively, prokaryotes. Most prokaryotes are one-celled organisms, whereas eukaryotes may be one-celled or more complex, multicellular organisms.

Microorganisms also can be categorized according to their respiratory metabolic processes and sources of nutrition. This classification can be used to characterize their bioremediation potential. Some microorganisms, aerobes, require oxygen to grow, while others, anaerobes, are able to grow in environments devoid of available oxygen. Some organisms will grow on the simplest sources of carbon such as methane, while others will only grow on more complex carbon substrates. In sediment and groundwater systems, there is a large diversity of organic molecules that can provide a source of carbon for microbial growth. In addition to carbon, microorganisms also need electron donors and acceptors. Some metals and radionuclides can act as these donors and acceptors. Enzymatically catalyzed transfer of electrons (by oxidation and reduction reactions) between donors and acceptors releases energy for carrying out biochemical reactions. Microbial metabolism can play an important part in transformations of metals and radionuclides, changing the form or speciation of these contaminants.

Bioremediation is a technology that uses metabolic processes to degrade or transform contaminants so that they are no longer in a harmful form. In some cases the contaminant is a primary part of the metabolic process, acting as the main source of carbon and energy for the cell. In others, it is transformed while a second substance serves as a primary energy or carbon source. This cometabolism process may be purely fortuitous, and the microorganism gains nothing from the process. Contaminant degradation may result in daughter products that can be metabolized or in ones that persist.

Transformation of metals and radionuclides proceeds somewhat differently. Although they cannot be sources of carbon, metals and radionuclides can provide energy, and they can also

¹ For more information about how scientists identify microorganisms, see the feature "Who's Out There? Identifying Microbial Species that Live in the Subsurface" on page 29.

Anexo 23: Bacterias bioluminiscientes

BOX 18.4 THE BIOCHEMISTRY OF BACTERIAL LUMINESCENCE

The overall reaction

Luminous bacteria produce blue-green light when they simultaneously oxidize reduced riboflavin-5'-phosphate (FMNH₂) and a long-chain aldehyde (e.g., C₁₂) (RCHO, tetradecanal), with oxygen. The reaction is catalyzed by a flavin monooxygenase called *bacterial luciferase*, as follows:



Light is emitted because during the reaction the flavin becomes electronically excited and subsequently fluoresces as the electron returns to its ground state. (In certain bacterial strains there may be a second chromophore, bound to a second protein that emits light.) This is a complicated reaction. Of the two oxygen atoms in O₂, one becomes reduced to water while the other is incorporated into the carboxyl group of the carboxylic acid.

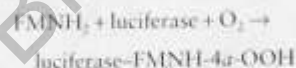
The bioluminescent pathway is illustrated schematically in Fig. 18.33. The figure points out that for luminescence to continue, both FMNH₂ and RCHO must be regenerated. The aldehyde (RCHO) is regenerated from the carboxylic acid (RCOOH) via reduction by NADPH, catalyzed by a fatty acid reductase complex consisting of three proteins (a transferase, a reductase, and a synthetase). The FMNH₂ is regenerated by the reduction of FMN by NADH, catalyzed by an NADH-FMN oxidoreductase (flavin reductase). Notice that the luciferase pathway can be viewed as a shunt leading from the cytochrome respiratory chain, and from this point of view is energetically costly.

The biochemistry of light emission

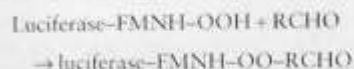
During the luminescent reaction, oxygen reacts with FMNH₂ (bound to the luciferase) to form a flavin-4a-hydroperoxide

(FMNH-4a-OOH). (See concluding equations and Fig. 18.34.) The flavin hydroperoxide then reacts with the aldehyde to form a postulated peroxyhemiacetal intermediate, which decomposes to the carboxylic acid and an enzyme-bound flavin-4a-hydroxide (flavin-4a-OH) with an excited electron. When the electron returns to the ground state, fluorescence occurs.¹ At some point, water is eliminated from the flavin-4a-hydroxide producing FMN. The reactions shown in Fig. 18.34 can be summarized as follows:

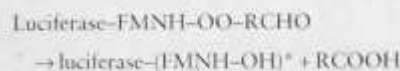
Formation of peroxide



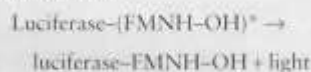
Binding of aldehyde



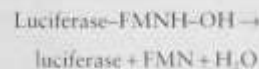
Oxidation of aldehyde



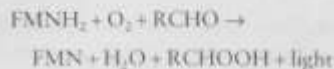
Emission of light



Elimination of water



Sum



REFERENCE

1. Kurtzner, M., P. Macheroux, S. Ghisla, and J. W. Hastings. 1987. Isolation and characterization of the transient, luciferase-bound flavin-4a-hydroxide in the bacterial luciferase reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 924:104-110.

Anexo 24: Perspectiva histórica del ciclo del ácido cítrico

216

THE PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF PROKARYOTES

BOX 8.3 HISTORICAL PERSPECTIVE: THE CITRIC ACID CYCLE

During the first decades of the twentieth century, there was considerable effort by biochemists to understand how animal tissues oxidized carbohydrates to carbon dioxide and water. Between 1910 and 1920, it was learned that anaerobic suspensions of minced animal tissue transfer hydrogen from the dicarboxylic acids succinate, fumarate, malate, and the tricarboxylic acid citrate to methylene blue, reducing it to a colorless form. The enzymes catalyzing these reactions were named "dehydrogenases."

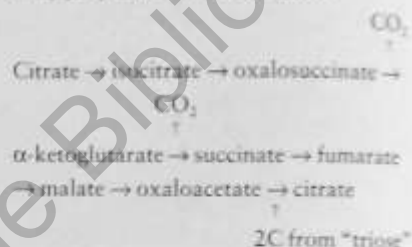
Szent-Györgyi

What people wanted to understand was the link between carbohydrate degradation and the electron transport chain, called the cytochrome-cytochrome oxidase system. It was suspected that the carboxylic acids provided the link. In 1935 the Hungarian-born scientist Albert Szent-Györgyi discovered that small amounts of fumarate, malate, or succinate, caused oxygen uptake by minced pigeon breast muscle far in excess of that which would be required to completely oxidize the carboxylic acids to carbon dioxide and water. (He determined the ratio of CO_2 produced to O_2 consumed, called the respiratory quotient.) He concluded that the carboxylic acids were acting catalytically and stimulating the oxidation of an endogenous carbohydrate, presumably glycogen or a product derived from glycogen, in the muscle tissue. Szent-Györgyi also showed that malonate, previously shown to be an inhibitor of succinate dehydrogenase, inhibits the respiration of muscle suspensions.

Krebs

In 1937, H. A. Krebs and W. A. Johnson published their classic paper on the citric acid cycle. They postulated the cycle on the

basis of results published earlier by others, including Szent-Györgyi, and their own experimental results with minced pigeon breast muscle, especially the finding that citrate catalytically stimulates respiration. They proposed that citrate is converted first to α -ketoglutarate and then to succinate, and that oxaloacetate is converted to citrate by the addition of two carbons from an unidentified donor termed "triose": (Refer to Fig. 8.1.) They proposed "citric acid cycle":



In their summary they conclude:

Citric acid catalytically promotes oxidations in muscle, especially in the presence of carbohydrate. The rate of the oxidative removal of citric acid from muscle was measured. The maximum figure for Q_{citrate} observed was -16.9. α -Ketoglutaric acid and succinic acid were found as products of the oxidation of citric acid. These experiments confirm Martius and Knoop's results obtained with liver citric dehydrogenase. Oxaloacetic acid, if added to muscle, condenses with an unknown substance to form citric acid. The unknown substance is in all probability a derivative of carbohydrate. The catalytic effect of citrate as well as the similar effects of succinate, fumarate, malate and oxaloacetate described by Szent-Györgyi and by Stare and Baumann are explained by the series of reactions summarized [elsewhere]. The quantitative data suggest that the "citric acid cycle" is the preferential pathway through which carbohydrate is oxidized in animal tissues.

Hans Krebs was born in Germany in 1900 and worked there until 1933, when he

Anexo 25: Síntesis de triptófano

Dirección General de Bibliotecas UAQ

PROBLEMS, PROSPECTS

Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for L-Tryptophan Production

V. B. Panichkin*, V. A. Livshits, I. V. Biryukova, and S. V. Mashko

Mimomoti-Genetika Research Institute (AGRI), Moscow, 117545 Russia

*e-mail: vladimir_panichkin@agri.ru

Received March 17, 2016

Abstract—The review summarizes the main approaches applied during the creation of L-tryptophan-producing strains based on *Escherichia coli* for the industrial production of this amino acid. In addition, some prospects for the further improvement of tryptophan producers to increase their productivity and improve their technological characteristics based on systems metabolic engineering approaches are outlined in the review. These approaches can be used to improve the producers of other aromatic amino acids and tryptophan precursors or derivatives.

Keywords: metabolic engineering, producer, L-tryptophan, stress resistance, *Escherichia coli*

DOI: 10.1134/S0003683816090052

L-tryptophan (subsequently tryptophan) is a hydrophobic aromatic amino acid with an indole side chain. Of the 20 main proteinogenic amino acids, tryptophan (along with cysteine) is least found in the proteins of living organisms; in eukaryotic proteins, it is found less frequently than any other amino acid [1]. Its average content in human proteins is approximately 1.3%; its frequency is approximately the same or slightly lower in the proteins of agricultural animals and birds. The tryptophan content varies in plant seed proteins: it is significantly lower in the storage proteins of some cereals than in animal proteins (for example, approximately 0.7% in maize zein); however, the tryptophan content reaches 2% in the proteins of certain legumes and nuts [2].

Tryptophan is an essential amino acid; that is, it is not synthesized in humans or other animals and must be delivered via food or food [3]. The human daily need of this amino acid was determined to be 4–5 mg/kg body weight [4].

Tryptophan performs many important functions in humans and animals. Tryptophan delivered in the organism is used for both protein synthesis and other purposes: based on tryptophan, several compounds (such as serotonin, melatonin, niacin, and kynurenine) that play diverse and important roles in humans and animal vital functions are generated [5, 6]. In particular, a serotonin neurotransmitter (which is occasionally called the “happiness hormone”) is involved in the functions of the central nervous system (CNS), including the determination of mood, excitation, aggression, pain, sleep, memory, food and motor activity, control of body temperature, and endocrine regulation. In this regard, dietary tryptophan additives are considered a promising means for the complex therapy of many nervous and mental diseases. The conditions and factors that influence the efficiency of tryptophan during its use in indicated cases continue to be studied [4, 7, 8].

Abbreviations: 3PG, 3-phosphoglycerate; AcCoA, acetyl-coenzyme A; ADP, adenosine diphosphate; ANTA, anthranilate; ASA, aspartate-4-semialdehyde; Asp, L-asparagine; Asp-P, β -aspartyl phosphate; ATP, adenosine triphosphate; CAC, citric acid cycle; acAMP, cyclic adenosine monophosphate; CHA, chorismate; CNS, central nervous system; CoASH, coenzyme A reduced; DAHP, 3-deoxy-D-arabino-heptulosate 7-phosphate; DHA, dihydroxyacetone; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; DHQ, 3-dehydroquininate; DHS, 3-dehydroshikimate; DKFP, 6-deoxy-5-keto-fructose-1-phosphate; DTHDA, 3,7-dideoxy-D-ribose-hept-7,6-diolonate; E4P, erythrose-4-phosphate; EMP pathway, Embden-Meyerhof-Parnas glycolysis pathway; EPSP, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; F1,6P, D-fructose 1,6-bisphosphate; F1P, D-fructose 1-phosphate; F6P, β -D-fructose-6-phosphate; FADH₂, flavin adenine dinucleotide reduced; FMN, flavin mononucleotide reduced; G6P, β -D-glucose 6-phosphate; GA, galate; GA3P, D-glyceraldehyde 3-phosphate; Glu, L-glutamine; Glu, L-glutamate; HS, homoserine; Ind, indole; KDPGal, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; Lys, L-lysine; Met, L-methionine; MG, methylglyoxal; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide oxidized; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide reduced; NADP⁺, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced; OAA, oxaloacetate; P_i, inorganic phosphate; PCR, polymerase chain reaction; PEP, phosphoenolpyruvate; Phe, L-phenylalanine; PPA, prephenate; PP_i, pyrophosphate; PPP, pentose phosphate pathway; PRPP, 5-phospho- α -D-ribose 1-diphosphate; PTS, phosphotransferase system; Pyr, pyruvate; QA, quininate; Rib5P, ribose-5-phosphate; ROS, reactive oxygen species; Rd5P, ribulose-5-phosphate; S3P, shikimate 3-phosphate; SA, shikimate; Sed7P, sedoheptulose-7-phosphate; Ser, L-serine; Thr, L-threonine; Trp, L-tryptophan; Tyr, L-tyrosine; Xyl5P, xylulose-5-phosphate.

Opinion

Metabolic Engineering of TCA Cycle for Production of Chemicals

Kira S. Vuoristo,¹ Astrid E. Mars,² Johan P.M. Sanders,² Gerrit Eggink,^{1,2} and Ruud A. Weusthuis^{1,*}

The tricarboxylic acid (TCA) cycle has been used for decades in the microbial production of chemicals such as citrate, L-glutamate, and succinate. Maximizing yield is key for cost-competitive production. However, for most TCA cycle products, the maximum pathway yield is lower than the theoretical maximum yield (Y^P). For succinate, this was solved by creating two pathways to the product, using both branches of the TCA cycle, connected by the glyoxylate shunt (GS). A similar solution cannot be applied directly for production of compounds from the oxidative branch of the TCA cycle because irreversible reactions are involved. Here, we describe how this can be overcome and what the impact is on the yield.

Microbial Production of Chemicals from the TCA Cycle

The depletion of the fossil energy resources of the Earth, accompanied by their impact on the environment, has raised the demand to replace oil-based chemicals with biomass-based alternatives. Over the years, strategies to couple wild-type strains together with rational metabolic-engineering techniques have been developed to create high-performance microorganisms that convert inexpensive substrates into value-added chemicals, fuels, and polymers [1,2].

The TCA cycle is one of the major biochemical hubs of the cell. It has two main functions: generation of energy and synthesis of precursors. When a terminal electron acceptor is present, it functions as a true cycle, oxidizing substrate to CO_2 and generating NADH for respiration. Intermediates of the TCA cycle are used as precursors for anabolism. The latter is the only remaining function of the TCA cycle when no terminal electron acceptor is available. In this case, the TCA cycle is not functioning as a cycle, but as two separate branches: the reductive branch from oxaloacetate to succinyl-co-enzyme A (CoA) and the oxidative branch from citrate to 2-oxo-glutarate (Figure 1A).

The ability to synthesize building blocks has been used for decades by the fermentation industry to produce chemicals such as citric acid [3] and L-glutamic acid [4] (Figure 1A). More recently, it has been applied in the production of new chemicals, such as succinic acid [5], itaconic acid [5,7], and 1,4-butanediol [5]. These chemicals have to be cost-competitive with analogs made from fossil resources. Maximizing yield is one of the key elements to achieve this. However, the maximum attainable pathway yield of some TCA cycle products is currently lower than the theoretical maximum yield (Y^P).

Maximum Pathway Yields Are Lower than Theoretical Maximum Yields

For each substrate-product combination, there is a maximum amount of product that can be formed from the substrate. This Y^P is based on elemental balancing and can be calculated from

Trends

The TCA cycle is a source of industrially important chemicals.

Current pathway yields of chemicals from the TCA cycle are below their theoretical maximum (Y^P).

Y^P becomes achievable by combining the oxidative and reductive part of the TCA cycle.

Metabolic engineering is required to reverse some of the thermodynamically unfavorable steps.

Bioprocess Engineering, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands; PO Box 16, 8700 AA, Wageningen, The Netherlands.

Substrate Products, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands.

*Correspondence: ruud.weusthuis@wur.nl (R.A. Weusthuis).

Metabolic Engineering of the Purine Pathway for Riboflavin Production in *Ashbya gossypii*[†]

Alberto Jiménez,¹ María A. Santos,¹ Markus Pompejus,²
 and José L. Revuelta^{1*}

Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain,¹ and BASF-Aktiengesellschaft, GFP/C-430, 67056 Ludwigshafen, Germany²

Received 18 April 2005/Accepted 25 May 2005

Purine nucleotides are essential precursors for living organisms because they are involved in many important processes, such as nucleic acid synthesis, energy supply, and the biosynthesis of several amino acids and vitamins such as riboflavin. GTP is the immediate precursor for riboflavin biosynthesis, and its formation through the purine pathway is subject to several regulatory mechanisms in different steps. Extracellular purines repress the transcription of most genes required for de novo ATP and GTP synthesis. Additionally, three enzymes of the pathway, phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) amidotransferase, adenylosuccinate synthetase, and IMP dehydrogenase, are subject to feedback inhibition by their end products. Here we report the characterization and manipulation of the committed step in the purine pathway of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. We report that phosphoribosylamine biosynthesis in *A. gossypii* is negatively regulated at the transcriptional level by extracellular adenine. Furthermore, we show that ATP and GTP exert a strong inhibitory effect on the PRPP amidotransferase from *A. gossypii*. We constitutively overexpressed the *AgADE4* gene encoding PRPP amidotransferase in *A. gossypii*, thereby abolishing the adenine-mediated transcriptional repression. In addition, we replaced the corresponding residues (aspartic acid²¹⁰, lysine²³³, and alanine⁴³⁷) that have been described to be important for PRPP amidotransferase feedback inhibition in other organisms by site-directed mutagenesis. With these manipulations, we managed to enhance metabolic flow through the purine pathway and to increase the production of riboflavin in the triple mutant strain 10-fold (228 mg/liter).

Purine nucleotides are essential for living organisms because they are precursors for DNA and RNA synthesis. Additionally, purine nucleotides participate in the energy supply through ATP formation, and they are involved in other important anabolic pathways, such as the biosynthesis of several amino acids and vitamins such as folic acid and riboflavin (12, 25).

The de novo purine biosynthetic pathway (Fig. 1) leads to the conversion of phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) to IMP through 10 different enzymatic steps. IMP is subsequently converted to AMP or GMP in two successive enzymatic reactions catalyzed by specific enzymes for each nucleoside (19). Alternatively, purines (adenine, guanine, xanthine, and hypoxanthine) can be transformed to their nucleoside monophosphate derivatives through the salvage pathways (Fig. 1), with the consumption of PRPP (19). Purine biosynthesis is a tightly regulated pathway at the transcriptional and metabolic levels. First, extracellular purines negatively regulate the transcription of most genes encoding enzymes required for de novo AMP and GMP synthesis (4, 7, 15). Second, the three enzymes PRPP amidotransferase, which transforms PRPP to phosphoribosylamine (PRA); adenylosuccinate (sAMP) synthetase, which catalyzes the formation of sAMP; and IMP dehydrogenase, which converts IMP to XMP, are subjected to feedback inhibition

by their end products (10, 11, 35). These coordinated regulatory mechanisms allow cells to maintain the pool of intracellular purine nucleotides under strict control in response to extracellular signals.

The PRPP amidotransferase is the rate-limiting enzyme in the de novo pathway of IMP biosynthesis; it is repressed at transcriptional level by extracellular purines and is inhibited by purine nucleotides (4, 5, 10, 15, 36).

In *Saccharomyces cerevisiae*, it has been shown that a complex formed between the transcription factors Bas1 and Bas2 (Pho2) activates the expression of the *ADE4* gene, encoding PRPP amidotransferase (4, 39). Additionally, in *S. cerevisiae* *ADE4* expression is controlled by the transcriptional activator Gcn4, which stimulates transcription in response to amino acid starvation through a mechanism called the "general control" of amino acid biosynthesis of yeast (17).

The activity of the PRPP amidotransferase is regulated by feedback inhibition through the specific binding of adenine and guanine ribonucleotides to certain previously determined residues (18, 30). Furthermore, one catalytic center and one allosteric center in the PRPP amidotransferase from *Escherichia coli* have been described, where directed mutagenesis of lysine²³⁶ or proline⁴¹² (40, 41) or glutamic acid²⁰⁴ (M. Pompejus, personal communication) severely affects the affinity of AMP and GMP for their binding sites, abolishing their inhibitory properties and releasing PRPP amidotransferase from the feedback regulation.

As mentioned above, purine synthesis is closely related to other biosynthetic pathways such as that for riboflavin (vitamin B₂) production. Accordingly, substrate availability is the limit-

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: 34 923 294671. Fax: 34 923 224876. E-mail: revuelta@uss.es.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.



Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via β -alanine

Irina Borodina^{a,*}, Kanchana R. Kildegaard^a, Niels B. Jensen^a, Thomas H. Blicher^b, Jérôme Maury^c, Svetlana Sherstyk^a, Konstantin Schneider^a, Pedro Lamosa^c, Markus J. Herrgård^d, Inger Rosenstand^a, Fredrik Öberg^a, Jochen Forster^a, Jens Nielsen^{a,d}

^a The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, DK-2800, Denmark

^b The Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research, University of Copenhagen, Artillerivej 5B, DK-2300 Copenhagen S, Denmark

^c CIMEX, Centro de Investigación Magallánica Avícola Sotera, ITQB-Instituto de Tecnología Química e Biología, Av. de los Patricios 2000, Apartado 127, 5750-000 Odean, Portugal

^d Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, Kemistegatan 115E-412 96 Göteborg, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2014

Received in revised form

24 September 2014

Accepted 14 October 2014

Available online 23 October 2014

Keywords:

Biosustainable acrylics

3-hydroxypropionic acid

Saccharomyces cerevisiae

β -alanine

β -alanine-pyruvate aminotransferase

ABSTRACT

Microbial fermentation of renewable feedstocks into plastic monomers can decrease our fossil dependence and reduce global CO₂ emissions. 3-Hydroxypropionic acid (3HP) is a potential chemical building block for sustainable production of superabsorbent polymers and acrylic plastics. With the objective of developing *Saccharomyces cerevisiae* as an efficient cell factory for high-level production of 3HP, we identified the β -alanine biosynthetic route as the most economically attractive according to the metabolic modeling. We engineered and optimized a synthetic pathway for *de novo* biosynthesis of β -alanine and its subsequent conversion into 3HP using a novel β -alanine-pyruvate aminotransferase discovered in *Beauveria cinerea*. The final strain produced 3HP at a titer of 13.7 ± 0.3 g L⁻¹ with a 0.14 ± 0.0 g C₃ mol⁻¹ yield on glucose in 30 h in controlled fed-batch fermentation in minimal medium at pH 7, and this work therefore lays the basis for developing a process for biological 3HP production.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. On behalf of International Metabolic Engineering Society. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

1. Introduction

3-Hydroxypropionic acid (3HP) is a platform chemical, which can be converted into acrylic acid, 1,3-propanediol, malonic acid, biodegradable polyesters, and other valuable chemicals. In 2011 the world annual production of acrylic acid was 5000 kMT and the market size was USD 11.5 billion ("Acrylic Acid Market – Global Industry Analysis 2012–2018", Research and Markets, July 2013). Acrylic acid-derived products include superabsorbent polymers used in baby diapers and incontinence products, plastics, coatings, adhesives, elastomers, and paints. Currently, acrylic acid is primarily made by catalytic oxidation of propene. Establishment of 3HP production from glucose or other renewable carbon sources would provide a biosustainable alternative to acrylic acid production from fossil resources.

Several methods for biological production of 3HP have been described. Bacterial or fungal hosts can be used, where fungal hosts have the advantage of tolerance to low pH (3HP has a pKa value of 4.5), therefore enabling a more economical process without the

need for neutralization during fermentation and acidification on product recovery. An attractive fungal host is baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, which is already used in several industrial processes for production of chemicals such as first and second generation bioethanol, succinate, isobutanol, resveratrol, arthropadiene and others (Borodina and Nielsen, 2014; Hong and Nielsen, 2012; Tippmann et al., 2013). Moreover, *S. cerevisiae* can be engineered for tolerance to high concentrations of 3HP, thus making a robust production strain (Kildegaard et al., 2014).

In biological systems, 3HP can be synthesized via at least four different intermediates: glycerol, lactate, malonyl-CoA or β -alanine (Kumar et al., 2013). Glycerol conversion to 3HP via glycerol dehydratase and aldehyde dehydrogenase by engineered *Escherichia coli* and native and engineered *Alcaligenes* strains has been reported most extensively (Rowak et al., 2012; Rathnasingh et al., 2009; Luo et al., 2012; Luo et al., 2011; Patrick et al., 2005; Sothers and Cameron, 2005). The application of the glycerol route in *S. cerevisiae* is challenging because glycerol dehydratase is dependent on co-factor vitamin B₁₂, which is not naturally synthesized by *S. cerevisiae*. Expression of active enzymes for conversion of lactate into 3HP has been described (Cohen et al., 2012). However, this route is thermodynamically unfavorable (Henry et al., 2010) and likely to result in a mixture of

* Corresponding author.

E-mail address: irina@biocenter.dtu.dk (I. Borodina).

Anexo 29: El switch del acetato

MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Mar. 2005, p. 12-56
1092-2172/05/306-00-00 doi:10.1128/MMBR.69.3.12-56.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 69, No. 1

The Acetate Switch

Alan J. Wolfe*

Department of Microbiology and Immunology, Stritch School of Medicine, Loyola University Chicago, Maywood, Illinois

INTRODUCTION.....	13
Definitions.....	13
The Physiological "Switch": Three Examples.....	13
Shake flask culture: glucose.....	14
Shake flask culture: tryptone.....	14
Glucose-fed high-cell-density fermentation.....	14
Short History.....	14
Scope.....	14
LIFE IN THE COLON.....	15
WHY CELLS EXCRETE ACETATE.....	15
Limiting the Tricarboxylic Acid Cycle.....	15
Recycling Coenzyme A.....	17
Regenerating NAD ⁺	17
Environmental Influences.....	17
Excretion Pathways.....	18
Acetate as an Acid.....	19
ACETATE ACTIVATION PATHWAYS.....	19
Acetate Dissimilation: the PTA-ACKA Pathway.....	19
Mutant phenotypes.....	19
Expression profile.....	20
Acetate Assimilation: AMP-Forming ACS.....	21
Mutant phenotypes.....	21
Glyoxylate bypass and gluconeogenesis.....	22
Expression profile.....	22
REGULATION OF THE ACETYL-P POOL.....	22
Expression and Activity of the PTA-ACKA Pathway.....	23
Availability of Pathway Substrates.....	23
Measurements of the Acetyl-P Pool.....	23
ACETYL-P AS A GLOBAL SIGNAL.....	24
Energy Source for Transport.....	24
Function in Signal Transduction.....	25
Evidence in vitro.....	26
Evidence in vivo.....	26
(i) Chemotaxis.....	26
(ii) Nitrogen assimilation.....	27
(iii) Phosphate assimilation.....	27
(iv) Outer membrane porin expression and other OmpE-dependent behaviors.....	28
(v) Implications for biofilm development and pathogenesis.....	28
(vi) Implications for metabolic engineering.....	29
How Does Acetyl-P Work?.....	30
What Does Acetyl-P Signal?.....	31
Characteristics of BRs That Respond to Acetyl-P In Vivo.....	31
Other Acetyl-P-Forming Enzymes.....	31
Pyruvate oxidase.....	31
Sulfocetaldehyde acetyltransferase.....	32
Phosphoacetylase.....	32
Glycine reductase.....	33
*FLIPPING THE SWITCH: REGULATING <i>acs</i> TRANSCRIPTION.....	33
Expression Profile.....	33
<i>acs</i> Operon and Promoter Architecture.....	33
Independent Regulation of Overlapping Promoters.....	33

* Mailing address: Department of Microbiology and Immunology,
Stritch School of Medicine, Loyola University Chicago, Maywood, IL
60553, Phone: (708) 216-5314; Fax: (708) 216-4574, E-mail: awolfe@luc.edu.



Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous $\Delta 12$ desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG

Yuval Kaye^{a,*}, Omer Grundman¹, Stefan Leu, Aliza Zarka, Boris Zorin, Shoshana Didi-Cohen, Inna Khozin-Goldberg^{**}, Sammy Boussiba

^aMicroalgal Biotechnology Laboratory, French Associates Institute for Agriculture and Biotechnology of Drylands, the J. Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boker Campus 84950, Israel

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 September 2014
Received in revised form 28 February 2015
Accepted 2 May 2015
Available online 2 June 2015

Keywords:
Microalgae
Eustigmatophyceae
Long-chain polyunsaturated fatty acids
Genetic engineering
Nitrogen starvation

ABSTRACT

Nannochloropsis oceanica is an important source for omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) such as eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5 n – 3), and a potent candidate for biofuel production, due to its outstanding capability for rapid induction of triacylglycerol (TAG) overproduction. In contrast to membrane lipids, TAG of *N. oceanica* is poor in the valuable LC-PUFA, EPA. We identified, cloned and characterized a *N. oceanica* microsomal-like $\Delta 12$ desaturase (NoD12) mediating the committing step of LC-PUFA biosynthesis by converting oleic acid (18:1 n – 7) to linoleic acid (LA; 18:2 n – 6). We generated strains of *N. oceanica* overexpressing NoD12 under the control of the stress-inducible endogenous lipid droplet surface protein (LDSP) promoter, resulting in robust expression under nitrogen starvation conditions. The overexpression of NoD12 significantly altered fatty acid composition of total lipids and of individual lipid classes, such as a drastic increase in 18:2 proportion in phosphatidylcholine and in TAG was observed under nitrogen starvation. Some LA was converted further toward LC-PUFA resulting in a substantial increase in arachidonic acid (20:4 n – 6) in TAG. Our data demonstrate the feasibility of metabolic engineering to increase LC-PUFA content in the biotechnologically important microalga using native genes and promoters, and provide novel insights into the regulation of LC-PUFA flux to TAG under nitrogen starvation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Planktonic heterokont microalgae of the genus *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae [1]) represented by several members [2–7], belong to the phylum Stramenopiles, together with other taxa of nonphotosynthetic protists and algae, such as diatoms and brown algae [2,8] (<http://tolweb.org/Eukaryotes/3>). These algae are assumed

Abbreviations: LC-PUFA, long-chain polyunsaturated fatty acid; OA, oleic acid; LA, linoleic acid; AA, arachidonic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; TAG, triacylglycerol; CoA, coenzyme A; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; DGTS, diacylglycerol trimethylselenosulfate; NoD12, *Nannochloropsis oceanica* microsomal $\Delta 12$ desaturase; LDSP, lipid droplet surface protein.

* Correspondence to: Y. Kaye, Department of Plant Biology, Carnegie Institution for Science, Stanford, CA, USA.

** Correspondence to: I. Khozin-Goldberg, Microalgal Biotechnology Laboratory, French Associates Institute for Agriculture and Biotechnology of Drylands, the J. Blaustein Institute for Desert Research, Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boker Campus 84950, Israel.

E-mail addresses: ykaye@carnegiescience.edu (Y. Kaye), ikhazin@bga.ac.il (I. Khozin-Goldberg).

¹ Contributed equally to this work.

to have a common evolutionary origin in the secondary endosymbiosis of red algae with a heterotrophic eukaryote [8,9]. Due to these evolutionary events, the plastids of Stramenopile algae are surrounded by four membranes [10,11].

Nannochloropsis species inhabit a wide range of marine and freshwater ecosystems, indicating their diversity [3,5,12] and their osmotic adaptability, as recently confirmed by laboratory studies [13,14]. Different species of *Nannochloropsis* are grown outdoors in ponds and photobioreactors for aquaculture, and are also considered promising for mass cultivation for biofuel production. This is due to their ability to accumulate storage triacylglycerols (TAGs) to over half of their dry weight under conditions of nitrogen (N) starvation [13,15,16]. Given its industrial potential, significant effort has been invested in developing this alga into a model oleaginous microalga. Several research groups have sequenced the genome of different *Nannochloropsis* species [7,17–19]. The genomic data have been integrated with transcriptome [7,17,19–22], proteome [23], and lipidome [20] data for a better understanding of the cellular mechanisms underlying the *Nannochloropsis* response to nitrogen starvation and oil accumulation. Furthermore, efficient nuclear transformation has been established using high-voltage electroporation

Review

Open Access

Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining

Pernilla Turner, Gashaw Mamo and Eva Nordberg Karlsson*

Address: Dept Biotechnology, Center for Chemistry and Chemical Engineering, Lund University, P.O. Box 124, SE-221 00 Lund, Sweden

Email: Pernilla Turner - pernilla.turner@biotek.lu.se; Gashaw Mamo - gashaw.mamo@biotek.lu.se;

Eva Nordberg Karlsson* - eva.nordberg_karlsson@biotek.lu.se

* Corresponding author

Published: 15 March 2007

Received: 4 January 2007

Microbial Cell Factories 2007, 6:9 doi:10.1186/1475-2875-6-9

Accepted: 15 March 2007

This article is available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/9>

© 2007 Turner et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

In today's world, there is an increasing trend towards the use of renewable, cheap and readily available biomass in the production of a wide variety of fine and bulk chemicals in different biorefineries. Biorefineries utilize the activities of microbial cells and their enzymes to convert biomass into target products. Many of these processes require enzymes which are operationally stable at high temperature thus allowing e.g. easy mixing, better substrate solubility, high mass transfer rate, and lowered risk of contamination. Thermophiles have often been proposed as sources of industrially relevant thermostable enzymes. Here we discuss existing and potential applications of thermophiles and thermostable enzymes with focus on conversion of carbohydrate containing raw materials. Their importance in biorefineries is explained using examples of lignocellulose and starch conversions to desired products. Strategies that enhance thermostability of enzymes both *in vivo* and *in vitro* are also assessed. Moreover, this review deals with efforts made on developing vectors for expressing recombinant enzymes in thermophilic hosts.

Background

Thermostable enzymes and microorganisms have been topics for much research during the last two decades, but the interest in thermophiles and how their proteins are able to function at elevated temperatures actually started as early as in the 1960's by the pioneering work of Brock and his colleagues [1]. Microorganisms are, based on their optimal growth temperatures, divided into three main groups, i.e. psychrophiles (below 20°C), mesophiles (moderate temperatures), and thermophiles (high temperatures, above 55°C) [2]. Only few eukaryotes are known to grow above this temperature, but some fungi grow in the temperature range 50 – 55°C [3]. Several years ago Kristjansson and Stetter [4], suggested a further division of the thermophiles and a hyperthermophile boundary (growth at and above 80°C) that has today reached

general acceptance. Most thermophilic bacteria characterised today grow below the hyperthermophilic boundary (with some exceptions, such as *Thermotoga* and *Aquifex* [5]) while hyperthermophilic species are dominated by the Archaea.

Use and development of molecular biology techniques, permitting genetic analysis and gene transfer for recombinant production, led to dramatically increased activities in the field of thermostable enzymes during the 1990's. This also stimulated isolation of a number of microbes from thermal environments in order to access enzymes that could significantly increase the window for enzymatic bioprocess operations. One of the early successful commercialised examples was analytical use of a thermostable enzyme, *Taq*-polymerase, in polymerase chain

Anexo 32: Producción de aminoácidos por ingeniería metabólica

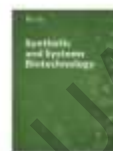
Synthetic and Systems Biotechnology 7 (2017) 87–96



Contents lists available at ScienceDirect

Synthetic and Systems Biotechnology

journal homepage: <http://www.keaipublishing.com/en/journals/synthetic-and-systems-biotechnology/>



Systems metabolic engineering strategies for the production of amino acids



Qian Ma^{a, b, c}, Quanwei Zhang^c, Qingyang Xu^{a, b, c}, Chenglin Zhang^{a, b, c}, Yanjun Li^{a, b, c}, Xiaoguang Fan^{a, b, c}, Xixian Xie^{a, b, c, *}, Ning Chen^{a, b, c, **}

^a National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457, China

^b Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457, China

^c College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2017

Received in revised form

16 July 2017

Accepted 18 July 2017

Keywords:

Systems metabolic engineering

Amino acid

Corynebacterium glutamicum

Escherichia coli

ABSTRACT

Systems metabolic engineering is a multidisciplinary area that integrates systems biology, synthetic biology and evolutionary engineering. It is an efficient approach for strain improvement and process optimization, and has been successfully applied in the microbial production of various chemicals including amino acids. In this review, systems metabolic engineering strategies including pathway-focused approaches, systems biology-based approaches, evolutionary approaches and their applications in two major amino acid producing microorganisms: *Corynebacterium glutamicum* and *Escherichia coli*, are summarized.

© 2017 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Contents

1. Introduction	88
2. Strategies for systems metabolic engineering of microorganisms for amino acids production	88
2.1. Pathway-focused approaches	88
2.1.1. Carbon source utilization engineering	88
2.1.2. Precursor enrichment, byproduct elimination and product degradation blocking	89
2.1.3. Transporter engineering	89
2.1.4. Cofactor engineering	89
2.2. Systems biology-based approaches	90
2.2.1. Omics-based approaches	90
2.2.2. In silico simulation	91
2.3. Evolutionary approaches	91
3. Case studies of systems metabolic engineering in <i>C. glutamicum</i>	92
3.1. γ -glutamate	92
3.2. ϵ -lysine	93
4. Case studies of systems metabolic engineering in <i>E. coli</i>	93
4.1. ϵ -threonine	93

* Corresponding author. National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457, China.

** Corresponding author. National and Local United Engineering Lab of Metabolic Control Fermentation Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin, 300457, China.

E-mail addresses: xixianxie@tust.edu.cn (X. Xie), ningchen@tust.edu.cn (N. Chen).

Peer review under responsibility of KeAi Communications Co., Ltd.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2017.07.003>

2405-805X/© 2017 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of KeAi Communications Co. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy

Sang Jun Lee¹, Sang-Jae Lee² and Dong-Woo Lee^{2*}

¹ Systems and Synthetic Biology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, South Korea

² School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu, South Korea

Edited by:

Wenwen Zhang, Tianjin University, China

Reviewed by:

Liang Shi, Wright State University, USA

Shawn Chen, Ohio University, USA

*Correspondence:

Dong-Woo Lee, School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, 80 Daehak-ro, Buk-gu, Daegu 702-701, South Korea
e-mail: leedw@knu.ac.kr

The finite reservation of fossil fuels accelerates the necessity of development of renewable energy sources. Recent advances in synthetic biology encompassing systems biology and metabolic engineering enable us to engineer and/or create tailor made microorganisms to produce alternative biofuels for the future bio-era. For the efficient transformation of biomass to bioenergy, microbial cells need to be designed and engineered to maximize the performance of cellular metabolisms for the production of biofuels during energy flow. Toward this end, two different conceptual approaches have been applied for the development of platform cell factories: forward minimization and reverse engineering. From the context of naturally minimized genomes, non-essential energy-consuming pathways and/or related gene clusters could be progressively deleted to optimize cellular energy status for bioenergy production. Alternatively, incorporation of non-indigenous parts and/or modules including biomass-degrading enzymes, carbon uptake transporters, photosynthesis, CO₂ fixation, and etc. into chassis microorganisms allows the platform cells to gain novel metabolic functions for bioenergy. This review focuses on the current progress in synthetic biology-aided pathway engineering in microbial cells and discusses its impact on the production of sustainable bioenergy.

Keywords: microbial platform cells, bioenergy, synthetic biology, genome reduction, metabolic engineering

INTRODUCTION

Biological processes using microorganisms have a wide range of superior advantages (e.g., renewability, sustainability, and carbon neutralization) over conventional chemical processes for the production of biofuels. However, besides from compatibility with existing fuel infrastructure, production yields of the advanced biofuels are nevertheless not yet great enough to compete with and replace fossil fuels. The key issues to overcome in biological systems are the cost of substrates and biomet toxicity/inhibition of fermenting microorganisms, which are directly related to biofuel productivity, titer, and yield (Zeigler et al., 2007; Fischer et al., 2008). To overcome these impediments, development of a robust and high-yielding microbe is required. Recently, a variety of engineered microorganisms, by metabolic engineering integrated with genome engineering and synthetic biology, appear to be quite promising with improved yields of biofuel production (e.g., ethanol, biodiesel, butanol, terpenoids, syngas, and H₂; Bokinsky et al., 2011; Satriangit et al., 2011; Zhang et al., 2011; Lan and Liao, 2012; Lee et al., 2012; Westfall et al., 2012).

Synthetic biology provides us with innovative approaches to a wide range of applications (Furukawa and Weiss, 2009): sustainable bioenergy production, bioremediation, biorefinery, and biopharmaceuticals. Based on a wealth of genome sequences, systems biology and metabolic engineering integrated with advanced genetic tools have enabled us to make engineered microbes as a blueprint for the near future (Gibson et al., 2008a, 2009; Benders et al., 2010; Jewett and Forster, 2010). Indeed, not only artificial microorganisms based on parasites (Fraser et al., 1995) and small

size-genome microorganisms (Gibson et al., 2008b, 2010), but also engineered microorganisms were successfully generated for the production of biofuels, fine chemicals, pharmaceuticals, and biosensors (Martin et al., 2003; Kensing, 2010; Hsu et al., 2011; Zhang and Kensing, 2011; Zhang et al., 2011). Thus, construction of efficient biofuel-producing microbial cell factories is now conceivable by design-based engineering of biological systems (Forster and Church, 2006, 2007; Carothers et al., 2009; Nitschke, 2009; Holtz and Kensing, 2010; Nielsen and Kensing, 2011; Tolonen et al., 2011).

To design and engineer microorganisms for the high-yields of biofuel production, we need to better understand how microbial cells can coordinate their metabolic pathways under different environmental conditions, underlying essential and non-essential genes for bacterial life and metabolic networks. This information will help us to modulate the efficiency of production pathway and to optimize the energy balances between bioproduction and biosynthesis in cell factories. To date, there are increasing examples of engineering metabolic pathways tightly linked to the cellular energy balance that is one of the key determining factors of cell factories in the yield and productivity of biofuels (Johnson and Schmidt-Dammert, 2008; Trinh et al., 2008; Portnoy et al., 2010; Lan and Liao, 2011, 2012). Recently, molecular engineering using protein or RNA scaffolds also could be applied for pathway engineering in synthetic cell factories (Conrado et al., 2008; Delebecque et al., 2011; Medema et al., 2011). For example, organizing mevalonate pathway enzymes on scaffolds have been developed for efficient production of isoprenoids (Dueber et al., 2009). In

American Journal of Science

APRIL 2007

THE THERMODYNAMICS AND KINETICS OF MICROBIAL METABOLISM

QUSHENG JIN* and CRAIG M. BETHKE

Department of Geology, University of Illinois, 1301 West Green Street,
Urbana, Illinois 61801-2919 USA

ABSTRACT. The various kinetic rate laws commonly used to describe microbial metabolism are derived considering only forward reaction progress and hence are inconsistent with the requirements of thermodynamics. These laws may be applied without significant error where abundant energy is available to drive the metabolic reaction, so the forward reaction overwhelms the reverse. The laws are, however, unsuitable where little energy may be available. In previous papers we derived a new rate law for microbial respiration considering that reaction progresses simultaneously in both the forward and reverse directions. In this paper, we demonstrate in a new and rigorous way how the rate law can account quantitatively for the thermodynamic driving force for reaction. We refine our previous work on microbial respiration to better account for details of the electron transfer process. We furthermore extend the theory to account for enzymatic reaction and microbial fermentation. We show that commonly used rate laws of simple form can be modified to honor thermodynamic consistency by including a thermodynamic potential factor. Finally, we consider how the rate of biomass synthesis can be determined from the rate of respiration or fermentation. We apply these results to describe (1) the enzymatic reaction by which benzoyl-CoA forms, (2) crotonate fermentation, and (3) glucose fermentation; for each process we demonstrate how the reaction rate is affected by the thermodynamic driving force. Results of the study improve our ability to predict microbial metabolic rates accurately over a spectrum of geochemical environments, including under autotrophic and oligotrophic conditions.

INTRODUCTION

A microorganism liberates chemical energy from its environment by using its enzymes to catalyze a chemical reaction. A respiring microbe catalyzes a redox reaction in which electrons are transferred from a donor to acceptor species, leaving the donor oxidized and the acceptor reduced. It conserves a portion of the energy liberated in this way by translocating protons outside of the cell's membrane and synthesizing adenosine triphosphate (ATP) from adenosine diphosphate (ADP) and the orthophosphate ion (PO_4^{3-} , denoted P_i). A fermenting microbe, in contrast, conserves energy by coupling ATP synthesis to the breakdown of a complex substrate molecule found in its environment. The breakdown produces simpler species, one more oxidized and the other more reduced than the substrate. The ATP serves as a store of chemical energy in a respiring or fermenting microbe, which it can expend for purposes such as cell maintenance and reproduction, biomass synthesis, and chemical species transport across its membrane.

A microorganism, then, affects the chemistry of its environment by catalyzing chemical reactions. The environment, on the other hand, controls the activities of

*Corresponding author; Current address: Department of Geological Sciences, University of Oregon, 1272 University of Oregon, Eugene, Oregon 97403-1272 USA; Email: qjin@uoregon.edu.



Award Review

The Biochemistry and Molecular Biology of Xenobiotic Polymer Degradation by Microorganisms

Fusako KAWAI

Research Institute for Bioresources, Okayama University, 1-2 Chujo, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan

Online Publication, September 7, 2010

[doi:10.1271/bbb.100394]

Research on microbial degradation of xenobiotic polymers has been underway for more than 40 years. It has exploited a new field not only in applied microbiology but also in environmental microbiology, and has greatly contributed to polymer science by initiating the design of biodegradable polymers. Owing to the development of analytical tools and technology, molecular biological and biochemical advances have made it possible to prospect for degrading microorganisms in the environment and to determine the mechanisms involved in biodegradation when xenobiotic polymers are introduced into the environment and are exposed to microbial attack. In this review, the molecular biological and biochemical aspects of the microbial degradation of xenobiotic polymers are summarized, and possible applications of potent microorganisms, enzymes, and genes in environmental biotechnology are suggested.

Key words: xenobiotic polymers; polyethylene glycol; polyvinyl alcohol; aliphatic-co-aromatic polyester; symbiotic degradation

Polymer chemistry began approximately 90 years ago, when Staudinger established the theoretical background from which commercial production of synthetic polymers arose. Synthetic polymers, especially solid ones known as plastics, have been at the forefront since World War II. Annual worldwide production of plastics amounts to more than 200 million tons. Synthetic polymers were originally designed to replace natural polymers, with the advantages of long life (no decay), better performance, plasticity of form, and low cost of production, dependent on cheap petroleum. However, public concern over the use of synthetic polymers has been increasing since the end of 1980s as plastic bags have been polluting the environment. Plastic bags can be found everywhere from the deep sea to the highest mountains and can cause serious environmental problems by threatening wildlife and destroying scenic areas.

Environmental issues caused by chemical compounds are due to their toxicity, as with pesticides, organic

mercury, and arsenic compounds. In contrast to these toxic compounds, synthetic polymers are biologically inactive and generally nontoxic. What then is the biggest problem with synthetic polymers? The answer is prolonged persistence in the environment due to their synthetic polymer-specific chemical structures, which results in excellent physicochemical properties and a long life even in harsh environments. The chemical structures of polymers are shown as (monomer)_n, where n denotes the degree of polymerization. In other words, depolymerization is a primary requisite for polymer degradation. It leads to the loss of physicochemical properties that prolong the life of the synthetic polymer. Synthetic polymers include all kinds of polymerized compounds, including water-soluble, oily, and solid polymers. Plastics are solid synthetic polymers of various forms. They are not water-soluble or miscible. Since plastics are highly visible, their fate in the environment and their recyclability causes public concern. On the other hand, water-soluble synthetic polymers are often neglected because they are invisible, although their total production corresponds to that of plastics. Research on the biodegradation of synthetic polymers to prevent deterioration of products dates back to studies in the 1960s, and research on microbial degradation (to which the author contributed) had already started in the 1970s. Environmental problems first attracted worldwide public concern at the end of the 1980s, and studies of biodegradation and the production of biodegradable synthetic polymers were promoted in the 1990s to establish standards for biodegradation and biodegradable synthetic polymers. A number of previous studies have shown that biodegradability is determined by the chemical structures and physicochemical properties of polymers and not by their origins, whether natural or artificial. The biodegradability of many xenobiotic polymers has been verified, as described below. More recently, a paradigm shift from oil-based production to bio-based production has caused concern and attracted increasing interest in this area, with greater focus on bio-based production of existing monomers presently produced from oil to form

This review was written in response to the author's receipt of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Senior Scientists Award in 2008.

Correspondence: Present address: Center for Nanomaterials and Devices, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan; Tel/Fax: +81-75-703-8576; E-mail: fkawai@kit.ac.jp

Abbreviations: PEG, polyethylene glycol; PPG, polypropylene glycol; PTMG, polytetramethylene glycol; PBO, polybutylene oxide; PVA, polyvinyl alcohol; PAA, polyacrylic acid; PAS, polyaspartic acid; PE, polyethylene; PLA, poly(lactic acid); PLLA, poly(L-lactic acid); PDLA, poly(D-lactic acid); DL-PLA, poly(DL-lactate); PHA, polyhydroxyalkanoate; PHB, polyhydroxybutyrate; PCL, polycaprolactone; PET, polyethylene terephthalate; PQQ, pyroloquinoline quinone; CLIE, cutinase-like enzyme

Ethanol fermentation on the move

Thomas W Jeffries

The complete genome sequence of the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis* provides new opportunities for industrial alcohol fermentation.

Ethanol has been derived from microbial fermentation for thousands of years. It is not only an important product of the alcoholic beverage industry, but also, it is one of the fastest growing fuel sources in the world. In 2004, the United States produced more than 12.5×10^9 liters of ethanol—a 17% increase over the amount generated in 2003. Keeping in step with this demand will require the engineering of new strains of fermentative microorganisms that can produce ethanol more efficiently, and more detailed information about the genetic circuits involved. In this issue, Kang and colleagues¹ report the complete genome sequence of one of these organisms, the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis*.

The perennial choice for making beverage ethanol is *Saccharomyces cerevisiae*. In contrast, *Z. mobilis* has been shunned because it can spoil fermentations of cider and beer with sulfurous flavors and rotten odors. However, in this rapidly changing industry, *Z. mobilis* might gain popularity. Off-flavors are not a concern in the production of fuel ethanol, so the faster fermentation kinetics and higher product yields of *Z. mobilis* could give it an advantage. Publication of the complete 2.06 Mb *Z. mobilis* genome by a consortium of researchers in Korea should provide a new impetus to efforts to exploit this bacterium for ethanol production.

Since 1970, *Z. mobilis* has been the subject of more than 1,400 research papers. It attracted attention early in the development of ethanol fuel technology, because it grows and ferments rapidly, tolerates high levels of ethanol—virtually unique property among bacteria—makes a product yield significantly higher than that of *S. cerevisiae*. Its ethanol production rate is three- to fivefold higher than that of *S. cerevisiae*², and its ethanol yield approaches 97% of the theoretical maximum³, as compared with 90–92% for *S. cerevisiae*⁴.

Thomas W. Jeffries is at the Institute for Microbial and Biochemical Technology, Forest Products Laboratory, One Gifford Pinchot Drive, Madison, Wisconsin 53726-2398, USA. e-mail: twjeffries@fs.fed.us

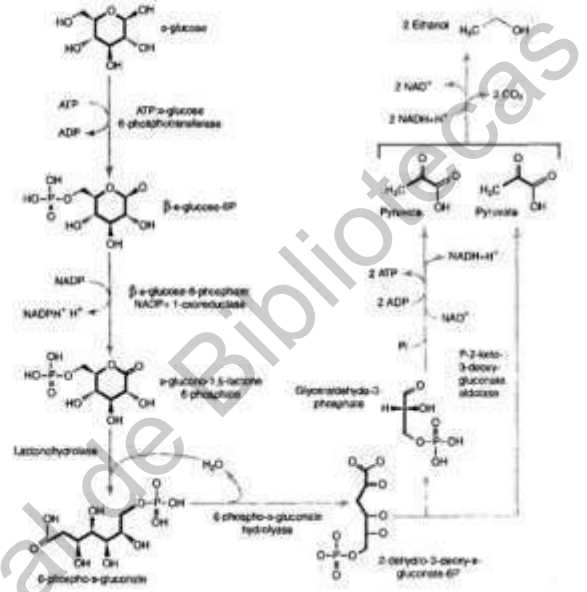


Figure 1 Ethanol fermentation in *Zymomonas mobilis*. The conversion of glucose into two moles of ethanol nets 1 mole of ATP. This pathway is commonly used by aerobic pseudomonads for the metabolism of glucose, but *Z. mobilis* makes use of it uniquely for anaerobic metabolism. The low ATP yield results in a low cell mass and the potential for higher ethanol yields.

Lindner first described *Zymomonas mobilis* (also known as *Z. lindneri*, *Thermobacterium mobile* or *Pseudomonas lindneri*) in 1928. This facultative anaerobe is perhaps most commonly known for the production of Mexican pulque—a white, acidic, viscous alcoholic beverage fermented from agave juice by *Z. mobilis* along with *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* sp., and *S. cerevisiae*. (Contrary to popular belief, tequila and mescal, which are also made from agave species, are the results of yeast, not *Z. mobilis*, fermentation.)

Z. mobilis is distinctive in that it uses the Entner-Doudoroff pathway (Fig. 1) for glucose metabolism rather than the more familiar Embden-Meyerhoff-Parnas glycolytic

pathway used by *S. cerevisiae*. Although the Entner-Doudoroff pathway is widely distributed among pseudomonads, it is normally part of aerobic metabolism. Unlike glycolysis, which can theoretically generate two moles of ATP for each mole of glucose fermented to ethanol, the Entner-Doudoroff pathway has a net yield of only one ATP per mole of glucose. This low yield results in low cell mass and allows higher ethanol yields.

As always, a new genome brings surprises. Systemic analysis showed that *Z. mobilis* does not share significant lineage with 76 other published bacterial genomes. What comes the closest, is the obligatory aerobic chemolithotroph, *Nososphingobium luzzatiaceae*⁵,

Designing an *Escherichia coli* Strain for Phenylalanine Overproduction by Metabolic Engineering

Neetu Tyagi¹ · Deepti Saini¹ · Richa Guleria¹ · Krishna Jyoti Mukherjee¹

Published online: 3 April 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract The phenylalanine pathway flux is controlled by two types of regulators, those that are specific to the pathway, as well as by global regulators. In order to demonstrate the importance of these global regulators, we first removed the pathway-specific regulators using all possible combinations of gene knockouts and knockins. We found that genes like *aroG^{ht}* performed best individually as well as in combination with other genes, while other genes like *tyrA* and *tyrR* worked only in combination with other modifications. Knocking in the *tktA* gene under a *tyrR* promoter and knocking out *pykF* further increased phenylalanine production demonstrating that the supply of precursor via PEP and E4P is also a rate-limiting step. Finally, we tested the role of global regulators on this deregulated pathway and found that *Fis* overexpression helps in both enhancing and sustaining the flux through this pathway. This work opens up the possibility of using global regulators in synergy with pathway-specific modifications to enhance product yields.

Keywords Phenylalanine · *Fis* · Systems biology · Metabolic engineering · *E. coli*

Introduction

L-Phenylalanine is widely used as a food or feed additive, in infusion fluids, for the chemical synthesis of pharmaceutically active compounds like HIV protease inhibitor,

anti-inflammatory drug, catecholamines [1], and low-calorie sweetener aspartame [2]. The biosynthesis of aromatic amino acids including phenylalanine is energetically costly and is thus tightly regulated. Therefore, cells naturally do not overproduce these compounds [1, 3, 4].

Escherichia coli has multiple levels of regulations to control the flux through any biosynthesis pathway. These can be broadly classified into two types of regulations, one that is pathway specific (internal bottlenecks and feedback controls in the pathway) and the second is global regulation (which modulates the expression of a large number of genes depending on the physiological state of the cell).

For several decades, different approaches have been adopted to modulate the carbon flux towards phenylalanine synthesis. However, the main focus has been only on the pathway-specific regulation to achieve better yields. Thus, different approaches to metabolically engineer an *E. coli* strain that can overproduce this aromatic amino acid have been tried including: (1) increasing the availability of the precursors phosphoenolpyruvate (PEP) and erythrose-4-phosphate (E4P); (2) replacement of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase with feedback-insensitive DAHP synthase; (3) relieving the rate-limiting enzymatic reactions; (4) preventing carbon loss towards competing pathways; (5) removal of transcriptional and allosteric regulation; (6) enhancement of product export; and (7) removal of the dual transcriptional regulator [5] (Fig. 1).

Even after removal of these blockage and control, phenylalanine production usually ceases after a certain time of fermentation. The primary reason is that phenylalanine biosynthesis is an anabolic pathway and therefore primarily a growth associated product. For improving the product yield, it is therefore necessary to decouple biomass formation from phenylalanine synthesis. For decoupling,

✉ Krishna Jyoti Mukherjee
kjmukherjee@mail.jnu.ac.in

¹ School of Biotechnology, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosá Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).
(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)
(ISSN-0188-137X)

LA ENSEÑANZA DE LA GLUCÓLISIS ORIENTADA A LA INGENIERÍA METABÓLICA Y APOYADA CON IMÁGENES.

Gustavo Viniegra González, Saúl Álvarez Zapiain

Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa, D.F. México

GLYCOLYSIS TEACHING AIMED TO THE METABOLIC ENGINEERING AND SUPPORTED WITH ILLUSTRATIONS

Abstract.

This brief didactical essay tries to show that is possible to approach the teaching of metabolic pathways, such as glycolysis, using the practice and teaching of basic skills such as stoichiometric, thermodynamic and mechanistic analysis of chemical reactions, that later can be used to tackle more complicated problems related to metabolic engineering. This essay is based on two fundamental textbooks, written by Voet & Voet [1] and Nielsen et al., [2].

Keywords: glycolysis; metabolic engineering; didactic; teaching; problem based learning

Planteamiento del problema

Desde el punto de vista formal, una vía metabólica puede ser vista como una red de reacciones, en las cuales, el Substrato (digamos la glucosa) está conectado con la formación de diversos productos llamados Metabolitos (por ejemplo: el glicerol, el etanol y el dióxido de carbono) como se muestra en la Figura 1. Las flechas que conectan al Substrato con los Metabolitos, tienen compuestos intermedios, de manera que es posible establecer balances de materia entre ellos, si se asocia un flujo, (v) con cada flecha. Cuando las reacciones no están ramificadas y

Minireview

Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum*

Robert K. Kulis-Horn, Marcus Persicke and Jörn Kalinowski*

Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, Universitätsstraße 27, 33615 Bielefeld, Germany.

Summary

L-Histidine biosynthesis is an ancient metabolic pathway present in bacteria, archaea, lower eukaryotes, and plants. For decades L-histidine biosynthesis has been studied mainly in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, revealing fundamental regulatory processes in bacteria. Furthermore, in the last 15 years this pathway has been also investigated intensively in the industrial amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*, revealing similarities to *E. coli* and *S. typhimurium*, as well as differences. This review summarizes the current knowledge of L-histidine biosynthesis in *C. glutamicum*. The genes involved and corresponding enzymes are described, in particular focusing on the imidazoleglycerol-phosphate synthase (HisFH) and the histidinol-phosphate phosphatase (HisN). The transcriptional organization of *his* genes in *C. glutamicum* is also reported, including the four histidine operons and their promoters. Knowledge of transcriptional regulation during stringent response and by histidine itself is summarized and a translational regulation mechanism is discussed, as well as clues about a histidine transport system. Finally, we discuss the potential of using this knowledge to create or improve *C. glutamicum* strains for the industrial L-histidine production.

Received 21 December 2012; revised 1 March 2013; accepted 5 March 2013. *For correspondence: E-mail joern.kalinowski@cebitec.uni-bielefeld.de. Tel. +49-(0)521-105-8756; Fax +49-(0)521-108-80041.

Microbial Biotechnology (2014) 7(1), 5–25
doi:10.1111/1751-7915.12055

Funding Information R. K. Kulis-Horn is supported by a GLIB-GC (Graduate Cluster Industrial Biotechnology) PhD grant co-funded by the Ministry of Innovation, Science and Research of the federal state of North Rhine-Westphalia (MWF). This work was part of the SysEn-Cor research project (Grant 0315598E) funded by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF).

© 2013 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Corynebacterium glutamicum is a well-established microorganism for biotechnological applications. Although it has been engineered for the production of various fine chemicals like succinate (Litsanov *et al.*, 2012) or isobutanol (Blombach *et al.*, 2011), it is still mainly employed for the production of L-amino acids (Becker and Wittmann, 2012). The most important amino acids are L-glutamate (flavour enhancer) and L-lysine (feed additive) based on production scales (Becker and Wittmann, 2011). Furthermore, there are also efforts to create efficient producers for other amino acids like L-leucine, L-serine, and L-methionine. These efforts are supported by a detailed insight into the corresponding amino acid biosynthetic pathways and their regulation in *C. glutamicum* and have been summarized in several reviews or book chapters (Eggeling and Bott, 2005; Wendisch, 2007; Blombach and Seibold, 2010; Brinkhoff *et al.*, 2010). However, to date there is no review available about L-histidine biosynthesis and its regulation in this amino acid-producing microorganism. Here, we intend to summarize the current knowledge on histidine biosynthesis, its regulation and attempts for application in *C. glutamicum*. The published data are discussed critically and compared with the knowledge of histidine biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*), the reference organisms regarding this particular pathway.

Properties of L-histidine

L-Histidine is one of the 20 standard proteinogenic amino acids present in proteins of all living organisms. In the following, we will use the term histidine instead, meaning its biologically active isomer L-histidine. Its side-chain is an imidazole ring and therefore has aromatic properties. Histidine is the only amino acid whose side-chain can switch from an unprotonated to a protonated state under neutral pH conditions due to the pK_a value of 6.0 of its side-chain (Nelson and Cox, 2005). This characteristic enables histidine residues to act as both, a proton acceptor or a proton donor, in many cellular enzymatic reactions (Febek, 1990; Polgár, 2005).

The PEP–pyruvate–oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria

Uwe Sauer ^a, Bernhard J. Eikmanns ^{b,*}

^a Institute of Biotechnology, ETH Zürich, 8093 Zürich, Switzerland

^b Department of Microbiology and Biotechnology, University of Ulm, 89069 Ulm, Germany

Received 18 August 2004; received in revised form 27 October 2004; accepted 1 November 2004

First published online 28 November 2004

We dedicate this paper to Rudolf K. Thauer, Director of the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology in Marburg, Germany, on the occasion of his 65th birthday

Abstract

In many organisms, metabolite interconversion at the phosphoenolpyruvate (PEP)–pyruvate–oxaloacetate node involves a structurally entangled set of reactions that interconnects the major pathways of carbon metabolism and thus, is responsible for the distribution of the carbon flux among catabolism, anabolism and energy supply of the cell. While sugar catabolism proceeds mainly via oxidative or non-oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA, anaplerosis and the initial steps of gluconeogenesis are accomplished by C3- (PEP- and/or pyruvate-) carboxylation and C4- (oxaloacetate- and/or malate-) decarboxylation, respectively. In contrast to the relatively uniform central metabolic pathways in bacteria, the set of enzymes at the PEP–pyruvate–oxaloacetate node represents a surprising diversity of reactions. Variable combinations are used in different bacteria and the question of the significance of all these reactions for growth and for biotechnological fermentation processes arises. This review summarizes what is known about the enzymes and the metabolic fluxes at the PEP–pyruvate–oxaloacetate node in bacteria, with a particular focus on the C3-carboxylation and C4-decarboxylation reactions in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. We discuss the activities of the enzymes, their regulation and their specific contribution to growth under a given condition or to biotechnological metabolite production. The present knowledge unequivocally reveals the PEP–pyruvate–oxaloacetate nodes of bacteria to be a fascinating target of metabolic engineering in order to achieve optimized metabolite production.

© 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: C3-carboxylation; C4-decarboxylation; Anaplerosis; Gluconeogenesis; Metabolic flux; PEP–pyruvate–oxaloacetate node

Contents

1. Introduction	766
2. The enzymes at the PEP–pyruvate–oxaloacetate node in bacteria	767
2.1. C3-carboxylating enzymes	767
2.2. C4-decarboxylating enzymes	770
3. The PEP–pyruvate–oxaloacetate node in <i>E. coli</i>	772
3.1. Anaplerosis in <i>E. coli</i>	772

0168-6445/\$22.00 © 2004 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.femsre.2004.11.002



A generalised unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*

Abdellah Bouguettoucha^a, Béatrice Balanec^b, Saci Nacef^a, Abdeltif Amrane^{b,*}

^a Département de Génie des Procédés, Faculté des Sciences de l'Ingénieur, Université Ferhat Abbas, 19000 Sétif, Algeria

^b Equipe Chimie et Ingénierie des Procédés, Université de Rennes I/ENSCR, UMR CNRS 6226 "Sciences Chimiques de Rennes", ENSCR, Campus de Beaulieu, Avenue du Général Leclerc, 35700 Rennes, France

Received 17 January 2007; received in revised form 9 March 2007; accepted 12 March 2007

Abstract

During lactic acid fermentation, seed cultures are usually carried out without pH control to obtain active cells, while cultures are usually carried out at pH maintained at the optimal value, 5.9, to overcome inhibitory effects. The Luedeking–Piret expression was therefore previously modified by introducing an additional term (i) involving the residual lactose concentration to account for the carbon substrate limitation, responsible for cessation of production during cultures at controlled pH, on one hand; (ii) or involving the undissociated form of the lactic acid, the main inhibitory species, in case of an absence of pH control, namely the usual seed culture conditions, on the other hand. To avoid the use of two different expressions, depending on the culture conditions, a generalised model for production was developed, involving a unique expression taking into account both a nutritional limitation and an inhibitory effect. The nutritional limitation term was modified by introducing the carbon limitation constant, in place of the residual lactose concentration, which varied in absence of pH control, namely in absence of carbon limitation. The model proved to be satisfactory in a large range of culture conditions, and also allow to deduce accurately the growth- and non-growth-associated parts of the production.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Batch cultures; Lactic acid fermentation; Production kinetics; Modelling; Product inhibition; Substrate limitation

1. Introduction

Lactic acid, a naturally occurring multifunctional organic acid, is a valuable industrial chemical used as an acidulant preservative in food industry and other numerous applications of pharmaceutical, leather and textile industries as well as a chemical feedstock [1]. One of its most promising applications is its use for biodegradable and biocompatible polylactate polymers, such as poly-lactic acid (PLA), an environmentally friendly alternative to biodegradable plastics [2–4]. Owing to the unique property of PLA, lactic acid has the potential to be a substitute for biodegradable plastics manufacture and becomes a very large-volume commodity chemical intermediate.

An inhibitory effect of the undissociated lactic acid is now undoubtedly proven [5,6], which affect in close relation with the pH effect [7], growth and hence lactic acid production during

cultures without pH control. To overcome this inhibition, pH is maintained at its optimal value, 5.9 [8,9], leading to nitrogen and carbon limitations causing cessation of growth and lactic acid production, respectively [10].

To describe lactic acid production data, the Luedeking–Piret model [11] was modified by introducing an additional term to account for the undissociated lactic acid (and pH) inhibition in case of cultures without pH control (Eq. (1)) [12]:

$$\frac{dp}{dt} = A \frac{dx}{dt} + Bx \left(1 - \frac{[HL]}{[HL]_{inh}} \right) \quad (1)$$

While during cultures at pH controlled at 5.9, a corrective term was introduced to account for cessation of production due to carbon substrate limitation (Eq. (2)) [13]:

$$\frac{dp}{dt} = A \frac{dx}{dt} + Bx \left(1 - \frac{s_{res}}{s} \right) \quad (2)$$

where A and B were the coefficients for growth- and non-growth-associated production, respectively; $[HL]_{inh}$ the inhibitory undissociated lactic acid concentration, 8.5 g L^{-1} [7]; s and s_{res}

* Corresponding author. Tel.: +33 2 23 23 87 55; fax: +33 2 23 23 81 20.
E-mail address: abdeltif.amrane@univ-rennes1.fr (A. Amrane).

CHAPTER 1

Fermentation Technology

PETER F. STANBURY

1 INTRODUCTION

Microorganisms are capable of growing on a wide range of substrates and can produce a remarkable spectrum of products. The relatively recent advent of *in vitro* genetic manipulation has extended the range of products that may be produced by microorganisms and has provided new methods for increasing the yields of existing ones. The commercial exploitation of the biochemical diversity of microorganisms has resulted in the development of the fermentation industry and the techniques of genetic manipulation have given this well-established industry the opportunity to develop new processes and to improve existing ones. The term fermentation is derived from the Latin verb *fervere*, to boil, which describes the appearance of the action of yeast on extracts of fruit or malted grain during the production of alcoholic beverages. However, fermentation is interpreted differently by microbiologists and biochemists. To a microbiologist the word means any process for the production of a product by the mass culture of microorganisms. To a biochemist, however, the word means an energy-generating process in which organic compounds act as both electron donors and acceptors, that is, an anaerobic process where energy is produced without the participation of oxygen or other inorganic electron acceptors. In this chapter fermentation is used in its broader, microbiological context.

2 MICROBIAL GROWTH

The growth of a microorganism may result in the production of a range of metabolites but to produce a particular metabolite the desired



Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates

Ilana S Aldor^a and Jay D Keasling¹

Implementing several metabolic engineering strategies, either individually or in combination, it is possible to construct microbial plastic factories to produce a variety of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymers with desirable structures and material properties. Approaches include external substrate manipulation, inhibitor addition, recombinant gene expression, host cell genome manipulation and, most recently, protein engineering of PHA biosynthetic enzymes. In addition, mathematical models and molecular methods can be used to elucidate metabolically engineered systems and to identify targets for performance improvement.

Addresses

Department of Chemical Engineering, 201 Gilman Hall, University of California, Berkeley, 94720-1462, USA
e-mail: aldor@gene.com
e-mail: keasling@rocrates.berkeley.edu

Current Opinion in Biotechnology 2003, 14:475-483

This review comes from a themed issue on
Biochemical engineering
Edited by Jeremy S Edwards and Kenneth J Kauffman

0959-1669/\$ - see front matter
© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI 10.1016/j.copbio.2003.09.002

Abbreviations

3HB	3-hydroxybutyrate
3HHX	3-hydroxyhexanoate
3HO	3-hydroxyoctanoate
3HV	3-hydroxyvalerate
3MB	3-mercaptopropionate
3MP	3-mercaptopropionate
PHA	polyhydroxyalkanoate
PHB	poly(3-hydroxybutyrate)
P(3HB-co-3HHX)	poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) form a class of natural polyesters that many organisms in the environment accumulate in the form of intracellular granules to store carbon and reducing equivalents. Although the most well-studied PHA is poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), a polymer of 3-hydroxybutyrate (3HB), there are over 140 possible constituent monomers [1], which have been traditionally classified as short chain length (C4 and C5) and medium chain length (\geq C6) hydroxyalkanoates. This wide variety of monomers yields PHAs with diverse material properties that depend on polymer composition. These material properties, which have proven useful in such

varied applications as the manufacture of shampoo bottles, heat seal resins and heart valves, have made PHA polymers prime candidates for commodity and specialty commercial plastic production.

Besides the commercial applications of PHAs as bioplastics that are biodegradable and made from renewable resources, from the standpoint of an academic metabolic pathway engineer, PHAs are model compounds for metabolic engineering. Several bio-based polyesters, including polylactic acid and 3GT (a polymer of 1,3-propanediol and terephthalic acid), can have some or all of their monomeric constituents produced by microbial fermentation. However, unlike these bio-based polymers which are chemically synthesized, PHAs and their unnatural polythioester analogs (described below) are unique in that both polymer assembly and accumulation occur *in vivo* and can be manipulated by metabolic engineering. The monomeric composition of the biopolymer depends on the host's PHA synthase (polymerase) and on the hydroxyacyl-CoA thioester precursors supplied to the enzyme, which in turn depend on the metabolic pathways operating in the cell and on the external carbon source. The biosynthetic routes to PHA monomers compete with and/or rely on important pathways such as the tricarboxylic acid (TCA) cycle, fatty acid degradation (β -oxidation) and fatty acid biosynthesis for precursors, and involve central metabolites such as acetyl-CoA and cofactors such as NADPH (Figure 1). Ultimately, the monomeric composition of the PHA biopolymer provides the metabolic engineer with considerable insight into the metabolism that was involved in polyester biosynthesis.

The primary aims of the metabolic engineering of PHAs include controlling different factors that determine polymer material properties, such as monomeric composition, chain length and copolymer microstructure, as well as optimizing yield. Pathway engineering for PHA production offers the opportunity to synthesize novel polymers with desirable properties in low-cost, high-productivity fermentations.

In the history of metabolic engineering, PHAs were among the first target compounds and there is substantial literature on this topic including some excellent recent reviews [2-4,5,6]. Plants may be the most economical and environmentally friendly hosts for mass production of biodegradable, commodity plastic [7]. The metabolic engineering of PHAs *in planta* was recently reviewed [5]. However, microbial hosts provide many more

Review

Metabolic Engineering Towards the Enhancement of Photosynthesis[†]

Christoph Peterhansel*, Markus Niessen and Rashad M. Kebeish

RWTH Aachen, Biology I, Aachen, Germany

Received 25 March 2008, accepted 17 June 2008, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00427.x

ABSTRACT

Photosynthetic capacity is a promising target for metabolic engineering of crop plants towards higher productivity. Crop photosynthesis is limited by multiple factors dependent on the environmental conditions. This includes photosynthetic electron transport, regeneration of CO₂ acceptor molecules in the reductive pentose phosphate cycle, the activity and substrate specificity of the CO₂-fixing enzyme Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and the associated flow through the photorespiratory pathway. All these aspects of the photosynthetic network have been the subject of recently published metabolic engineering approaches in model species. Together, the novel results raise hopes that engineering of photosynthesis in crop species can significantly increase agricultural productivity.

INTRODUCTION

The increasing world population and the use of agricultural products for the production of renewable energy resources in addition to human nutrition will demand a sharp rise in agricultural productivity in the next decades. It has long been questioned whether increases in photosynthetic capacity can help to enhance crop productivity at least in terms of grain yield. During the last years, a multitude of free air CO₂ enrichment (FACE) studies were implemented to understand the consequences of atmospheric CO₂ increase caused by the burning of fossil resources. One important result of these studies is that an increase in photosynthesis under these conditions is translated into higher biomass production and seed yield albeit to a lower extent than theoretically predicted (1,2). Moreover, modeling analyses suggest that the photosynthetic capacity of crops under the present atmospheric conditions can be enhanced by genetic manipulation (2,3).

Most of our crop plants fix CO₂ according to the C3 mechanism. The photosynthetic capacity of these plants is limited by multiple factors dependent on the environment. Under conditions of high CO₂ supply and sufficient illumination, the activity of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/

oxygenase (Rubisco) often limits carbon fixation. Rubisco is an exceptionally slow enzyme and is only capable of fixing a few CO₂ molecules per second (4). Huge quantities of the enzyme are required to produce sufficient amounts of carbohydrates for plant growth and the energy requirements of the cell making Rubisco the most abundant protein in the world (5). Besides the low specific activity, only part of all Rubisco proteins are activated by carboxylation, the covalent addition of a CO₂ molecule to a lysine side chain, and the subsequent binding of a Mg²⁺ ion (6,7). This further reduces the maximum CO₂ fixation capacity of the plant. Parts of the already fixed and reduced carbon are lost from the plant because Rubisco also fixes molecular oxygen instead of CO₂ and the recycling of the reaction products of Rubisco oxygenase activity in the process of photorespiration includes a CO₂ release step (8). At atmospheric CO₂ concentrations and a temperature of 25 °C, approximately one out of five catalytic events is an oxygenase reaction (9). This ratio clearly increases if plants are exposed to drought and heat because the specificity of Rubisco for CO₂ as well as the solubility of CO₂ (relative to O₂) in water decrease at higher temperatures. The closure of stomata under such conditions results in reduced CO₂ supply while oxygen is constantly produced in the light reactions of photosynthesis. This further favors the oxygenase reaction of Rubisco (10).

Beside these inadequacies of Rubisco, photosynthesis is also often limited by regeneration of the CO₂ acceptor molecule ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) in the photosynthetic carbon reduction cycle (PCRC) or "Calvin cycle." This either relates to the activity of some enzymes of the PCRC (11) or to the provision of energy and reducing equivalents from the photosynthetic electron transport chain. The latter are required for the reduction of the fixed carbon molecule from a high oxidation state in CO₂ to a low oxidation state in carbohydrates.

In this review, we summarize recent metabolic engineering approaches that address all the listed limitations of photosynthesis in C3 plants. An overview of the processes targeted in the different studies is given in Fig. 1. Background to much of this work has been excellently reviewed recently (2,12) and is therefore only briefly discussed here. Although most of the experiments have been performed in model species and not in crops, the results provide good evidence that modification of components of the photosynthetic system by gene technology can assist breeding of crops with improved biomass productivity and/or yield.

*Corresponding author email: rp@int1.rwth-aachen.de (Christoph Peterhansel)
[†]This invited paper is part of the Symposium in Print: Photosynthesis
© 2008 The Authors. Journal compilation © 2008 The American Society of Photobiology 0031-8629/08

Engineering microbial factories for synthesis of value-added products

Jing Du · Zengyi Shao · Huimin Zhao

Received: 5 March 2011 / Accepted: 1 April 2011 / Published online: 28 April 2011
© Society for Industrial Microbiology 2011

Abstract Microorganisms have become an increasingly important platform for the production of drugs, chemicals, and biofuels from renewable resources. Advances in protein engineering, metabolic engineering, and synthetic biology enable redesigning microbial cellular networks and fine-tuning physiological capabilities, thus generating industrially viable strains for the production of natural and unnatural value-added compounds. In this review, we describe the recent progress on engineering microbial factories for synthesis of valued-added products including alkaloids, terpenoids, flavonoids, polyketides, non-ribosomal peptides, biofuels, and chemicals. Related topics on lignocellulose degradation, sugar utilization, and microbial tolerance improvement will also be discussed.

Keywords Synthetic biology · Metabolic engineering · Microbial synthesis · Value-added products · Natural products · Fuels and chemicals

Introduction

Microorganisms have been increasingly used to produce value-added compounds with numerous applications in the food, agriculture, chemical, and pharmaceutical industries. Examples of these value-added compounds include many antibacterial and anticancer drugs, amino acids, organic acids, vitamins, industrial chemicals, and biofuels. Compared to synthetic chemistry methodologies, microbial biosynthesis has several advantages. First, it avoids the use of heavy metals, organic solvents, and strong acids and bases, thus allowing the synthetic process to take place through an environmentally benign route. Second, enzymes usually have a relatively high substrate specificity, which helps reduce the formation of byproducts. Third, some compounds with complex structures already have natural synthetic pathways while establishing chemical synthetic routes for these complex compounds is very difficult. Finally, metabolic engineering offers ways to further improve the yield and productivity of a target compound while combinatorial biosynthesis allows the creation of novel derivatives.

It is straightforward to think about directly extracting natural products from their native producers. However, most of these native producers are not cultivable in the laboratory and many microorganisms grow very slowly and produce minute amounts of the target compounds. It has been estimated that only 1% of bacteria and 5% of fungi have been cultivated in the laboratory [16, 26, 27, 66]. Even when it is possible to cultivate the native producers, their growth conditions have to be extensively optimized. In addition, due to the lack of genetic tools to manipulate these hosts, it is very difficult to improve the product yield and productivity. Therefore, well-characterized microorganisms that can be used as universal platform organisms

Jing Du and Zengyi Shao contributed equally to this work.

J. Du · Z. Shao · H. Zhao
Department of Chemical and Biomolecular Engineering,
University of Illinois at Urbana-Champaign,
Urbana, IL 61801, USA

H. Zhao (✉)
Departments of Chemistry and Biochemistry,
Institute of Genomic Biology, University of Illinois
at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA
e-mail: zhao5@illinois.edu

CHAPTER NINETEEN

Engineering Proline Metabolism for Enhanced Plant Salt Stress Tolerance

Vinay Kumar, Varsha Shriram, Mohammad Anwar Hossain, and P.B. Kavi Kishor

CONTENTS

- 19.1 Introduction / 350
- 19.2 Proline: A Multifunctional Amino Acid and a Signaling Molecule / 350
- 19.3 Proline Metabolism and Transport / 351
 - 19.3.1 Proline Biosynthesis / 351
 - 19.3.2 Proline Catabolism / 353
 - 19.3.3 Intra- and Interorgan Transport of Proline / 354
- 19.4 Proline Accumulation and Salt Stress Alleviation / 354
- 19.5 Importance of Proline Homeostasis under Stress / 355
- 19.6 Metabolic Engineering of Proline for Enhanced Salt Tolerance / 356
- 19.7 Exogenous Application of Proline for Alleviation of Salt Stress / 359
- 19.8 Conclusion and Outlook / 361
- Acknowledgments / 361
- References / 361

Abstract. Overaccumulation of proline has been reported in numerous plant species growing in extreme environments including high soil salinity. Proline is widely regarded as a multifunctional stress-regulated molecule. Strong correlations between proline accumulation and plant osmotic and salt stress tolerance have been documented in different species. Recently, an emphasis has also been given in dissecting its role in offsetting the cellular imbalances and maintaining the cellular homeostasis during abiotic stresses. Several attempts have been made to increase the accumulation of this versatile proteinogenic amino acid in plants by transferring genes associated with proline metabolism and for finding the correlation between accumulation and osmotic and salt

tolerance in transgenic plants. In recent times, several attempts were made to overexpress various proline biosynthetic pathway genes such as Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR), and ornithine- δ -aminotransferase (OAT) (involved in synthesis) and to downregulate proline dehydrogenase (ProDH) and pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH) (associated with proline degradation) to enhance osmotic and salinity stress tolerance. This chapter focuses on the current understandings of various aspects and the roles proline play not only in imparting osmotic and salt stress tolerance to plants but also in developmental activities.

ARCHAEABACTERIAS HIPERTERMÓFILAS: VIDA EN EBULLICIÓN

Patricia Gómez Fernández¹ y María Pérez Ruiz¹

Tutor/res: M^a Teresa Cutuli de Simón²

¹ Facultad de Veterinaria, UCM.

² Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM.

RESUMEN

En las últimas décadas, se han descubierto formas de vida con la capacidad de sobrevivir en ambientes extremos: las *Archaeobacterias*. Filogenéticamente, se encuadran dentro del dominio *Archaeobacteria*, separado de los dominios: *Eucarya* y *Eubacteria*. Este trabajo se centra en aquellas que sobreviven en un rango de temperaturas entre 45°C y 121°C, llamadas termófilas e hipertermófilas. Para sobrevivir requieren mecanismos de adaptación que incluyen particularidades que permiten conferir estabilidad térmica a sus estructuras (pared celular y membrana citoplasmática) y a sus biomoléculas (ADN, proteínas, etc.). Se han encontrado muchas actividades útiles e industriales de estos microorganismos ya que cumplen ciertas ventajas por realizar biocatálisis en condiciones extremas, que suponen: incremento de la solubilidad de los sustratos poliméricos, disminución de la viscosidad, incremento de la biodisponibilidad, aumento del ratio de velocidad de las reacciones y disminución del riesgo de contaminación.

Palabras clave: *Archaeobacterias*, hipertermófilas, enzimas termoestables, condiciones extremas, aplicaciones industriales *Archaeas*.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los investigadores han descubierto formas de vida capaces de sobrevivir en ambientes extremos de temperatura, presión, humedad y solutos de entre las que cabe destacar a las *Archaeobacterias*, un grupo de microorganismos de reciente descubrimiento y que da una vuelta de tuerca al concepto de vida, de hábitat y de extremo. Estos organismos, hasta el momento inocuos, han demostrado poseer importantes características que pueden ser aprovechadas por los seres humanos en gran cantidad de actividades y la investigación acerca de qué nos pueden aportar está lejos de haber terminado.

Anexo 49: Metagenómica

Review > [Ann Rev Mar Sci. 2011;3:347-71. doi: 10.1146/annurev-marine-120709-142811.](#)

Microbial metagenomics: beyond the genome

Jack A Gilbert ¹, Christopher L Dupont

Affiliations + expand

PMID: 21329209 DOI: [10.1146/annurev-marine-120709-142811](#)

[Full text links](#)

[Cite](#)

Abstract

Metagenomics literally means "beyond the genome." Marine microbial metagenomic databases presently comprise approximately 400 billion base pairs of DNA, only approximately 3% of that found in 1 ml of seawater. Very soon a trillion-base-pair sequence run will be feasible, so it is time to reflect on what we have learned from metagenomics. We review the impact of metagenomics on our understanding of marine microbial communities. We consider the studies facilitated by data generated through the Global Ocean Sampling expedition, as well as the revolution wrought at the individual laboratory level through next generation sequencing technologies. We review recent studies and discoveries since 2008, provide a discussion of bioinformatic analyses, including conceptual pipelines and sequence annotation and predict the future of metagenomics, with suggestions of collaborative community studies tailored toward answering some of the fundamental questions in marine microbial ecology.

Anexo 50: Aplicaciones metagenómica

Metagenomic Approaches for Exploiting Uncultivated Bacteria as a Resource for Novel Biosynthetic Enzymology

Michael C. Wilson¹ and Jörn Piel^{1,*}

¹Institute for Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zurich, Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zurich, Switzerland

*Correspondence: piel@ethz.ch

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.011>

Most biologically active microbial natural products are known from strains that can be isolated and cultivated in the laboratory. However, the genomics era has revealed that cultured bacteria represent a mere fraction of total estimated bacterial biodiversity. With the development of community genomics, termed metagenomics, the uncultivated majority became accessible for functional analysis. Through metagenomic studies, novel biocatalysts and biosynthetic pathways are being discovered at a pace previously not possible using traditional molecular biology techniques. Additionally, the study of uncultivated bacteria has provided valuable insights into previously overlooked biocatalysts from cultured strains. This perspective highlights recent discoveries from metagenomics of uncultivated bacteria and discusses the impact of those findings on the field of natural products.

Introduction

With the advent of cultivation-independent methods for studying microbial diversity (e.g., 16S ribosomal RNA phylogeny), we now know that bacteria inhabit nearly every ecological niche imaginable: from the deepest oceans to arid deserts to the gut of nearly every multicellular organism. They can exist as free-living organisms or form symbiotic or pathogenic relationships with eukaryote hosts or other prokaryotes. Yet, despite the ubiquity of bacteria and our extensive effort to study them, the vast majority of bacterial biodiversity has not been functionally characterized (Wu et al., 2009). This is largely due to current limitations in cultivation technologies but also to the sheer number of estimated bacterial taxa. For instance, approximately 70% of all known bacterial phyla do not have a single cultured representative (Achtman and Wagner, 2005). This reality is both exciting and somewhat daunting considering the extremely prosperous relationship between cultivated bacteria and industrial applications. Specialized bacterial strains, their produced proteins, and small molecules are used in industries involved in food processing, biotek production, cosmetics, materials chemistry, and pharmaceutical drug discovery and production. In fact, bacteria are likely the best hope for discovery of novel antibiotics to combat the ever growing prevalence of antibiotic-resistant pathogens (Wright, 2012). Moreover, greater than 10,000 biologically active metabolites with therapeutic properties against cancer, HIV, inflammation, and many more human diseases are known from cultured actinobacteria alone, most of which are produced by a single genus (*Streptomyces*) (Bridy, 2005). Full genome sequencing of cultured bacteria also brings light to the fact that, in most cases, the isolated secondary metabolites of even well-studied producers barely scratch the surface of the biosynthetic potential encoded within their DNA (Hentley et al., 2002; Lidwary et al., 2007). Extrapolating what we know from these prolific cultured strains, we can hypothesize that the potential for discovery of novel biocatalysts and

biosynthetic gene clusters from the uncultured majority is massive.

In the last decade or so, the field of metagenomics has proven to be a fruitful means for accessing the biosynthetic machinery of uncultured bacteria, thus circumventing traditional molecular methods that rely on cultivation. Metagenomics is the analysis of DNA from a mixed population of organisms and initially involved the cloning of either total or enriched DNA directly from the environment (eDNA) into a host that can be easily cultivated (Herscovici et al., 2004; Miao and Davies, 2008). More recently, advances in next generation sequencing (NGS) technologies allow isolated eDNA to be sequenced and analyzed directly from environmental samples (Zickler et al., 2012). Using a variety of functional or bioinformatic screening methods, novel biocatalysts and small molecule biosynthetic genes can be identified at an increasing pace. Metagenomics in industrial applications has yielded numerous enzyme biocatalysts used in the production of important commodities, such as biotens (Xing et al., 2012) and detergents (Lorenz and Eck, 2008). In the field of natural product drug discovery, metabolites or putative pathways for novel known and novel previously unreported structural families have been isolated from soils (Chang and Brady, 2011; Feng et al., 2011), sponges (Forsman et al., 2012; Piel et al., 2008a), lichens (Fath et al., 2011; Schradl et al., 2012), insects (Piel, 2007), and many more ecological habitats using metagenomic methods. In many cases, the challenge still remains to link biosynthetic genes to products; however, several examples of successful heterologous expression or *in vitro* characterization of biosynthetic genes have been reported (Brady et al., 2001; Brady and Clardy, 2005a; Long et al., 2002). For detailed reviews, see Piel (2011), Nikolouli and Moushina (2012), and Brady et al. (2008). Excitingly, research on uncultured bacteria has shown that unproven biosynthetic enzymes and transformations can be found in these organisms at high frequency. In this perspective, we discuss strategies for

Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas

Soil Metagenomics: new challenges and biotechnological opportunities

Hernández-León R, I Velázquez-Sepúlveda, MC Orozco-Mosqueda, G Santoyo

Resumen. El suelo es un sistema complejo que alberga una gran cantidad y diversidad de microorganismos. Hasta hace poco, sólo se podía tener acceso al estudio de un pequeño porcentaje de la microbiota que habita en este ecosistema. Actualmente, con la metagenómica se ha logrado conocer y estudiar en más detalle todo ese material genómico desconocido. Se han descubierto nuevas moléculas con aplicaciones biotecnológicas y se ha profundizado en entender mejor las diferentes interacciones microbiológicas en diversos ambientes, algunos con características extremas. En este ensayo se analizaron los trabajos más recientes en el área de la metagenómica, con énfasis en aquellos relacionados con el suelo. Asimismo, se describen los logros alcanzados por el proyecto Metacontrol (metagenómica de suelos supresores de enfermedades), y finalmente, proponemos los diferentes desafíos que ha de superar la metagenómica, así como las nuevas oportunidades biotecnológicas que surgen con esta nueva ciencia.

Palabras clave: Metagenómica; Suelo; Microorganismos.

Abstract. Soil is a complex system that includes a great number and diversity of microorganisms. Until recently, only a small percentage of the biota was known and could be studied. Currently, it is possible to have a deeper knowledge of all that unknown genomic material with the development of new tools, like metagenomics. New molecules have been discovered with various biotechnological applications and knowledge of the diverse microbiological interactions in several environments, some of them with extreme life conditions, is much higher. We analyze the most recent literature in the field of metagenomics in this study, especially that related with the soil. Achievements of the Metacontrol project (metagenomics of disease-suppressive soils) are also described. We finally propose various challenges to be overcome in metagenomics, and new biotechnological opportunities emerging with this new science.

Keywords: Metagenomics; Soil; Microorganisms.

20. Capoen, B. *Phagegen-activated genomes: what have we learned so far?* *Mol. Microbiol.* **88**, 277–282 (2013).
21. Lorenz, P. S. & Malmgren, M. Z. *Genome mapping by fragmenting cellular clones: a metagenomic analysis* *Genomics* **2**, 221–229 (1986).
22. Singh, V. et al. *PROCCO*: an online tool for extracting the structure and function of conserved open reading frames using metagenomic information. *BMC Bioinformatics* **9**, 27 (2008).
23. Saly, M. *From Metagenomics: The Success of Self-Organized Criticality* *Emerging Infectious Diseases* **14**(4).
24. Wainman, A. S., S. & Colwell, R. R. *Virulence genes in aquatic metagenomes*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 66–114 (2002).
25. Paul, J., Jadhav, N. & DeWaal, B. *Diversity of microbial DNA in marine systems*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 175–178 (1997).
26. Zhu, J., Jiang, B. & Zhou, J. *Characterization of streptomycin (STR) gene sequences in metagenomes by water from Heilong, Asia*. *Environ. Microbiol.* **42**, 2227–2234 (2000).
27. Smith, M. J. & Soren, F. *Metagenomics and genetic applications of prokaryotic marine bacteria*. *Mar. Biol. Rev.* **84**, 101–112 (2002).
28. Lorenz, P. *Environmental and applied metagenomics*. *Microbiol. Biotechnol.* **1**(1). <http://www.springer.com/978-3-70-910000-0> (2002).

29. Wainman, A. S., Colwell, R. R., Saly, M., DeWaal, B. & Jovine, R. V. M. *Genetic diversity of marine prokaryotes*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 3812–3816 (1991).

Acknowledgements
Support from the National Science Foundation and Moore Foundation is gratefully acknowledged.

Competing financial interests
The authors declare no competing financial interests.

Online links

DATABASES
The following terms in this article are linked online to [Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
GAP4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
GAP4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

FURTHER INFORMATION
Frontiers in Microbiology <http://www.frontiersin.org>
PROCCO <http://www.procco.org>
GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
Phylogenetic programs <http://www.phylo.com>
Phylogenetic programs <http://www.phylo.com>
Sequence alignment <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
Access to this interactive data has been granted.

it, however, that any application has to be designed with asymptotic constraints in mind, leading to suboptimal process and reaction conditions. Instead of designing a process to fit a mediocre enzyme, it is conceivable that the uncultivated microbial diversity, together with *in vitro* evolution technologies, might be used to find a suitable natural enzyme, that can serve as a backbone to produce a designer enzyme that optimally fits process requirements that are solely dictated by substrate and product properties¹.

Novelty. For industries that produce bulk commodities such as high-performance detergents, a single enzyme backbone with superior functionality that has an entirely new sequence would be useful to avoid infringing competitors' intellectual property rights. This problem is exacerbated by the fact that substitutions at nearly every position in the mature T7 α domain and TPN (nuclease protease) loops, from *Escherichia coli* (sequenced) mutants, have been claimed in patents².

Metastase diversity. The pharmaceutical and supporting fine-chemicals industries often seek entire sets of multiple diverse biocatalysts to build *in-house* toolboxes for biotransformations³. These toolboxes need to be rapidly accessible to meet the strict timelines of a biosynthetic feasibility evaluation in competition with traditional synthetic chemistry.

Exotic metabolites. Many pharmacologically active secondary metabolites are produced by bacteria that live in complex ecosystems (see Glossary) or by bacteria that inhabit niches that are difficult to recultivate *in vitro*⁴. So, although there are reports on how to circumvent this general problem of microbial cultivation either by mimicking natural habitats⁵ or by allowing for interspecies communication after single cell micro-encapsulation⁶, the cloning and heterologous expression of biosynthetic genes that encode secondary metabolites (usually present as gene clusters) is the most straightforward and reproducible method of accessing their biosynthetic potential.

Industrial enzyme applications

Enzymes are used in a wide range of applications and industries⁷. They are required in only minute quantities to synthesize kilograms of structurally challenging chiral esters that are used as building blocks to produce highly active pharmaceuticals⁸, and at a kiloton/year scale as active ingredients for bulk products such as high-performance

Abstract

Metagenomics and industrial applications

Patrick Lorenz and Jürgen Eck

Abstract | Different industries have different preferences to probe the enormous resource that is uncultivated microbial diversity. Currently, there is a global political drive to promote white industrial biotechnology as a central feature of the sustainable economic future of modern industrialized societies. This requires the development of novel enzymes, processes, products and applications. Metagenomics promises to provide new molecules with diverse functions, but ultimately, complex systems are required for any new enzyme-based biocatalytic molecules to become an economic success. This review highlights industrial efforts and achievements in metagenomics.

Metagenomics has the potential to substantially expand industrial production. The enrichment of the enormous biological and molecular diversity, as shown by Terecik¹, Nishi² and their co-workers, as truly astonishing. A pristine soil sample might contain in the order of 10⁷ different bacterial species. More than one million novel open reading frames, many of which encode putative

enzymes, were identified in a single effort that sampled marine prokaryotic plankton trapped from the Sargasso Sea.

An industrial perspective

In this perspective, the discussion is limited to prokaryotes, as their genomes are most easily targeted by the functional screening tools available in metagenomics and because it is assumed, based on published literature, that the largest biodiversity occurs in the bacterial lineage^{3–5}. Different industries are interested in exploiting the resource of uncultivated microorganisms that has been identified through large-scale environmental genomics for several reasons detailed below.

The ideal biocatalyst. For any industrial application, enzymes need to function sufficiently well according to several application-specific performance parameters (see 1). With the exception of yeasts and filamentous fungi, access to novel enzymes and biocatalysts has largely been limited by the comparatively small number of culturable bacteria. A corollary of this limitation

Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms

Jo Handelsman*

Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin

INTRODUCTION	669
HISTORY OF THE CULTURE DIVIDE	670
Early Microbiology and the Microscope	670
Modern Microbiology—a Pure Culture Is Not Enough	670
THE PARADIGM SHIFT	671
cDNA Analysis and Cloning	671
METAGENOMICS—CULTURE-INDEPENDENT INSIGHT	673
APPROACHES TO METAGENOMIC ANALYSIS	673
Sequence-Based Analysis	673
Functional Metagenomics	675
Heterologous expression	675
Identifying active clones—screens, selections, and functional anchors	675
ECOLOGICAL INFERENCE FROM METAGENOMICS	676
Symbiosis	676
Bacterial-aphid symbiosis	676
Prokaryote-tube worm symbiosis	676
Competition and Communication	677
What can metagenomics tell us about microbial competition and communication?	677
Role of small molecules	677
Sequence-based screening for small molecules	677
Antibiotics as signal molecules	678
Biogeochemical Cycles	680
Acid mine drainage	680
Sargasso Sea	680
Population Genetics and Microheterogeneity	680
CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS	682
REFERENCES	682

INTRODUCTION

Microbiology has experienced a transformation during the last 25 years that has altered microbiologists' view of microorganisms and how to study them. The realization that most microorganisms cannot be grown readily in pure culture forced microbiologists to question their belief that the microbial world had been conquered. We were forced to replace this belief with an acknowledgment of the extent of our ignorance about the range of metabolic and organismal diversity.

This change fostered a revolution in microbiological thought. At the heart of this revolution was the convincing demonstration that the uncultured microbial world far outstrikes the cultured world and that this unseen world could be studied (105-108). This change in thinking was prompted by another, equally important realization: microorganisms underpin most of the biogeochemical cycles and many human health conditions that were previously thought to be driven by inorganic processes and stress, respectively. The glimmers of insight into the influence that microorganisms exert on the world propelled microbiologists to pursue the uncultured

world. In 1931, Waksman optimistically believed that "a large body of information has accumulated that enables us to construct a clear picture... of... the microscopic population of the soil" (145), and in 1923 *Koeppe's Manual* stated categorically that an organism could be classified without being cultured (133).

By the mid-1980s, however, microbiologists had lost this confidence, and the language and practice of microbiology changed to accommodate the vast unknown of uncultured life. Concepts, assumptions, images, and words needed to be replaced when it became evident that they were based upon the premise that microorganisms did not exist unless they could be cultured. Pace and Orlidge highlighted the need for nontraditional techniques to understand the microbial world: "The simple morphology of most microbes provides few clues for their identification; physiological traits are often ambiguous. The microbial ecologist is particularly impeded by these constraints, since so many organisms resist cultivation, which is an essential prelude to characterization in the laboratory" (107).

In the ensuing years, microbiologists dedicated intense effort to describing the phylogenetic diversity of exotic and ordinary environments—ocean surfaces, deep sea vents, hot springs, soil, animal tissues and gut, human oral cavity and intestine. Many new lineages were classified based on their molecular signatures alone. The next challenge was to elucidate the func-

* Mailing address: Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706. Phone: (608) 263-4763. Fax: (608) 265-5390. E-mail: jsh@plantpath.wisc.edu

Tabla 1. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos en la historia de la humanidad.

Aplicación	Zona geográfica	Año	Bibliografía
Fermentación de granos de cereales para producir una bebida alcohólica	Aldea neolítica de Jiahu en China	7000 aC	McGovern et al., 2004 (2)
Fermentación de granos de cereales para producir una bebida alcohólica	Montañas Zagros del norte de Mesopotamia.	5400–5000 aC	McGovern et al., 2004(2)
Indicio de la producción de vino	Tepe en Mesopotamia	5400–5000 aC	McGovern et al., 1996 (2)
Indicio de la producción de vino	Dikili Tash en Grecia	5000 aC	Valamoti et al., 2007 (3)
Producción a gran escala de vino	China, Mesopotamia y Grecia	5000 a. C.	Borneman et al., 2013 (4)
Producción de pan con levadura	Egipto	2000-1200 aC	Samuel, 1996 (5)

Aplicación	Zona geográfica	Año	Bibliografía
Prácticas de fermentación	Asia, Mesopotamia, Egipto y Viejo mundo		Skard y Legras, 2011 (6)
Producción de alcohol a base de remolacha	Región agrícola-industrial de Lille	1857	Gal, 2008 (7)
Asociación de microorganismos con enfermedades y proponiendo métodos de vacunación como los utilizados contra el ántrax (1881) y la rabia humana (1885)	Pouilly-le-Fort, Francia	1857	Gal, 2008 (7) Pasteur, 2002 (8) Florkin y Florkin, 2011(9)
Uso del glicerol para la fabricación de explosivos	China	Primera Guerra Mundial	Wang et al., 2001 (10)
Producción a gran escala de penicilina por Fleming	Londres, Reino Unido	década de 1940	Neushul, 1993 (11)
Desarrollo de procesos industriales basados en microorganismos	Francia	Final de la Segunda Guerra Mundial	Jacob et al., 1960 (12); Ames y Martin, 1964 (13); Holloway, 1969 (14)
Obtención de una patente (Ananda Chakrabarty) a partir de una variante de <i>Pseudomonas putida</i> que es eficaz en la digestión de compuestos encontrados en derrames de petróleo crudo	Dordrecht, Países Bajos	Década de 1980	Holloway, 2014 (15)
Análisis de endonucleasas bacterianas que hidrolizan el ADN de los virus que invaden estos microorganismos.	Ginebra, Suiza	Principios de la década de 1970	Smith y Nathans, 1973 (16); Arber, 1974 (17)
Modificación genética de <i>Escherichia coli</i> para producción de insulina artificial	Limerick, Irlanda	década de 1970	Walsh, 2012 (18)
Construcción de células de <i>E. coli</i> quiméricas conteniendo ADN de <i>Xenopus laevis</i>	California, EE. UU.	Década de 1970	Cohen et al., 1973 (19); Berg y Mertz, 2010 (20)

Anexo 55: Aplicaciones biotecnológicas en la humanidad

Aplicación	Zona geográfica	Año	Bibliografía
Aislamiento de una ADN polimerasa termoestable de la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> : Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	California, EE. UU.	1976	Chien et al., 1976 (21); Saiki et al., 1988 (22)
Manipulación genética de microorganismos	Francia	A partir de la década de 1980	Simon y Chopin, 1988 (23); Olsen, 2016 (24)
Descubrimiento de Archeas a partir de 16S rRNA	Estados Unidos	década de 1970	Woese y Fox, 1977 (25); Woese et al., 1990 (26)
Las bacterias RCP tienen genomas pequeños y composiciones ribosómicas inusuales, además de carecer de numerosas vías biosintéticas	California, EE. UU.	2015	Brown et al., 2015 (27)
Las bacterias DPANN se ha definido como una función de la capacidad metabólica	California, EE. UU.	2015	Rinke et al., 2013(28) ; Castelle et al., 2015 (29)
Descubrimiento del grupo bacteriano Candidate Phyla Radiation (CPR) y Archaea superphylum DPANN	Uppsala, Suecia	2016	(Spang and Ertem, 2016 (30)
Descubrimiento del papel biotecnológico de muchas arqueas, como Halobacterium, Pyrococcus y Thermococcus	Estados Unidos	2016	Coker, 2016 (31) ; Waditee-Sriartha et al., 2016 (32)
Descubrimiento de PGP-M, microorganismos promotores del crecimiento vegetal.	Estados Unidos	2016	Coker, 2016 (31) ; Waditee-Sriartha et al., 2016 (32)

Anexo 56: Preparaciones enzimáticas

Tabla 2. Preparaciones enzimáticas a partir de microorganismos y su utilidad.

Preparación enzimática	Microorganismo de origen	Utilidad	Documentado por
Amilasas	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Mejora en la preparación de la masa para hornear, y permite la adquisición de alimentos precocinados.	Omennu et al., 2005 (50); Djekrif-Dakhmouche et al., 2006 (51); Adejuwon et al., 2015 (52); Plois et al., 2016 (53); Salman et al., 2016 (54).
Producción de lipasas extracelulares	<i>A. niger</i> y <i>Rhizomucor miehei</i>	Facilitan la recuperación de enzimas. Hidrólisis de la grasa de la leche, mejorando la aromatización de los productos lácteos.	Rodriguez y Fernández-Lafuente, 2010 (55); Messias et al., 2011 (56)
Producción de lipasas extracelulares	<i>A. niger</i> y <i>Rhizomucor miehei</i>	Mejoramiento del aroma de las bebidas y la calidad de la margarina y la mayonesa.	Sharma et al., 2001 (57)
Producción de celulasas y pectinasas	Cultivos de hongos filamentosos: <i>Clado sporium Sphaerospermum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Trichoderma viride</i>	Clarificación de jugos y la reducción de la viscosidad. Degradación de la biomasa vegetal.	Andersen et al., 2016 (58) Ismail et al., 2016 (59)
Inmovilización de celulasas y pectinasas enzimas en soportes prefabricados o matrices de polímeros	Hongos filamentosos	Uso en reactores industriales	Mateo et al., 2007(60); Sheldon, 2007 (61)
Aromas naturales y aromas para alimentos	<i>A. niger</i> y <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Cosméticos, jabones, velas y alimentos	Carroll et al., 2016 (62)
Síntesis de vainillina	<i>A. niger</i> y <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Saborizante de alimentos, a partir de salvado de maíz autoclavado	Lesage-Meessen et al. (63)

Preparación enzimática	Microorganismo de origen	Utilidad	Documentado por
Fermentación del café	levaduras del género <i>Pichia</i>	Mejorar la calidad y el sabor de la bebida, ya que aumentan la producción del acetato de isoamilol de sabor natural.	Saerens y Swiegers, 2016 (64)
Síntesis de acetoina	<i>E. coli</i>	Convertir enzimáticamente precursores baratos, como la glucosa o el glicerol, en compuestos aromáticos costosos.	Nielsen et al., 2010 (65).

Anexo 55: Aplicaciones biotecnológicas en la agroindustria

Tabla 3. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos con utilidad en la agroindustria.

Microorganismos	Efecto	Autor
<i>Phytophthora palmivora</i> : Suspensión de blastosporangios	Controla <i>Marasmius odoratus</i>	McRae, 1988 (67)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz) Sacc. F. sp. <i>Aschyromyces</i>	Induce síntomas de antracnosis en <i>Aschyromyces virginica</i>	McRae, 1988 (67)
<i>Puccinia cataliculata</i>	Controla el espigamiento temprano <i>Cyperus esculentus</i> e inhibiendo completamente la floración y reduciendo la formación de tubérculos	Duke et al., 2015 (68)
<i>B. thuringiensis</i> (Bt): producen endotoxinas Cry y Cyt	Acción entomopatógena, controlando las plagas presentes en la col, la papa y los granos.	Sarwar, 2015a (69)
Especies transgénicas que expresan niveles de proteína Bt, como el maíz, el tabaco y el maíz	Prevención de la propagación de las orugas, especialmente los lepidópteros	Khan et al., 2016 (70)

Microorganismos	Efecto	Autor
Baculovirus infectando orugas y huevos de plagas como <i>Spodoptera frugiperda</i>	Reducción de las pérdidas agrícolas causadas por esta oruga, especialmente en el maíz.	Popham et al., 2016 (71)
Hongos patógenos de insectos: <i>Beauveria</i> , <i>Metarhizium</i> y <i>Paecilomyces</i>	Estos se utilizan con mayor frecuencia contra las orugas foliares en invernaderos u otros lugares donde la humedad es relativamente alta	Sarwar, 2015b (72)
Productos de la bacteria <i>Streptomyces avermitilis</i> conocidos como avermectinas	Pesticidas modelo, no tóxicos para los mamíferos y activos contra los nematodos, incluso en dosis muy bajas.	Sarwar, 2015b (72)
<i>B. firmus</i>	Induce parálisis y mortalidad de nematodos y larvas adultos, incluyendo <i>Rhadinobus similis</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> y <i>Ditylenchus dipsaci</i> , lo que sugiere la síntesis de metabolitos tóxicos	Mendoza et al., 2008 (73)
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Produce metabolitos tóxicos (inhiben el desarrollo y eclosión de huevos) cuando se cultivan en biorreactores.	Twomey et al., 2000 (74)
<i>Pectinaria</i> sp.	Utilizar el parasitismo como método de control.	Davies et al., 2011 (75)
Hongos del género <i>Trichoderma</i>	Control biológico de las plagas	Druzhinina et al., 2011; Howell, 2003 (76)
<i>Trichoderma</i> spp.	Parasitar y controlar con éxito especies de hongos fitopatógenos como <i>Sclerotinia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i> y <i>Macrophomina</i>	Jones et al., 2014(77), 2016 (78); Saravanakumar et al., 2016 (79); Carrero-Carron et al., 2016 (80); Khaledi y Taheri, 2016 (81)
<i>Trichoderma</i> spp.	Efecto nematocida en la vesícula formación de <i>Meloidogyne</i>	Sahehani y Hadavi, 2008 (82); Feyta et al., 2016 (83); Sokhandani et al., 2016 (84)

Microorganismos	Efecto	Autor
Microorganismos simbióticos como los hongos micorrizas y las rizobacterias	Desarrollan actividades que pueden mejorar la condición física de la planta, facilitando la adquisición de nutrientes.	Cheng et al., 2016 (121); Walter et al., 2016 (85)
PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas)	Actúan a través de mecanismos directos: biofertilización, síntesis de auxinas, citoquininas y giberelinas e indirectos: antibiosis, resistencia sistémica, competencia por nutrientes, promueven el crecimiento de las plantas.	Luginberg y Kavulova, 2009 (86)

Anexo 58: Microorganismos y biocombustibles.

Tabla 4. Microorganismos y biocombustibles. Se presentan los productos y servicios, anotaciones clave y la bibliografía donde se reporta.

Producto y servicios	Anotaciones	Bibliografía
Producción de etanol de segunda generación obtenida de biomasa lignocelulósica	Se necesitan mejoras para que la tecnología sea económicamente competitiva. Se ha identificado tolerancia al ácido acético (inhibidores de los hidrolizados de lignocelulosa)	Lino et al., 2016 (95) Meijnen et al., 2016 (96)
Biodegradación de crudos	<i>Pseudomona</i> spp	Ostos, et al (97)

Producto y servicios	Anotaciones	Bibliografía
Descubrimiento de las isomerasas funcionales de xilosa	Dieron como resultado la creación de nuevas levaduras capaces de fermentar azúcares de 5 carbonos (C5), así como azúcares de 6 carbonos (C6).	Knyper et al., 2005; (98)
Levaduras capaces de fermentar azúcares de 5 carbonos (C5), así como azúcares de 6 carbonos (C6).	La co-fermentación de azúcares C5 con jugo de caña puede producir hasta un 37% más de etanol en fermentadores de primera generación	Losordo et al., 2016 (99)
Producción de etanol de segunda generación.	Mejoras genéticas de la levadura, prospección de nuevas fuentes de celulosa, como la silvicultura y los residuos de cultivos (corteza de eucalipto, maíz y cáscaras de arroz)	McIntosh et al., 2016 (100)
Biogás: combinación de metano, CO2, nitrógeno, H2S, y trazas de otros gases producidos por la digestión anaeróbica (AD) obtenidas de la conversión microbiana de la biomasa.	El conocimiento sobre los consorcios microbianos involucrados en este proceso es limitado debido a la falta de datos filogenéticos y metabólicos sobre estos microorganismos	Appels et al., 2008 (101); Wirth et al., 2012 (102); Chojnacka et al., 2015 (103)
Producción de biogás	Proteobacterias, cloroflexi, firmicutes, bacteroidetes, actinobacterias, bacteroides, acidobacterias y espiroquetas	Choutari et al., 2005 (104); Chojnacka et al., 2015 (103)
Producción de biogás	<i>Methanogenic Archaea</i> , como <i>Methanosarcina barkeri</i> , <i>M. frisia</i> y <i>Methanobacterium formicicum</i> . No se conocen los genes que controlan estos sistemas con alta eficiencia	Satpathy et al., 2016 (105); Goswami et al., 2016. (106)

Anexo 59: Microorganismos y sus metabolitos

Tabla 5. Microorganismos y compuestos químicos. Se presentan los compuestos químicos, microorganismos asociados y la bibliografía donde se reporta.

Compuesto químico	Microorganismo	Autores
El ácido cítrico: aditivo alimentario por fermentación de glucosa, melaza de remolacha, melaza de caña o almidón de maíz.	<i>A. niger</i>	Adham, 2002 (107) ; Ikram-ul et al., 2004(108); Wang et al., 2016 (109)
Ácido láctico	<i>Lactobacillus spp.</i> cultivado en suero ampliamente utilizados en las industrias alimentaria, farmacéutica, de cuero y textil (productos biodegradables y polilácticos biocompatibles)	Gao et al., 2011 (110) Hofgndahl y Hahn-Hägerdal, 2000 (111)
Ácido láctico	<i>Rhizopus.sp.</i> en condiciones aeróbicas en medio rico en glucosa y con cantidades limitadas de nitrógeno	Papagianni, 2004 (112) ; Fu et al., 2014 (113)

Compuesto químico	Microorganismo	Autores
Ácido láctico	Fermentación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio a base de glucosa y jugo de caña	Saitoh et al., 2005(114) ; Valli et al., 2006 (115)
Producción microbiana de acetona y butanol	Género Clostridium	Wang et al., 2001 (10)
Fermentación del glicerol	Bacterias del género Clostridium o Enterobacteriaceae	
Síntesis de 1,3-DOP microbiana para generación de polímeros biodegradables y para obtener solventes, películas, adhesivos, anticongelantes y poliésteres	Microorganismos modificados genéticamente: Genes de bacterias patógenas, tales como <i>Citrobacter freundii</i> y <i>Klebsiella</i>	Biebl et al., 1999 (116)Przystalowska et al., 2015 (117)

Anexo 60: Microorganismos con aplicación ambiental

Tabla 6. Microorganismos y tecnología ambiental. Se presentan los microorganismos, la utilidad asociada a los procesos de tecnología ambiental y la bibliografía donde se reporta.

Microorganismo	Utilidad	Bibliografía
Bacterias aerobias heterotróficas o autótrofas, actinomicetos, coliformes fecales y termófilos, así como levaduras y otros hongos	Procesos de compostaje de desechos sólidos, la temperatura determina tipos microbianos y tasa metabólica.	Beffa et al., 1996(119); Tiquia et al., 2002 (120); Hassen et al., 2001 (121)
Uso directo de enzimas microbianas; las lipasas	Tratamiento de efluentes industriales que contienen principalmente triglicéridos	Jamie et al., 2016 (122); Hasan et al., 2006 (118)

Microorganismo	Utilidad	Bibliografía
Aumento de la biomasa de las plantas o aumentar los rendimientos de productos de interés agrícola o farmacológico	Mejora de la nutrición de las plantas, la protección de patógenos, la tolerancia al estrés y el suministro de la estructura del suelo	Boyer et al., 2016 (137); Gabriele et al., 2016 (138); Köhl et al., 2016 (139); Smith y Read, 2008 (140).
Biofertilizantes: hongos micorrizicos arbusculares (FAM)	Producción con bajo consumo de productos químicos	Lanfranco et al., 2016 (141)
Tecnología de micorrizas	Aumentar la abundancia y diversidad de las FMA y, en consecuencia, la eficiencia de la producción de cultivos.	Rillig et al., 2016 (142)

Anexo 61: Microorganismos con aplicación ambiental

Microorganismo	Utilidad	Bibliografía
Uso directo de enzimas microbianas: peroxidasas, fenoloxidasas, dioxigenasas y compuestos similares a fenoloxidasas	Eliminación de contaminantes presentes en las aguas residuales	Durán y Esposito, 2000 (123)
Las peroxidasas, polifenol oxidasas y tirosinasas obtenidas de microorganismos como <i>P. syringae</i> , <i>Arthromyces ramosus</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	Eliminación de fenoles, bifenoles y clorofenoles	Tatsumi et al., 1996 (124) ; Tong et al., 1998 (125) ; Akay et al., 2002 (126) ; Kampmann et al., 2014 (127)
Las lacasas de <i>P. cinnabarinus</i>	Degradación del benzopireno	Rama et al., 1998 (128)
Peroxidasas de manganeso de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Nematoloma frowardii</i> y <i>Phlebia radiata</i>	Eliminación de lignina en las aguas residuales	Hofrichter et al., 1999 (129) ; Kunz et al., 2001 (130)
Celdas microbianas que usan electrones donados por sustratos orgánicos de bajo valor, contenidos en los desechos (MFC)	Tratamiento de desechos sólidos o incluso aguas residuales	Pendyala et al., 2016 (131)
Biofilm BAC carbono biológicamente activo (BAC)	Mejorar la purificación del agua potable: biodegradar las cianotoxinas y sustancias orgánicas que pueden cambiar el sabor y el olor del agua potable	Simpson, 2008 (132); Brown y Lauderdale, 2006 (133)
Biopolímeros: polihidroxicanoatos (PHA) y los más conocidos entre ellos son poli (beta-hidroxibutirato; PHB), poli (beta-hidroxivalerato; PHV) y poli (hidroxibutirato-co-valerato; PHB-V)	Cupriavidus necato: acumula aproximadamente el 80% de su masa seca en el polímero y utiliza diferentes tipos de sustratos, como glucosa, fructosa y glicerina en bruto	Philip et al., 2007 (134); Figueiredo et al., 2014 (135); Mohanty et al., 2000 (136)

Microorganismo	Utilidad	Bibliografía
Aumento de la biomasa de las plantas o aumentar los rendimientos de productos de interés agrícola o farmacológico	Mejora de la nutrición de las plantas, la protección de patógenos, la tolerancia al estrés y el suministro de la estructura del suelo	Boyer et al., 2016 (137) ; Gabrielle et al., 2016 (138) ; Köhl et al., 2016 (139); Smith y Read, 2008 (140)
Biofertilizantes: hongos micorrízicos arbusculares (FAM)	Producción con bajo consumo de productos químicos	Lanfranco et al., 2016 (141)
Tecnología de micorrizas	Aumentar la abundancia y diversidad de las FMA y, en consecuencia, la eficiencia de la producción de cultivos.	Rillig et al., 2016 (142)

Anexo 62: Microorganismos con aplicación médica

Tabla 7. Microorganismos y tecnología médica. Se presentan los microorganismos, la utilidad asociada a los procesos de tecnología ambiental y la bibliografía donde se reporta.

Microorganismos	Utilidad	Bibliografía
Introducción de la bacteria <i>Wolbachia</i> como un endosimbionte del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	Controlar la propagación de vectores parásitos como los de los géneros <i>Aedes</i> y <i>Anopheles</i> , reduce la vida útil del mosquito	Walker et al., 2011(143); Cook et al., 2008 (144); Turley et al., 2009 (145); Bian et al., 2010(146)
Mosquitos que contienen la cepa <i>Wolbachia wMelPop-CLA</i>	Reducción de aproximadamente el 50% de la supervivencia de las hembras en comparación con los mosquitos sin la cepa.	McMeniman et al., 2009 (147)
Activación de las endotoxinas (Cry y Cyt) producida naturalmente por la bacteria <i>B. thuringiensis</i> serotipo <i>israelensis</i> (Bti)	Prevenir la proliferación del vector del virus del dengue. Estas toxinas, son cristalinas inactivas que cuando son ingeridos por las larvas de <i>Aedes</i> , son solubilizados por proteasas intestinales lisis celular, septicemia y muerte.	Gill et al., 1992 (148); Mohiddin et al., 2016 (149); Setha et al., 2016 (150); Paris et al., 2011, 2012 (152,153); Wu et al., 2016 (154); Durbin, 2016 (155); Pitisutritum y Bouckennooghe, 2016 (156).

Tabla 8. Tipos de vacunas y descripción.

Tipos de vacunas	Descripción	
Vacunas atenuadas o vivas	Utilizan patógenos atenuados	
Vacunas inactivadas	Contienen patógenos completamente inactivados o fraccionados o solo componentes antigénicos de estos patógenos, subdivididos:	
	B1	Enteros o fraccionados
	B2 vacunas de subunidades	Utilizan proteínas, péptidos o ácidos nucleicos como antígenos
	B3 toxoides	Usan toxinas patógenas inactivadas como antígenos
	B4 vacunas de carbohidratos	Producidas a partir de polisacáridos, oligosacáridos y glicanos
B5 vacunas conjugadas	Tienen polisacáridos combinados con proteínas de transporte	
Vacunas de ADN	Contienen plásmidos que contienen genes que codifican antígenos inmunogénicos	
Vacunas recombinantes	Contienen virus diseñados para transportar genes que codifican antígenos de otros virus que causan enfermedades.	

Anexo 63: Vacunas

Tabla 9. Características de las vacunas inactivadas; vacunas de subunidades, toxoides y carbohidratos.

Vacunas inactivadas	
Vacunas de subunidades	
Características	Referencias
Estimuladores efectivos de las respuestas inmunes humorales	Nabel, 2013 (157)
Requieren dosis múltiples para la inmunidad a largo plazo, ya que no estimulan la producción de inmunoglobulina A (IgA) o respuestas de células T citotóxicas porque el virus no lo hace	Nabel, 2013 (157)
Actualmente disponibles para la hepatitis A, la rabia, el cólera, la influenza, la poliomielitís (Salk), la fiebre tifoidea y la tos ferina; Streptococcus pneumoniae, virus de la hepatitis B, y VPH (tipos 16 y 18 representan aproximadamente el 70% de los casos).	Bobbala y Hook, 2016 (158); Reed y Schmidt et al., 2016 (159); Callison et al., 2008 (160); Roden y Wu, 2006 (161)

Características	Bibliografía
Son poco reactogénicas, lo que es una ventaja en términos de efectos adversos y desventaja en términos de estimular respuestas inmunes potentes y duraderas	Bobbala y Hook, 2016 (158)
Requieren la administración conjunta de adyuvantes eficientes para activar y modular las respuestas inmunitarias	Reed y Schmidt et al., 2016 (159)
Son más seguras porque la virulencia de los organismos muertos no se puede revertir	Nabel, 2013 (157)
Vacunas de toxoides	
Características	Bibliografía
Estimulan la respuesta inmune mediante el uso de toxinas patógenas inactivadas como antígenos	Nabel, 2013 (157)
Disponibles para el tétanos, la difteria y el ántrax	Nabel, 2013 (157)
Las vacunas de carbohidratos	
Características	Bibliografía
Las respuestas de defensa del huésped es estimulada por los los receptores de reconocimiento de glicocáliz (PRR)	Astronomo y Burton, 2010 (162); Pifferi et al., 2017 (163).
La baja inmunogenicidad es un obstáculo importante para la fabricación de vacunas de carbohidratos, y debido a la falta de protección inmunológica a largo plazo. Pocas de estas vacunas están disponibles comercialmente en la actualidad: vacunas contra Salmonella typhi y Neisseria meningitides	Keitel et al., 1994(164) ; King et al., 1996 (165)
Los enlaces covalentes tradicionales entre los carbohidratos y las proteínas portadoras se han utilizado para aumentar las respuestas inmunes a los antígenos polisacáridos, obteniendo así vacunas conjugadas	Nishat y Andreana, 2016 (166).
Las vacunas de proteína-polisacárido inducen memoria inmunológica, una protección que dura más que la inducida por el uso de antígenos polisacáridos simples. Las vacunas conjugadas ya se utilizan actualmente en el control de Haemophilus influenza tipo B y S. pneumoniae	Knuf et al., 2011 (167) ; Frenck y Yeh, 2012 (168) ; Pichícheró, 2013 (169).

Anexo 64: Vacunas

Tabla 10. Características de las vacunas de ADN.

Las vacunas de ADN	
Características	Bibliografía
Consisten en un plásmido de expresión que contiene genes que codifican uno o más antígenos inmunogénicos de interés	Robinson, 1997 (170)
El uso de promotores virales mejora la expresión génica y mejora la estabilidad del ARNm relacionada con la síntesis de antígenos	Robinson, 1997 (170)
Actualmente se estudian nuevos adyuvantes inmunológicos y métodos de inserción de este material en las células del organismo huésped. La investigación microbiológica se han centrado en el VIH, la hepatitis B, la hepatitis C, la influenza y el VPH.	Brouillette et al., 2016 (171)

Características	Bibliografía
Inserción con aplicaciones potenciales en humanos :biobolística (en estudio)	Fynan et al., 1993 (172) ; Brouillette et al., 2016 (171)
Administración intradérmica sin agujas del plásmido de ADN (estudios en primates).	Rao et al., 2006(173)
Tatuaje intradérmico:en el cual el plásmido de ADN se envía a la capa epidérmica utilizando miles de inyecciones (en estudio).	Becker et al., 2008 (174)

Dirección General de Bibliotecas UHQ

Anexo 65: Vacunas recombinantes

Tabla 11. Características de las vacunas recombinantes.

Las vacunas recombinantes (genéticas)	
Características	Bibliografía
Se preparan a partir de virus diseñados para transportar genes que codifican antígenos de otros virus que causan enfermedades para su expresión en el huésped después de la inoculación	He et al., 2000 (175)
La inmunidad se atribuye a la capacidad del virus recombinante para expresar el gen de interés en niveles altos dentro de las células huésped	He et al., 2000 (175)
Los vectores virales utilizados para este propósito se atenúan, son intrínsecamente seguros.	He et al., 2000 (175)
Los virus con mayor potencial para la producción de este tipo de vacuna son aquellos con un genoma extenso	He et al., 2000 (175)

Tabla 12. Características de los anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos monoclonales (mAbs).	
Características	Bibliografía
Emplea microorganismos, como fagos, levaduras, bacterias y virus, para mostrar repertorios de fragmentos de anticuerpos de dominio variable (ScFvs) de una sola cadena, fragmentos de unión a antígenos (Fab) o anticuerpos de dominio (Dabs) en sus superficies	Carter, 2006 (176)
Pueden obtenerse directamente de las células de memoria B de pacientes infectados con virus o de células de linfocitos de ratón	Marasco y Sui, 2007 (178)
Se han utilizado para el tratamiento de enfermedades infecciosas.	The IMPact-RSV Study Group, 1998 (179)
Palivizumab, un anticuerpo monoclonal neutralizador del virus respiratorio humano sincitial (RSV) que bloquea la replicación del virus	Kummerfeldt, 2014 (180)
Raxibacumab, que evita la unión del antígeno protector de la toxina del ántrax a sus receptores en las células huésped	Baldo, 2016 (181)
Representan una de las mayores clases de fármacos en desarrollo, y entre 2010 y 2014, 17 de los 54 fármacos proteicos aprobados fueron mAb (31.5%)	Baldo, 2016 (181)

Anexo 66. Productos biofarmacéuticos

Tabla 13. Producto biofarmacéutico, utilidad y bibliografía asociada.

Producto	Utilidad	Bibliografía
Teixobactina	Capaz de eliminar el SARM (Staphylococcus aureus resistente a la meticilina), se dirige a los lípidos esenciales para el mantenimiento de la pared celular bacteriana	Borghesi y Stronati, 2015 (192)
Insulina humana	Obtenida por expresión heteróloga a través de E. coli, para el tratamiento de la diabetes tipo I y tipo II (FDA, 1982)	Chimnanpuen et al., 2016(189) Sánchez-García et al., 2016(190)

Producto	Utilidad	Bibliografía
Hormonas (calcitonina, hormona paratiroidea, hormona del crecimiento humano, glucagón y somatropina), interferones e interleucina por proteínas heterólogas de E. coli.	El 30% de las proteínas recombinantes disponibles en el mercado se producen actualmente en sistemas procarióticos	Ferrer-Miralles et al., 2009(191); Overton, 2014(192)
4-hidroxibenzoato, la tirosina y la fenilalanina	1,777 productos no nativos de E. coli, de los cuales 279 tienen aplicaciones comerciales	Zhang et al., 2016(193)
Insulina, análogos de insulina y glucagón, hormonas, vacunas (antígeno de superficie del virus de la hepatitis B) y partículas similares a virus (VLP)	Obtenidas de <i>S. cerevisiae</i>	Ferrer-Miralles et al., 2009(191).
Síntesis biológica controlada de calcitonina, aminoácidos (glutamato y lisina), proinsulina	A partir de cepas modificadas de <i>S. carnosus</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>Lactococcus lactis</i>	Olmos-Soto y Contreras-Flores, 2003 (194) ; Sandgathe et al., 2003 (195) ; Liu et al., 2016 (196);Cano-Garrido et al., 2016(197)
Los polisacáridos de metabolitos secundarios	Utilizando <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> y <i>C. militaris</i>	Paterson, 2006 (198) , 2008 (199) ; Wadt et al., 2015 (200)
Síntesis de Taxol (antineoplásico)	A partir de hongos endófitos como <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	Gangadevi y Muthumary, 2008 (201) ; Liu et al., 2009 (196)

Anexo 67: microorganismos y biomateriales

Tabla 14. Biomaterial, microorganismos, utilidad y referencias asociadas.

Biomateriales/ microorganismo	Utilidad	Referencias
Esporas de promotores del crecimiento como <i>T. harzianum</i>	Control de plagas agrícolas en el futuro	Accinelli et al., 2016(205)
Los polisacáridos de origen microbiano: quitosán, el alginato, la goma xantana y la celulosa.	Uso médico debido a sus propiedades; entre ellas, que son renovables, biodegradables e imitan los componentes de la extracelular. matriz, que los hace elementos clave en los procesos biológicos	Pires y Moraes, 2015 (206); Ruholahi et al., 2016(210) ;Abdel-Gawad et al., 2017 (211)
Promotores del crecimiento como <i>T. harzianum</i>	Recubrimiento de semillas de especies agronómicas para control de plagas agrícolas	Accinelli et al., 2016 (205)
Bioplásticos	Aumento, dentro de la construcción civil, de materiales que tienen poca energía incorporada, lo que contribuye a la eficiencia energética	Ivanov y Stabnikov, 2016 (203)
Quitosano	Reparación de piel, los huesos y el cartilago	Khor y Lim, 2003 (204)
Quitosano	Quelación de metales pesados e inhibición de agentes microbianos patógenos en el agua contaminada	Ruholahi et al., 2016 (210) ;Tayel et al., 2016a (212)
Alginato polisacárido sintetizado por algas pardas y dos géneros de bacterias: <i>Pseudomonas</i> y <i>Azotobacter</i> .	Encapsulación o liberación controlada de fármacos, enzimas o células, o como una matriz para la ingeniería de tejidos	Hay et al., 2013 (213) ; Maleki et al., 2016 (214); Andersen et al., 2012 (58) ; Lee y Mooney, 2012 (215)
Alginato y el quitosano se combinan en un complejo de polielectrolito (PEC)	Membranas delgadas y transparentes: buena absorción de fluidos fisiológicos, así como la incorporación de varios compuestos bioactivos	Pires y Moraes, 2015 (206)

Biomateriales/ microorganismo	Utilidad	Referencias
Goma xantana combinada con quitosano	Inmovilización de enzimas y producción de micropartículas y membranas	Bejenariu et al., 2008 (207); Barua et al., 2016 (208) ; Velu et al., 2016(209)
Celulosa sintetizada (en abundancia) por bacterias como <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	Dialisis y andamios para la ingeniería de tejidos, tratamiento de lesiones cutáneas y el reemplazo de vasos sanguíneos de pequeño diámetro.	Pires et al., 2015 (206); Czaja et al., 2006 (212)

Anexo 68: Biosensores

Tabla 15. Biosensor, aplicación y referencias asociadas.

Biosensor	Aplicación	Bibliografía
E. coli recombinante inmovilizada que expresan organofosforado hidrolasa (OPH).	Monitoreo de contaminantes	Mulchandani et al., 1998 (221) ; Kim HJ et al., 2016(222)
Celulas E. coli como biosensores CadC-T7	alta especificidad para la detección de metales pesados	Kim KR et al., 2016(223)
Biosensor en el que las células expresan β-galactosidasa en presencia de cadmio	Monitoreo ambiental del cadmio	Shin, 2016(224)

Biosensor	Aplicación	Bibliografía
E. coli bioluminiscente	Señalar el daño en el ADN, la producción de radicales superóxido y el daño a la membrana causado por líquidos potencialmente tóxicos	Bhuradwaj et al., 2017 (225)
Biosensor de P. putida	Biosensor para catecol, nitrofenol, benceno, tolueno y otros	Rasinger et al., 2005 (226) ; Timur et al., 2007 (227) ; Banik et al., 2008 (228)
Biosensor de S. cerevisiae	Biosensor para Cu 2 ++	Stoycheva et al., 2007 (229)
Biosensor de Acidithiobacillus ferrooxidans y Leptospirillum ferrooxidans	Biosensor para Fe 2+ , S 2 O 3 2- , Cr 2 O 7 2- , y otros	Zlatev et al., 2006 (230) ; Stoycheva et al., 2009 (229)
Biosensor de Gluconobacter oxydans	Biosensor para propanodiol y etanol	Katrlík et al., 2007 (231); Valach et al., 2009 (232)

Dirección General de Epidemiología