

**INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR MUTAGÉNESIS
QUÍMICA Y RECOMBINACIÓN GENÉTICA DE LA *ESCHERICHIA COLI***

ANDREA JULIANA GARZÓN SANABRIA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2007

**INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR MUTAGÉNESIS
QUÍMICA Y RECOMBINACIÓN GENÉTICA DE LA *ESCHERICHIA COLI***

ANDREA JULIANA GARZÓN SANABRIA

Director

THOMAS K. WOOD

Ingeniero Químico Ph.D

Revisor de texto

ALVARO RAMÍREZ GARCÍA

Ingeniero Químico Ph.D

UIS

**Trabajo de grado para optar al título de
Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2007

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A MIS PADRES, que lo han sido todo en mi vida; que han permanecido siempre a mi lado; que han depositado toda su confianza y han creído en mi, por su apoyo incondicional y porque me han dado todas las oportunidades para salir adelante, para ellos con todo el amor del mundo.

A mi HERMANA que ha sido un ejemplo de disciplina, responsabilidad y dedicación. Desde muy niña me enseñó con su ejemplo de vida a que las cosas se logran con sacrificio y disciplina.

A GUSTAVO EMILIO por su especial e incondicional apoyo, porque llegaste a mi vida llenándola de felicidad y siempre estuviste ahí.

A MI FAMILIA porque de una u otra forma siempre estuvieron a mi lado

Al Dr. ÁLVARO RAMÍREZ GARCIA por sus sabias enseñanzas y su apoyo incondicional. Gracias

A la UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER porque en ella crecí como ingeniera y como persona.

A TODOS LOS PROFESORES porque de ellos aprendí.

A la UNIVERSIDAD DE TEXAS A&M, y Dr. THOMAS K. WOOD por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por asesorarme durante el tiempo que estuve investigando, y a todos mis amigos.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 CONCEPTOS BÁSICOS	4
1.2 CONDICIONES ADECUADAS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS	4
1.2.1 Medios Utilizados para El Crecimiento Bacterial.	5
1.2.2 Macronutrientes.	6
1.2.3 Micronutrientes.	7
1.2.4 Almacenamiento.	8
1.2.5 Esterilización.	8
1.3 DEFINICIÓN DE MUTACION Y TIPOS	8
1.3.1 Mutagénesis química	9
1.3.2 ¿Qué es una mutante?.	9
1.4 RECOMBINACIÓN GENÉTICA	10
1.4.1 Fusión de protoplastos.	10
1.4.2 ¿Que es un protoplasto?.	11
1.4.3 ¿Que es un plásmido?.	11
1.4.4 Estructura de los plásmidos.	11
1.5 PROTEÍNAS	12
1.5.1 Proteína FhIA.	12
1.6 METABOLISMO PRODUCTOR DE ENERGÍA DE LA <i>E.COLI</i>	12

1.6.1 Balance de fermentación.	13
1.6.2 Descomposición del piruvato.	14
1.6.3 Complejo FHL (formate hydrogen lyase).	15
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	17
2.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	17
2.2 COMO SE HIZO LA MUTAGENESIS QUÍMICA	18
2.3 COMO SE HIZO LA FUSIÓN DE LOS PROTOPLASTOS	20
2.4 SCREENING	21
2.5 PRUEBAS PARA LA DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE HIDROGENO	23
2.5.1 Método corto seguido después de la mutagenesis química.	23
2.6 MÉTODO CORTO SEGUIDO DESPUÉS DE LA FUSIÓN DE LOS PROTOPLASTOS	25
2.7 DETERMINACIÓN DE H₂ MÉTODO LARGO	25
2.8 SISTEMA ABIERTO (LOW PARTIAL PRESSURE ASSAY)	26
3. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	28
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
ANEXOS	33

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Medio LB (Luria-Bertani)	5
Figura 2. Medio complejo (100mM formato)	6
Figura 3. Inoculación con Asa en plato petri	18
Figura 4. Plato petri con agar para obtener colonias simples	18
Figura 5. Congelador a -80°C	18
Figura 6. Caja con gliceroles	18
Figura 7. Plato petri LB agar+ Cm 30 µg/mL y Kan50 µg/mL, donde se salvaron las colonias	21
Figura 8A. Reactores anaeróbicos (Platos cuadrados para medir H ₂)	22
Figura 8B. Incubadora donde cultivaron Anaeróticamente las colonias	22
Figura 9. Cabina de nitrógeno (anaeróbica)	24
Figura 10. Cromatógrafo de gases GC-TCD	24
Figura 11. Espectrofotómetro medir O.D	24
Figura 12. Incubadora 37°C, para cultivo anaeróbico 37°C, 250 rpm	26
Figura13. Enlermeyers especiales sellados	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Sistema abierto para medir H ₂ (LPP)	27
Figura 15. Producción de H ₂ método corto (mutagenesis química)	28
Figura 16. Producción de H ₂ método largo (mutagenesis química)	28
Figura17. Producción de hidrogeno método corto	29
Figura 18. Producción de hidrogeno método largo	29
Figura 19. Producción de hidrogeno por sistema abierto.	30

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN DE E.COLI ACK ACETATO KINASA, ADH ALCOHOL DESHIDROGENADA; FHL FORMATE HYDROGEN LYASE; D-(-).LDH, NAD –DEPENDENT D-(-)-LDH; PFL PIRUVETE FORMATE LYASE; PTA OSFOTRANSACETILASA; P FOSFATO; PEP FOSFOENOTPIRUVATO	33
ANEXO B. ESTADOS DE OXIDACIÓN DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN DE LA ESCHERICHIA COLI	34
ANEXO C. PRODUCCIÓN DE HIDROGENO DE LAS MUTANTES DE MUTAGENESIS QUÍMICA POR EL MÉTODO CORTO.	35
ANEXO D. PRODUCCIÓN DE HIDROGENO DE LAS MUTANTES FUSIONADAS.	36
ANEXO E. VOLUMEN DESPLAZADO DEBIDO A LA PRODUCCIÓN DE HIDROGENO POR LAS DIFERENTES MUTANTES EN SISTEMA ABIERTO LPP (ENSAYO DE BAJA PRESION PARCIAL)	37
ANEXO F. ESQUEMA FERMENTATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDROGENO EN LA ESCHERICHIA COLI. HIDRÓGENO ES PRODUCIDO A TRAVÉS DEL COMPLEJO FHL FORMATE HYDROGEN LYASE (HIDROGENASA 3 Y FORMATO DESHIDROGENADA-H (FDH) LA CUAL ES ACTIVADA POR LA PROTEINA FHLA (QUE ES REGULADA POR FNR) Y REPRESADA POR LA HYCA. EL HIDROGENO ES CONSUMIDO A TRAVÉS DE LA HIDROGENASA 1 Y HIDROGENASA 2. EL FORMATO ES EXPORTADO POR LA FOCA Y /O FOCB Y ES METABOLIZADA POR LA FORMATO DESHIDROGENADA-N, LA CUAL ESTA VINCULADA CON LA NITRATO REDUCTASA A Y FORMATO DESHIDROGENADA-O. CYANOBACTERIAL HYDROGENASA (HOXEFUYH) DERIVADA DE SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803 INHIBE LA ACTIVIDAD DE LA HIDROGENASA 1 E HIDROGENASA 2 E.COLI RESULTANDO UN INCREMENTO EN LA PRUCCION DE HIDROGENO.	38

RESUMEN

TÍTULO: INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR MUTAGÉNESIS QUÍMICA Y RECOMBINACIÓN GENÉTICA DE LA *ESCHERICHIA COLI* *

AUTOR: ANDREA JULIANA GARZÓN SANABRIA**

PALABRAS CLAVES: Producción de hidrógeno vías biológicas, mutagenesis química, recombinación genética, *Escherichia coli*.

DESCRIPCIÓN

Con el objetivo de incrementar la producción de hidrógeno por medios biológicos bajo condiciones anaeróbicas a partir de formato se realizó manipulación genética a través de mutagénesis química y recombinación genética de la bacteria *Escherichia coli* K12-BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG/ pCA24N-FhlA*. Como resultado de la mutagenesis química se encontraron 3 mutantes que incrementaron la producción de hidrógeno. Posteriormente a estas tres mutantes se les realizó recombinación genética por medio de la fusión de sus protoplastos para aumentar el potencial de producción de hidrógeno y se encontraron dos mutantes que incrementaron su producción aproximadamente 3.0 y 8.0 veces más que la cepa original. La producción de hidrógeno se midió a una hora y tres horas de incubación y se encontró mayor producción de hidrógeno después de 1 hora de incubación. Se realizaron tres experimentos diferentes para calcular la producción de hidrógeno, un sistema abierto LPP ensayo de baja presión parcial) y dos sistemas cerrados (método corto y método largo). La determinación de hidrógeno cuantitativa se hizo utilizando cromatografía de gases y una relación matemática donde se tuvo en cuenta la densidad óptica, la cantidad total de proteína, el cultivo y el volumen de muestra analizado.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas , Escuela de Ingeniería Química. Director, Thomas K. Wood

SUMMARY

TÍTULO: INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR MUTAGÉNESIS QUÍMICA Y RECOMBINACIÓN GENÉTICA DE LA *ESCHERICHIA COLI* *

AUTOR: ANDREA JULIANA GARZÓN SANABRIA**

PALABRAS CLAVES: hydrogen production biological methods, chemical mutagenesis, genetic recombination, *Escherichia coli*.

DESCRIPCIÓN

In order to increase hydrogen production by biological methods from formate under anaerobic conditions. Genetic manipulation was done through chemical mutagenesis and genetic recombination of *Escherichia coli* K12-BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG*/ pCA24N-FhIA.

As the result from chemical mutagenesis three mutants which increased hydrogen production rate were found. Then genetic recombination of these mutants was done using protoplast fusion technic in order to increase the potential to produce hydrogen and then two mutants which increased their production approximately 3.0 and 8.0 folds more than original strain were found. Hydrogen production rate were determinates at 1 hour and 3 hours of incubation and was found higher hydrogen production at 1 hour. Three different experiments were done to calculate the hydrogen production rate. One open system (LPP low partial pressure assay) and two closed system (short and long method).

To determinate quantitatively the hydrogen production GC-TCD gas chromatography and a mathematic relationship which included optical density, total amount of protein, the culture and the analyzed volume of sample were used.

* Final Work

** Faculty physical chemistry, Chemical Engineering Director Thomas K. Wood

INTRODUCCIÓN

El hidrógeno es considerado por muchas razones el combustible más seguro y eficiente del futuro. Sin embargo su uso depende ampliamente de los costos de producción, almacenamiento y técnicas de transporte.

El hidrógeno molecular es un combustible 100% renovable que presenta una combustión limpia y eficiente sin generación de productos tóxicos por lo que se convierte en un gas prometedor ya que contiene mayor cantidad de energía que el aceite (142 MJ kg⁻¹ para H₂ y 42MJ kg⁻¹ para aceite).

El uso de métodos biológicos para su producción garantiza significantes reducciones en los costos de energía comparado con los métodos convencionales ya que estos procesos no requieren altas fuentes de calor ni electricidad y dependen básicamente de las hidrogenasas que catalizan la reacción $2H^+ + 2e^- \longleftrightarrow H_2(g)$. El hidrógeno se puede obtener por vías fotosintéticas o procesos fermentativos, considerándose más eficiente estos últimos.

El bioproceso para la producción de hidrógeno a través de biomasa se puede realizar ya que existen bacterias que liberan dicho gas, entre otros productos de fermentación, bajo condiciones anaeróbicas. Si se conocen el genotipo y el metabolismo de las bacterias empleadas se pueden alterar genéticamente con el fin de obtener un proceso más eficiente y enfocado hacia un interés particular.

En estudios realizados previamente se hicieron mutaciones en el genoma de la bacteria *Escherichia coli*, manipulando los genes que favorecían la producción de hidrógeno a partir de formato y eliminando aquellos que consumían o transportaban el mismo hacia el exterior de la célula con el fin de maximizar la

cantidad de hidrógeno como producto de fermentación. Como resultado se obtuvo la mutante BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG/ Pca24N-fhIA* que produce 141 veces más hidrogeno que la tipo silvestre o *E.coli* BW25113.

Tomando como punto de partida para este proyecto la mutante mencionada anteriormente y con el objetivo de incrementar la producción de hidrógeno renovable y limpio se realizó mutagenesis química sobre esta mutante, que se hizo mediante adición de agentes químicos llamados *mutágenos* los cuales incrementan efectos de mutaciones y a la vez pueden afectar cualquier gen al azar, y por lo tanto la estructura del *ADN*, al cambiar el orden de algunos aminoácidos. Como resultado se escogieron tres mutantes después de un procedimiento llamado screening, posteriormente se fusionaron sus protoplastos con el fin de realizar una recombinación genética e incrementar su potencial de producción; se obtuvieron dos mutantes con mayor capacidad para producir hidrógeno, con lo que se cumple con el objetivo principal del proyecto.

La manipulación genética se ha convertido en una herramienta fundamental que puede ser usada para alterar la regulación metabólica y causar sobreproducción de un compuesto deseado, esto nos permite aplicar técnicas ingenieriles utilizándolas en pro de nuestro beneficio, ampliando nuestro panorama y permitiéndonos entrar en el campo de la biotecnología, bioprocesos, ingeniería genética, e ingeniería de proteínas.

Durante el desarrollo de este documento se presentará la información requerida para el total entendimiento del trabajo, partiendo de un marco teórico en donde se dará a conocer la terminología y los conceptos básicos para una mejor comprensión, continuando con la parte experimental en donde se presentarán los protocolos seguidos para llevar a cabo la manipulación genética, los ensayos realizados para la detección de hidrogeno y como se realizó el proceso de screening (selección de las mutantes), continuando con los resultados y análisis de los mismos y finalizando con las conclusiones y recomendaciones para estudios posteriores.

Este trabajo se desarrolló durante una pasantía de investigación en la Universidad de Texas A&M bajo la dirección del Dr Thomas K. Wood. Este trabajo ha sido un reto total para mí, ya que envuelve una serie de conceptos y conocimientos en un área totalmente nueva y muy prometedora que me ha aportado grandes cosas, y despertó en mí un particular gusto hacia la biotecnología haciéndome ver que existen diferentes formas para optimizar un proceso, inclusive formas más atractivas ambientalmente. Con este breve recuento invito a leer este documento que presenta procesos conducentes al incremento de la producción de hidrógeno como combustible por vías biológicas y más limpias.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CONCEPTOS BÁSICOS

Los microorganismos son seres vivos que tienen la capacidad de crecer en una gran variedad de condiciones; temperaturas sobre el punto de ebullición y por debajo del punto de congelación, altas concentraciones de sales, altas presiones (>1000atm) y pH entre 1-10. Algunas células pueden adaptarse y crecer en presencia de oxígeno (aeróbicas); para otras el oxígeno es tóxico (anaeróbicas).

Los dos principales tipos de células son *Procariotas* y *Eucariotas*. La diferencia esencial entre estas dos es que las células *Eucariotas* poseen una membrana alrededor del cromosoma o material genético.

Todas las células contienen macromoléculas como *proteínas*, *RNA* y *DNA*, así como también lípidos y carbohidratos. El *DNA* y *RNA* son polímeros de nucleótidos; en el *DNA* se encuentra toda la información genética de la célula. También recibe el nombre de **genotipo**, mientras que el conjunto de propiedades que se pueden observar en un organismo o las características expresadas por la célula constituyen el **fenotipo**.

La manipulación genética se realiza alterando directamente el genotipo, por lo tanto, es allí donde podemos realizar cambios estructurales que se denominan mutaciones.

1.2 CONDICIONES ADECUADAS PARA EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS

1.2.1 Medios Utilizados para El Crecimiento Bacterial. Todos los seres vivos necesitan un medio adecuado para su crecimiento; así mismo las bacterias necesitan una serie de nutrientes para desarrollarse. Los medios que se presentaran a continuación contienen el alimento necesario para el crecimiento de las células y fueron utilizados durante el desarrollo de la investigación.

- **Medio Luria-Bertani (LB).** *Medio LB* es una solución acuosa compuesta por 10 g de NaCl 10 g de Triptona, y 5 g de levadura por litro de agua destilada. Este medio es el más adecuado cuando se quiere obtener alto índice de crecimiento.

Figura 1. Medio LB (Luria-Bertani)



- **Medio complejo (Complex medium).** Este medio es rico en una variedad de nutrientes que le proporciona a las células ciertas características en el proceso fermentativo, o sirve como cofactor de algunas enzimas para su desarrollo; sin embargo limita un poco su crecimiento. Este fue el medio que se utilizó para realizar los ensayos y las determinaciones de hidrógeno. Esta compuesto por:

Formato 100mM, 5.0g de levadura, 5.0g de triptona, 7.0g K_2HPO_4 , 5.5g KH_2PO_4 , 0.5g *L-Cisteina - HCl · H₂O*, 1.0g $(NH_4)_2SO_4$, 0.25g $MgSO_4 · 7H_2O$, 0.021g $CaCl_2 · 2H_2O$, 0.029g $Co(NO_3)_2 · 6H_2O$, 0.039g $Fe(NH_4)_2SO_4 · 6H_2O$, 2.0mg de ácido nicótico, 0.172mg Na_2SeO_3 , 0.02mg $NiCl_2$ y 10 mL de trace solution compuesta por (0.5g $MnCl_2 · 4H_2O$, 0.1g H_3BO_3 ,

0.01g $AlK(SO_4)_2 \cdot H_2O$, 0.001g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ y 0.5g Na_2EDTA por litro de agua destilada.

Figura 2. Medio complejo (100mM formiato de sodio)



- **Medio sólido.** Está compuesto por dos de los componentes que conforman el LB (triptona y levadura) en las mismas proporciones, pero además se le adiciona un compuesto llamado agar que gelifica el medio a temperatura ambiente. Este medio se utilizó para preparar los platos petri en donde se inocularon las cepas para obtener colonias individuales las cuales fueron el punto de partida de cada uno de los experimentos.

1.2.2 Macronutrientes. Los compuestos de *carbono* constituyen la principal fuente de energía, los más comunes para la fermentación industrial son la glucosa, fructosa y sacarosa.

El Nitrógeno Constituye entre el 10-14% del peso seco de la célula, y los más utilizados son el amonio y las sales de amonio (NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3), proteínas, péptidos y aminoácidos. El nitrógeno es incorporado al interior de la célula en forma de ácidos nucleicos proteínas y coenzimas.

El oxígeno está presente en todos los compuestos orgánicos de la célula, éste constituye alrededor del 20% del peso seco de la misma y es requerido para la respiración aeróbica.

El hidrógeno contiene aproximadamente el 8% del peso seco de la célula y es derivado principalmente de los compuestos de carbono como carbohidratos; algunas bacterias como las metanogénicas utilizan hidrógeno como fuente de energía

El fósforo constituye alrededor del 3 % del peso seco de la célula, está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos, algunas coenzimas y en la pared celular. Las sales inorgánicas más comunes son KH_2PO_4 y K_2HPO_4

Los sulfuros constituyen aproximadamente el 1 % del peso seco de la célula y está presente proteínas y algunas coenzimas

El potasio es un cofactor de algunas enzimas; requerido para el metabolismo de los carbohidratos y el principal catión inorgánico en la célula.

El magnesio es un cofactor de algunas enzimas y está presente en la pared celular y membrana; usualmente se encuentra como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ o $MgCl_2$

1.2.3 Micronutrientes. Los micronutrientes son esenciales para la nutrición microbial, la ausencia de estos retarda el tiempo para activar la replicación de la célula en un cultivo batch y puede causar una baja en la razón de crecimiento específico. Los tres grupos más importantes son:

Fe, Zn y Mn, son un cofactor importante, los dos primeros juegan un papel importante en los procesos de fermentación mientras que el Mn juega un papel importante en la regulación de metabolismo secundario y en la excreción del metabolismo primario.

Cu, Co, Mo, Ca, Na, Cl, Ni y Se. Estos elementos se necesitan bajo específicas condiciones de crecimiento.

B, Al, Si, Cr, V, Sn, Be, F, Ti, Ga, Ge, Br, Zr, W, Li y I. son elementos utilizados muy rara vez y se requieren en concentraciones menores de 10^{-6} mM ya que se vuelven tóxicos a altas concentraciones

1.2.4 Almacenamiento. Las cepas se inocularon en 25 mL de medio de cultivo Luria-Bertani durante la noche y posteriormente se almacenaron en tubos de 1,5 mL con glicerol 50% v/v a -80°C . El glicerol no permite el rompimiento de las células y las conserva productivas durante largos periodos de tiempo.

1.2.5 Esterilización. Este proceso de purificación se realiza para evitar la presencia de microorganismos o agentes contaminantes diferentes a la bacteria que se desea estudiar. Para los medios líquidos (glicerol o de cultivo) en donde crecen las bacterias. Se tienen diferentes ciclos de esterilización de elementos sólidos como enlermeyers, pipetas, frascos para almacenamiento y por supuesto los desechos microbiales. Estos ciclos se aplican a líquidos, sólidos y desechos por aplicación de altas presiones y temperaturas en un autoclave durante 30, 54, 60 minutos respectivamente.

1.3 DEFINICIÓN DE MUTACION Y TIPOS

Una mutación indica un cambio en la secuencia del *ADN*. Éste puede ser hereditario si es permanente y no hereditario si es reparado por el sistema desarrollado por la célula para prevenir este tipo de errores en la replicación del *ADN*.

Las mutaciones ocurren debido a errores en la síntesis de *ADN*, estos se pueden generar de diferentes formas:

- Mutación en un punto que resulta del cambio de una base, por ejemplo, citosina en lugar de timina.
- Mutación por radiación utilizada para acentuar efectos de mutaciones, ésta técnica se utiliza principalmente en laboratorios.

- Error prone PCR (polymerase Chain reaction) induce mutaciones al azar durante la replicación o amplificación del *ADN* por medio de la reacción de la cadena polimerasa.
- Gene-shuffling es una técnica utilizada para generar diferentes librerías por medio de recombinación genética, permitiéndonos observar los cambios producidos y de esta forma seleccionar los más adecuados de acuerdo a los propósitos que se tengan.

1.3.1 Mutagénesis química. La mutagenesis química es una técnica utilizada para inducir mutaciones en el cromosoma; este procedimiento se realiza por medio de la adición de mutágenos químicos los cuales están definidos como aquellos compuestos que incrementan la frecuencia de algunos tipos de mutación; ellos varían en su potencial y habilidad para entrar en la célula, la reactividad con el ADN, su toxicidad y la posibilidad de que el tipo de cambio químico que se generó al entrar a la célula pueda ser corregido por el sistema de reparación desarrollado por la misma. Los mutágenos no alteran sitios específicos, estos pueden afectar cualquier gen aleatoriamente.

La selección de una mutante con ciertas propiedades deseadas no es una tarea fácil, ya que éstas se clasifican en *selectiva* y *no selectiva*. Una mutación selectiva tiene ventajas porque se conoce el medio adecuado para el crecimiento de la misma, mientras que la tipo silvestre (sin mutación) moriría bajo estas condiciones. Una mutación *no selectiva* requiere un estudio célula por célula hasta encontrar la mutante con las características deseadas. Este fue el caso que se manejó en la selección de las mutantes para el desarrollo de esta investigación.

1.3.2 ¿Qué es una mutante? La palabra mutante hace referencia a un organismo que está directamente relacionado con un miembro normal de su especie, pero éste es diferente. Organismos de la misma especie provenientes de la naturaleza o uno proveniente del otro, que tienen diferentes propiedades

usualmente no son llamados mutantes, estos recibe el nombre de cepas ya que no se podría diferenciar entre la mutante y la tipo silvestre (wild type).

1.4 RECOMBINACIÓN GENÉTICA

Es un proceso mediante el cual se unen diferentes genomas dentro de una misma unidad, dando como resultado un nuevo genotipo en ausencia de mutaciones. Los tres principales mecanismos para transferencia de genes son la *transformación*, *transducción* y *conjugación*. La transformación es un proceso mediante el cual el *ADN* es tomado o absorbido por la célula; la transducción es un proceso en el cual es *ADN* es transferido por medio de un bacteriófago y en la conjugación el *ADN* es transferido entre células que están en contacto directo con otras.

El proceso de **transformación** en el que el *ADN* es absorbido por la célula solo se puede dar en células competentes, las cuales presentan alta capacidad para unir el *ADN* a la superficie de la célula. Las células de la *E.coli* no son competentes pero su genética ha permitido desarrollar métodos empíricos por medio de tratamientos como altas concentraciones de iones calcio y manipulación de la temperatura para inducir dicha característica.

La transformación se utiliza solamente cuando la información que entra a la célula debe ser propagada, para lo cual generalmente se usa un vector llamado **plásmido**. Estos elementos forman la base para los procesos industriales más importantes utilizando recombinación genética.

1.4.1 Fusión de protoplastos. Es una técnica para transferir información genética de una célula a otra. Se han fusionado protoplastos exitosamente entre células de diferentes especies y diferentes reinos. A partir de la fusión de los protoplastos se pueden obtener híbridos estables con propiedades deseadas debido a la recombinación entre genomas o plásmidos.

Ésta fue la técnica que se utilizó para obtener la recombinación genética de las mutantes encontradas e incrementar la producción de hidrógeno. El protocolo seguido se presentará posteriormente en el desarrollo experimental.

1.4.2 ¿Que es un protoplasto? Un protoplasto es una célula a la cual su membrana externa ha sido removida, manteniendo solo la membrana citoplasmática, de esta forma se hace más sencillo realizar recombinaciones genéticas.

1.4.3 ¿Que es un plásmido? Los plásmidos son moléculas de *ADN* autónomas que están ubicadas por fuera del cromosoma y que tienen la capacidad de replicarse por ellas mismas. Se encuentran en todos los tipos de bacteria, juegan un papel muy importante en la adaptación y evolución de la misma, así como también se han convertido en una herramienta muy importante en el estudio de la biología molecular.

Los plásmidos codifican genes para proteínas que no son esenciales para el crecimiento de la bacteria, pero que le pueden conferir importantes ventajas bajo algunas condiciones ambientales, por ejemplo, algunos plásmidos codifican proteínas que confieren resistencia a específicos antibióticos, esta particular resistencia a los antibióticos es de mucha ayuda en la selección de células que contienen un plásmido deseado.

1.4.4 Estructura de los plásmidos. La mayoría de los plásmidos son circulares, en los cuales los nucleótidos se encuentran unidos por medio de enlaces covalentes sin terminales libres, sin embargo se conocen algunos con formas lineales, que no son muy comunes, ya que estos presentan problema para la replicación del *ADN* debido a sus terminales.

1.5 PROTEÍNAS

Las proteínas son cadenas formadas por 20 diferentes aminoácidos que se unen por medio de enlaces péptidos. Éstos enlaces están formados por la unión de un grupo amino NH_2 de un aminoácido con un grupo carboxilo $COOH$ de otro. Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos acelerando la velocidad de las reacciones químicas del metabolismo; cumplen funciones específicas para el crecimiento y desarrollo de las mismas.

1.5.1 Proteína FhlA. Esta proteína es un activador del complejo FHL (formate hydrogen lyase), por lo tanto incentiva la producción de hidrógeno a partir de formato, y juega un papel importante en el desarrollo de esta investigación.

1.6 METABOLISMO PRODUCTOR DE ENERGÍA DE LA *E. COLI*

En los seres vivos, la utilización de la energía potencial contenida en los nutrientes se produce por reacciones de oxido-reducción.

Las reacciones de oxido-reducción generalmente incluyen no sólo la transferencia de electrones, sino también de átomos de hidrógeno, las cuales se conocen como reacciones de deshidrogenación

En la bacteria *Escherichia coli* los sistemas de oxido-reducción que transforman la energía química de los nutrientes en una forma biológicamente útil incluyen la fermentación y la respiración.

En la fermentación tanto la molécula dadora como la aceptora de electrones, son compuestos orgánicos, mientras que en la respiración hay un aceptor final exógeno que cuando es el oxígeno hablamos de respiración aerobia y cuando es un compuesto inorgánico hablamos de respiración anaerobia

Existen diferentes tipos de fermentaciones, sin embargo todas llevan a una oxidación parcial de los átomos de carbono del sustrato inicial y liberan por lo tanto sólo una pequeña parte de la energía potencial contenida.

En las bacterias se encuentran tres vías centrales del metabolismo intermediario de los hidratos de carbono entre los cuales se encuentran la vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas, pentosa fosfato o shunt de las pentosas y de Entner-Doudoroff.

La vía glucolítica para la degradación de la glucosa se divide en tres etapas principales. La primera etapa es preparativa con reacciones que no son de oxido-reducción sin liberación de energía y con formación de dos intermediarios de tres átomos de carbono cada uno. En la segunda etapa ocurren reacciones de oxido-reducción, con liberación de energía, formación de ATP por medio del proceso de fosforilación a nivel del sustrato y se forman dos moléculas de piruvato. En la tercera etapa nuevamente ocurren reacciones de oxido-reducción y se generan los productos finales de la fermentación, que varían según la bacteria.

1.6.1 Balance de fermentación. La oxidación de las hexosas tales como glucosa a piruvato por la vía glucolítica Embden-Meyerhof-Parnas, genera dos moléculas de NADH.

La *Escherichia coli* fermenta las hexósas a través del piruvato a etanol, ácido acético, ácido fórmico ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$), ácido láctico y ácido succínico. Estos productos tienen diferentes estados de oxidación, los cuales se muestran en el Anexo B, en donde para ajustar las proporciones de cada compuesto producido, la bacteria puede modular su metabolismo para fermentar una variedad de compuestos tales como hexitols, hexonic y ácidos heuronic.

La degradación de la glucosa genera dos moléculas de piruvato y dos moléculas de NADH como consecuencia de la oxidación de glyceraldehhide-3-phosphate por medio de la glyceraldehyde-3-phosphate deshidrogenasa.

La fermentación de azúcares derivados más oxidados que la glucosa, como por ejemplo el gluconato o glucoronate (Anexo A), tienen la ventaja para la célula que menos NADH es producido. La fermentación de gluconato y glucoronate generan solo una molécula de NADH, sin embargo el metabolismo de glucoronate requiere primero ser reducido vía fructuronate e inmediatamente a mannonate por D-mannonate deshidrogenasa, la cual consume una molécula de NADH. El resultado es la conversión de glucoronate a dos moléculas de piruvato.

1.6.2 Descomposición del piruvato. El ácido pirúvico derivado de la glucosa es un compuesto clave en el metabolismo fermentador de los hidratos de carbono. La descarboxilación del piruvato por medio del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) genera como consecuencia de la reducción del NAD una molécula de NADH, y éste debe reoxidarse nuevamente a NAD para alcanzar el equilibrio final de oxidorreducción.

La síntesis de la enzima PFL (piruvate formate-lyase) es incrementada de 10 – 15 veces anaeróticamente, y esta regulación es mediada por el nivel de transcripción. Los factores de transcripción FNR y ArcA regulan positivamente la transcripción de los 7 promotores que transcriben el gen *pfl*. La acumulación de piruvato en medio anaeróbico incrementa la transcripción del gen *pfl* y la integración de los factores que se requieren para mediar este proceso.

La enzima PFL se activa solo anaeróticamente y la actividad es estrictamente controlada por un sofisticado ciclo de interconversión. PFL debe ser activada por la introducción de un radical libre estable y orgánico dentro de la cadena polipeptídica. Esta reacción es catalizada por una enzima activadora dependiente de hierro que requiere Flavodoxin y S-adenosyl-metionina como sustrato.

El estado redox de la célula tiene que tener una función clave en el control de cual de las dos encimas PDH o PFL se debe activar bajo ciertas condiciones. Existen varias posibilidades para la reoxidación de NADH en la *E.coli*, como se puede apreciar en el anexo A.

Por cada molécula de piruvato tratada con la encima PFL (piruvate formate lyase), se forman una molécula de formato y una molécula de Acetil CoA, en donde el formato es separado de la célula o descompuesto a dióxido de carbono y dihidrogeno por el complejo de FHL (Formate dehydrogenlyse), mientras, el Acetil CoA puede tomar dos diferentes caminos, uno de ellos en donde la energía en el enlace tioester puede ser conservada en la forma de ATP por la acción de la fosfotransacetilasa (PTA) y acetato kinasa (ACK) donde como producto final de esta reacción se tiene acetato, y una segunda alternativa, se da por medio de la reducción de Acetil CoA a etanol a través de dos reacciones de deshidrogenación catalizadas por ADH como se muestra en el anexo A.

En las otras dos posibilidades el piruvato se reduce a ácido láctico o a succinato. La reacción enzimática láctico deshidrogenasa (LDH) resulta en la reoxidación de un NADH actuando como dador de electrones, mientras que el succinato normalmente conforma el 5-10 mol% de los productos de fermentación, el primer paso de esta ruta es la carboxilación de phosphoenolpyruvate con CO₂ como resultado de la reacción FHL, sin embargo la viabilidad de metabolizar el CO₂ limita la cantidad de succinato formada.

Estudios de *ack*, *adh*, *pta*, han demostrado el requerimiento esencial de las reacciones enzimáticas de PTA, ACK, y ADH para permitir el crecimiento de la *E.coli* en ciertos azucares fermentables.

1.6.3 Complejo FHL (formate hydrogen lyase). FHL constituye un complejo multiproteínico compuesto por FDH (Formate dehidrogenasa-H) y la

hidrogenasa 3 las cuales conforman las enzimas claves del complejo FHL. Éste se localiza en la membrana citoplasmática de la célula y cataliza la reacción a partir de formato a dióxido de carbono y dihidrógeno. Estudios muestran el requerimiento de selenio y molibdeno para activar la síntesis de la FDH (formate dehydrogenase) y la producción de hidrógeno en la *E.coli* bajo condiciones anaeróbicas.

La transcripción de los genes del complejo FHL ocurre solo bajo condiciones de crecimiento fermentativo y este es dependiente de la presencia de formato.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En estudios previos se trabajó con la colección isogénica *Escherichia coli* K-12 KEIO hecha en Japón, donde por métodos ingenieriles se construyeron múltiples mutantes con diferentes genes removidos del genoma.

Tomando como punto de partida dicha colección, y teniendo en cuenta que la *E.coli* produce hidrógeno bajo condiciones anaeróbicas a partir de formato por medio de la hidrogenasa 3 y la enzima FDH (formate dehydrogenase-H), las cuales son la clave del sistema FHL (Formate hydrogen lyase), la cual cataliza la reacción $HCOO^- + H_2O \longleftrightarrow H_2 + HCO_3^-$ y conociendo que la proteína *FhIA* codifica un activador del complejo FHL, Fueron manipulados los genes envueltos en la regulación de este complejo (formate hydrogen lyase) y removidos los que producían degradación de hidrogeno vía hidrogenasas 1 y 2 ya que estas consumen formato. Esto se hizo con el objetivo de incrementar la producción de hidrogeno, y como resultado se obtuvo una quintuple mutante (BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG*/pCA24N-FhIA) que produce 141 veces mas hidrógeno que la tipo silvestre o *E.coli* BW25113 (*toshinari maeda 2007*).

2.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

La cepa original BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG*/pCA24N-FhIA y las mutantes obtenidas como producto de la mutagénesis química y posterior fusión de protoplastos fueron inoculadas en platos petri (ver figura 3) con LB agar; los antibióticos Kanamicina (Kan) 50 µg/mL (para garantizar la resistencia a la kanamicina en el cromosoma) y Cloranfenicol (Cm)30 µg/mL (para mantener el plasmido base pCA24N). Las colonias fueron extraídas de los gliceroles a -80°C (ver figuras 5-6). Los platos fueron incubados a 37°C sin movimiento durante la noche bajo condiciones aeróbicas hasta la obtención de colonias

individuales (ver figura 4). Una de estas colonias fue tomada e inoculada con el asa en un enermeyer de 250 mL con 25 mL de medio complejo + Cm30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual fue cultivado en la incubadora con movimiento a 250 rpm y a 37°C durante la noche. De esta forma crecieron todos los cultivos que se estudiaron.

Figura 3. Inoculación con Asa en plato petri



Figura 4. Plato petri con agar para obtener colonias simples



Figura 5. Congelador a -80°C



Figura 6. Caja con gliceroles



2.2 COMO SE HIZO LA MUTAGENESIS QUÍMICA

Nuestro propósito con este estudio fue crear diferentes mutaciones en el cromosoma y seleccionar aquellas mutantes que incrementaran la producción

de hidrógeno. Este objetivo se llevó a cabo adicionando nitrosoguanidine solution; el cual ataca directamente ciertas bases. Éste no requiere síntesis activa de ADN para actuar, pero si la requiere para fijar la mutación. El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente:

Del cultivo obtenido después de la incubación aeróbica a 250 rpm y 37°C se mezclaron 100µL del mismo con 25 mL de LB fresco + Cm 30µg/mL. Este cultivo fue incubado bajo las mismas condiciones hasta obtener una densidad óptica (O.D₆₀₀) entre 0.4-0.6 la cual fue medida por medio de UV-visible espectrofotómetro mini 1240. Se tomó 1 mL del cultivo el cual fue centrifugado durante 5 minutos a 13000 rpm. Posteriormente se realizó el lavado de las células adicionando 1 mL de citrate buffer (0.1M pH 5.5 at 20°C) y centrifugado durante 2 minutos a 13000 rpm. La densidad óptica se ajustó hasta 0.1 adicionando citrate buffer.

Una vez se obtuvo un O.D₆₀₀ 0.1 se adicionó solución de nitrosoguanidina (Nitrosoguanidine solution 1mg/mL a 4°C) hasta una concentración final 50µg/mL la cual se incubó a 37°C y 250rpm. 30 minutos después se tomaron 100 µL de esta solución y se centrifugaron durante 2 minutos a 13000 rpm, se le adicionaron 100 µL de phosphate buffer (0.1M pH 7.0 KH₂PO₄ a 20°C) y se centrifugó durante 2 minutos. Finalmente las células fueron resuspendidas en 100 µL de phosphate buffer.

Para garantizar la obtención de colonias individuales se prepararon 4 diluciones (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) de donde se tomaron 100 µL y se inocularon en platos LB agar + Cm30 µg/mL y Kan 50µg/mL, que se cultivaron a 37°C. Como resultado se obtuvieron alrededor de 6000 colonias simples las cuales fueron sometidas a un proceso de selección llamado screening y se escogieron las 3 que cualitativamente producían más hidrógeno, este proceso de selección se explicará detalladamente mas adelante.

2.3 COMO SE HIZO LA FUSIÓN DE LOS PROTOPLASTOS

Una colonia de cada una de las tres mutantes seleccionadas en la mutagénesis química fue inoculada en 25 mL de LB + Cm 30 µg/mL e incubada durante la noche a 250 rpm y 37°C. 200 µL de éstos cultivos fueron adicionados a 25 mL de LB + Cm 30 µg/mL y crecidos a 37°C y 250 rpm hasta una densidad óptica $O.D_{600nm}$ de 1.0. Posteriormente fueron transferidos a tubos de centrifuga de capacidad 40 mL y centrifugados a 7000 rpm a 4°C durante 5 minutos.

Las células fueron lavadas dos veces con 10 mL de SMM (sucrose-magnesium-maleate 0.5 M sucrose; 20mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 20mM sodium maleate; and Lysozyme at 0.4mg/mL) buffer con pH 6.5 y posteriormente fue ajustada la densidad óptica de cada muestra hasta obtener el mismo valor para cada una de ellas.

Se tomaron 5 mL de cada muestra y se mezclaron con Na-EDTA (0.1 %, pH 8.0 / 10N NaOH) y lysozyme (0.4 mg/mL concentración final), los cuales fueron incubados a 37°C y 250 rpm durante 30 minutos. Los protoplastos fueron recuperados por centrifugación a 4°C y 7000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente fueron adicionados 15 mL de fusión buffer (30 % PEG 8000, 10 mM $CaCl_2 \cdot 4H_2O$ and 15% DMSO) e incubados a 37°C y 250 rpm, 30 minutos después, se adicionaron 150 mL de medio LB fresco sin antibióticos, se mezclaron y 1 mL de este cultivo fue centrifugado a 13000 rpm durante 2 minutos y posteriormente lavado dos veces con 1 mL de medio LB.

Con el objetivo de obtener colonias simples se prepararon tres diluciones ($10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$) de las cuales se tomaron 100µl de cada una y se inocularon en platos LB agar+ Cm 30 µg/mL y Kam 50µg/mL. Estos se incubaron a 37°C y como resultado se obtuvieron aproximadamente 6000 colonias simples que

fueron analizadas una por una por un proceso llamado screening y seleccionadas aquellas que produjeran mas hidrogeno.

2.4 SCREENING

Una vez se obtuvieron colonias individuales, estas fueron picadas y salvadas en platos petri LB agar + Cm 30 µg/mL y Kan 50µg/mL, en posiciones respectivas como se muestra en la figura 7, de tal forma que se pudiera identificar cada colonia después de todo el proceso. Estos platos fueron incubados a 37°C durante la noche y posteriormente transferidas a un plato (cuadrado) con medio complejo + agar en las mismas posiciones, pero ahora incluyendo el control que fue la mejor de las 3 colonias seleccionadas en la mutagenesis química (BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG*/pCA24N-FhIA-6/18).

Estos platos fueron colocados en reactores bajo condiciones anaeróbicas por medio de paquetes de gas (gas packs catalyst anaerobic system BR0038B) e incubados a 37°C como se puede ver en las figuras 8A - 8B.

Después de 6 horas de incubación se tomaron los platos evitando el contacto con el aire y se colocó un papel de filtro (whatman) cubriendo las colonias y sobre éste una membrana (chermochromic membran GVD corp, cambridge, MA) con la cual se detectó la producción de hidrogeno de cada una de las colonias de una forma cualitativa.

Figura 7. Plato petri LB agar+ Cm 30 µg/mL y Kan50 µg/mL, donde se salvaron las colonias

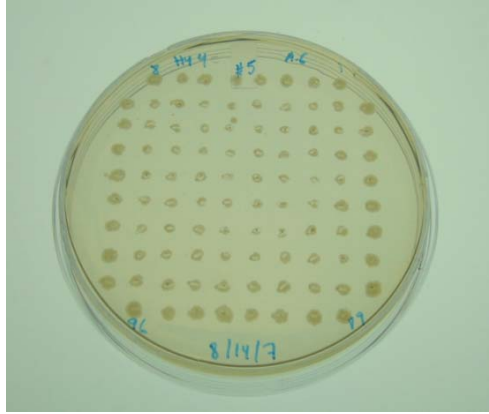
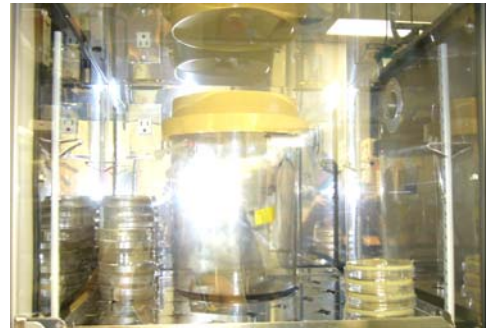
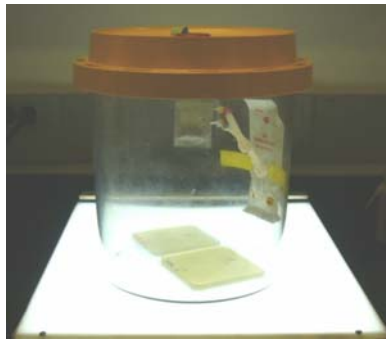


Figura 8A. Reactores anaeróbicos (Platos cuadrados para medir H₂)

Figura 8B. Incubadora donde cultivaron Anaeróticamente las colonias



La selección de las posibles colonias que generaban mayor producción de hidrógeno se hizo comparando cada colonia con el control y observando la diferencia entre las intensidades del color azul, el cual es el indicador de la presencia de hidrógeno.

Las colonias que aparecieron más rápido y tiñeron azul más fuerte, fueron las seleccionadas para ser nuevamente screeneadas, verificando que su comportamiento fuera consistente. A cada colonia seleccionada se le realizó el proceso de screening 3 veces en donde se fueron descartando algunas que no

presentaban el mismo fenotipo todas las veces, teniendo en cuenta en las demás que el color azul siempre estuviera más fuerte que el emitido por el control. Una vez se obtuvo consistencia en los 3 screening se procedió a medir hidrógeno de una forma cuantitativa que se presentará a continuación.

2.5 PRUEBAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

2.5.1 Método corto seguido después de la mutagenesis química. Una colonia individual fue inoculada en 25 mL de LB + Cm 30 µg/mL y cultivada a 37°C y 250 rpm durante la noche. Posteriormente los cultivos fueron purgados con nitrógeno durante 5 minutos, así como también medio complejo para mezclarlo con los cultivos dentro de la cabina anaeróbica. Viales de vidrio fueron sellados con tapas de teflón y purgados con nitrógeno durante 2 minutos como se muestra en la figura 9.



Dentro de la cabina de nitrógeno (ver figura 10), se mezclaron 1 mL de cada cultivo con 9 mL de medio complejo + Cm 30µg/mL fresco, los cuales fueron inyectados por medio de jeringas por la parte superior de los viales. Una vez se tuvieron los viales bien sellados, se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 1 hora.

50µL del gas que ocupaba la parte superior del vial fue analizada por medio del cromatógrafo de gases GC-TCD (ver figura 11) después de 1 hora de incubación. Para calcular la proteína total, se midió la densidad óptica a 600nm al finalizar cada experimento por medio del UV espectrofotómetro (ver figura 12).

Para calcular la producción de hidrógeno se utilizó la siguiente relación matemática donde el área de pico es la detectada por el cromatógrafo de gases.

La proteína total se calculo de: 0.22mg/OD/mL.

La cantidad total de hidrogeno = área de pico * 0.181*10⁻³(μmol/área de pico)*espacio de cabeza (17000μL)/ 50(μL volumen de inyección).

$$H_2 \text{ prod.} = \text{areapico} \times \frac{0.181 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}}{\text{areapico}} \times \frac{17000 \mu\text{L (espacio cabeza)}}{50 \mu\text{L (inyeccion)}} \times \frac{1}{10 \text{mL (cultivo)} \times \text{OD}} \times \frac{1}{0.22 \text{mg proteind OD/ mL}}$$

Figura 10. Cabina de nitrógeno (anaeróbica)



Figura 11. Cromatógrafo de gases GC-TCD



Figura 12. Espectrofotómetro medir O.D



2.6 MÉTODO CORTO SEGUIDO DESPUÉS DE LA FUSIÓN DE LOS PROTOPLASTOS

Una colonia individual fue inoculada en 25 mL de medio complejo + Cm 30 µg/mL y cultivada a 37°C y 250 rpm durante la noche. Posteriormente los cultivos fueron purgados con nitrógeno durante 5 minutos, así como también medio complejo para mezclarlo con los cultivos dentro de la cabina anaeróbica. Viales de vidrio fueron sellados con tapas de teflón y purgados con nitrógeno durante 2 minutos.

Dentro de la cabina de nitrógeno se mezclaron 5 mL de cada cultivo con 5 mL de medio complejo + cloranfenicol 30µg/mL fresco, los cuales fueron inyectados por medio de jeringas por la parte superior de los viales. Una vez se tuvieron los viales bien sellados, se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 1 hora.

50µL del gas que ocupaba la parte superior del vial fue analizada por medio del cromatógrafo de gases GC-TCD después de 1 hora de incubación. La cantidad total de proteína se determinó por medio de la densidad óptica a 600nm al finalizar cada experimento.

2.7 DETERMINACIÓN DE H₂ MÉTODO LARGO

En un enlarmeyer de 250 mL con 25 mL de medio complejo y Cm (30µg/mL) fue cultivada cada colonia a 37°C y 250 rpm durante la noche (ver figura 12). Estos cultivos fueron mezclados con 75 mL de medio complejo fresco + Cm (30µg/mL) y posteriormente sellados y purgados con nitrógeno durante 10 minutos e incubados anaerobicamente a 37°C, 250 rpm como se muestra en la figura 13.

Figura 12. Incubadora 37°C, para cultivo anaeróbico 37°C, 250 rpm



Figura13. Enlermeyers especiales sellados



Seis horas después fueron vertidos dentro de la cabina de nitrógeno los 100 mL de cultivo en frascos de 250mL y centrifugados durante 5 minutos a 4 °C y 7000 rpm. Dentro de la cabina de nitrógeno se descartó el sobrenadante y se adicionaron 20 mL de medio complejo sin formato, los cuales fueron resuspendidos. Viales de vidrio de 25 mL fueron sellados con tapas de teflón, purgados durante dos minutos y finalmente se mezclaron 9 mL del cultivo y 1 ml de formato 1M, los cuales fueron inyectados por medio de jeringas por la parte superior de los viales e incubados a 37°C y 250 rpm durante 1 hora.

Una muestra de 50µL del gas fue analizada por medio del cromatógrafo de gases GC-TCD. La cantidad total de proteína se determinó al medir la densidad óptica al finalizar cada experimento.

2.8 SISTEMA ABIERTO (LOW PARTIAL PRESSURE ASSAY)

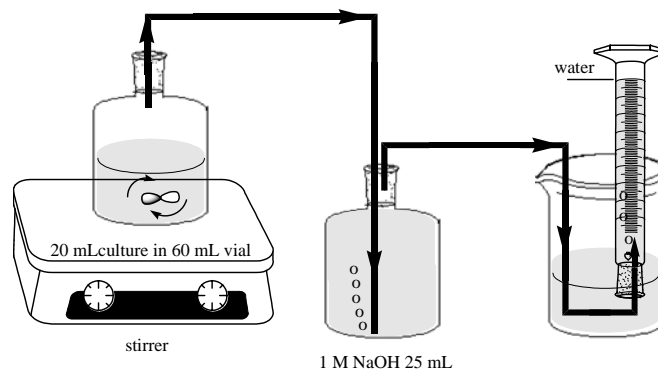
Colonias individuales fueron inoculadas en 25 mL de medio complejo + Cm 30µg/mL e incubados a 37°C y 250 rpm aeróbicamente durante la noche. Estos cultivos se mezclaron con 75 mL de medio complejo fresco + Cm 30µg/mL, los

cuales posteriormente fueron sellados y purgados durante 10 minutos, e incubados anaerómicamente por 6 horas de la misma forma como se procedió en el método largo. El cultivo de 100 mL fue transferido a frascos de centrifuga de capacidad 250mL dentro de la cabina de nitrógeno y posteriormente centrifugados durante 5 min a 4°C y 7000 rpm. Las muestras fueron regresadas a la cabina de nitrógeno y resuspendidas en los frascos de centrifuga con 30mL de medio complejo sin formato.

Se utilizaron viales de vidrio esterilizados de capacidad 60mL a los cuales se adicionó un agitador magnético. Estos se sellaron con tapas de teflón y se instalaron a un vial de 25 mL de NaOH (1M) que posteriormente se purgaron con nitrógeno durante 1 minuto.

18 mL del cultivo fueron inyectados con 2 mL de formato 1M al vial de 60mL los cuales fueron cultivados durante 16 horas con agitación a 37°C como se muestra en la figura 14.

Figura 14. Sistema abierto para medir H₂ (LPP)



Finalmente después de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 16 horas, se analizaron 50 µL del gas los cuales fueron inyectados al cromatógrafo de gases GC-TCD y para calcular la proteína total de cada capa se midió la densidad óptica al finalizar el experimento.

3. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Nitrosoguanidine solution es un mutágeno químico muy comúnmente usado ya que es una herramienta poderosa en la mayoría de los sistemas biológicos. El compuesto nitroso metila principalmente el O-6 de la guanina y también pero en menor proporción el N-7 de la adenina entre otros que son menos reactivos como N-3 guanina, N-1 adenina y N-3 citosina. Estos compuestos se diferencian parcialmente en su habilidad para inducir error.

Nitrodo Guanidine solution se utilizó con el objetivo de inducir mutaciones al azar en el cromosoma. Se obtuvieron aproximadamente 6000 colonias de las cuales fue posible screenear alrededor de 3000 de ellas. 3 interesantes mutantes BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG/pCA24N-FhIA-6/18*; 1/90 y B6, fueron encontradas después de realizar la prueba para determinar la producción de hidrógeno por el método corto en dos diferentes tiempos de medición (1y 3 horas). Como resultado se encontraron diferencias significantes entre las nuevas cepas mutantes y la tipo silvestre (cepa original) y se aumentó la producción de hidrógeno 4.7; 2.7 y 3.6 respectivamente, mientras que al realizar el método largo se observó un poco menos de diferencia entre las mismas, siendo esta (2.3; 1.4; y 0.9 veces mayor que la cepa original) como se puede ver en las figuras 15 y 16 respectivamente. La tabla de resultados se muestra en el anexo C.

Figura 15. Producción de H₂ método corto (mutagenesis química)

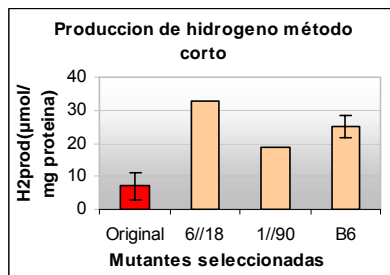
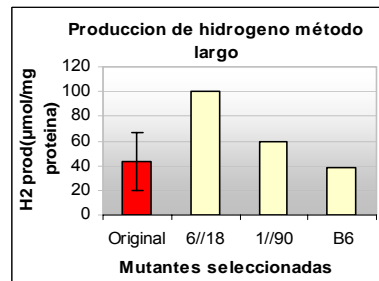


Figura 16. Producción de H₂ método largo (mutagenesis química)



Los protoplastos fueron preparados por tratamiento con lysozyme, ya que la pared celular esta constituida esencialmente por una capa de peptidoglicano, fácil de remover con estos compuestos, teniendo en cuenta también que la SMM buffer y el pH tienen una influencia positiva en la fusión de los mismos, la fusión buffer fue mezclada con los protoplastos antes del tratamiento con PEG (polyethyleneglycol) ya que este induce la absorción de los protoplastos y posteriormente la regeneración de la pared celular.

Una vez realizado este procedimiento, se obtuvieron alrededor de 6000 colonias de las cuales se screenearon aproximadamente 3000 colonias individuales, en las que se encontraron exitosamente 2 mutantes BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG*/pCA24N-FhIA-15/68 y 8/49, que como producto de la recombinación genética aumentaron su capacidad para producir hidrógeno con respecto a la original 3.24 y 7.91 veces con el método corto (ver figura 17); 3.25 y 3.0 veces con el sistema abierto LPP(ver figura 19) y 40 y 46% con el método largo (ver figura 18); respectivamente. Este ultimo con respecto a la mejor de las mutantes obtenidas en la mutagenesis química (6/18) no a la original como se muestra en la tabla de datos que se encuentra en el anexo D.

Figura17. Producción de hidrogeno método corto

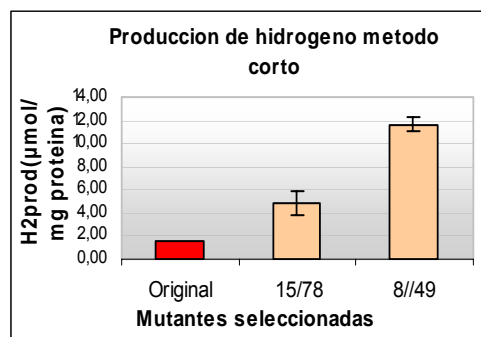
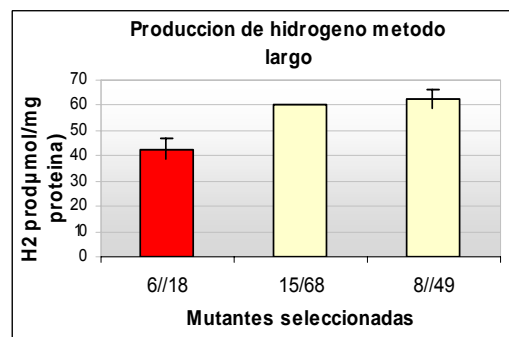


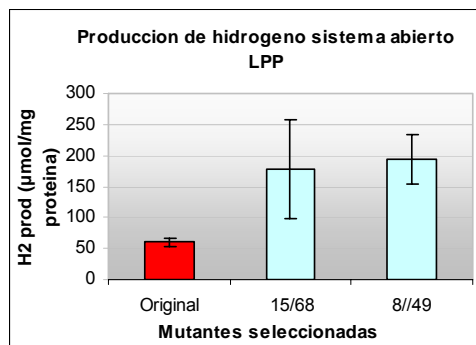
Figura 18. Producción de hidrogeno método largo



Para los dos casos el método largo mostró resultados menos significativos y de la misma magnitud, esto puede deberse a el extenso procedimiento (≈ 10 h), los repentinos cambios de temperatura, también al equilibrio de la reacción ya que como es un sistema cerrado y se esta produciendo H_2 y CO_2 simultáneamente se puede alcanzar rápidamente y limitar la producción de H_2 .

Con el sistema abierto LPP (ensayo con baja presión parcial) se puede observar en el anexo D que la conversión de la reacción para la producción de hidrógeno es alta (≈ 1), lo cual indica que casi todo el formato que se produce y el que se le adiciona en el medio es convertido exitosamente en hidrógeno molecular y dióxido de carbono. La determinación de la conversión de la reacción se hizo a las 16 horas previendo que todo el formato se hubiera convertido.

Figura 19. Producción de hidrogeno por sistema abierto.



CONCLUSIONES

Los sistemas biológicos son una ventaja para la producción de hidrógeno ya que son flexibles y se pueden adaptar a diferentes condiciones ambientales. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo muestran como por medio de manipulación genética y regulación de los procesos que ocurren dentro de la célula se puede incrementar la producción de algunas sustancias deseadas.

Por medio de la mutagenesis química realizada en la cepa *E.coli* BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG/pCA24N-FhIA* se encontraron mutantes con mayor capacidad para producir hidrógeno, las cuales por medio de recombinación genética (fusión de protoplastos) fue posible incrementar este potencial encontrando una mutante que aumentó su capacidad de producción aproximadamente hasta 8 veces sobre la cepa original.

La producción de hidrógeno varía con el tiempo ya que, dependiendo de la especie de la bacteria y los nutrientes empleados, se obtiene generación de pequeñas o abundantes cantidades de ácidos orgánicos, como ácido maléico, lactato, butirato, propionato, y acetato entre otros, para los cuales la conversión a H₂ no es una reacción energéticamente favorable y no es soportada por el metabolismo fermentativo de la bacteria anaeróbica, por lo tanto la acumulación de pequeñas cantidades de ácidos orgánicos en el medio inhibe el crecimiento y limita la conversión para la producción de H₂. Se concluye que el tiempo de mayor producción de hidrógeno por parte de la bacteria es corto en comparación con la vida de la misma.

El medio de crecimiento utilizado para los análisis debe prepararse siempre bajo las mismas condiciones ya que como se dijo anteriormente las bacterias son muy sensibles a los cambios, por lo tanto esto podría alterar significativamente los resultados.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que los procedimientos realizados para mutagenizar alteran genes al azar se sugiere realizar un microarreglo en el *ADN* el cual nos permite conocer la nueva estructura del mismo y por lo tanto encontrar la razón por la cual ocurre el incremento en la producción de hidrógeno. Esto es importante ya que conociendo específicamente los sitios afectados se puede estudiar la reproducibilidad en otros microorganismos, estudiar del efecto ocasionado y si es este el motivo del mejoramiento en la producción de hidrógeno.

**ANEXO B. ESTADOS DE OXIDACIÓN DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS
DE FERMENTACIÓN DE LA ESCHERICHIA COLI**

TABLE 1 Oxidation states of various substrates and products of *E. coli* fermentation

Compound	Formula	Oxidation state ^a	Reducing equivalents ^b [H] produced or consumed
Substrates			
Glucitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	-1.0	6 [H] produced
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.0	4 [H] produced
Gluconic acid	C ₆ H ₁₂ O ₇	+1.0	2 [H] produced
Glucuronic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	+2.0	0 [H] produced
Products			
Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	0.0	0 [H] consumed
Ethanol	C ₂ H ₆ O	-2.0	8 [H] consumed
Formic acid	CH ₂ O ₂	+1.0	4 [H] consumed
Lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	0.0	4 [H] consumed
Succinic acid ^c	C ₄ H ₆ O ₄	+1.0	8 [H] consumed

^aIn the calculation of the oxidation state of a compound, hydrogen is arbitrarily given the value of -0.5 and oxygen is given a value of +1.0.

^bReducing equivalents consumed is calculated on the basis that a C₆ yields C₃ + C₃.

^cIn this calculation, it is assumed that succinate is formed subsequent to the carboxylation of phosphoenolpyruvate to form oxaloacetate (Fig. 1).

ANEXO C. PRODUCCIÓN DE HIDROGENO DE LAS MUTANTES DE MUTAGENESIS QUÍMICA POR EL MÉTODO CORTO.

Cepas	Producción de hidrogeno ¹ μmol/mg proteína Método corto				Producción de hidrogeno ¹ μmol/mg proteína método largo		
	1h	relativo	3h	relativo	1h	promedio	Relativo a la original
BW25113 <i>hyaB hybC hycA fdoG</i> /pCA24N-FhIA-wild type	7 ± 4.2	-	88 ± 29.6	-	32.97 65.68	43.33±23.13	-
BW25113 <i>hyaB hybC hycA fdoG</i> /pCA24N-FhIA-6/18	33.0	4.7	97.3 ± 31.0	1.1	100.5	100.5	2.32
BW25113 <i>hyaB hybC hycA fdoG</i> /pCA24N-FhIA-1/90	18.9	2.7	105.7 ± 19.9	1.2	58.97	58.97	1.4
W25113 <i>hyaB hybC hycA fdoG</i> /pCA24N-FhIA-B6	25.2 ± 3.4	3.6	82.9 ± 31.2	0.9	38.9	38.9	0.9

¹1 h en medio complejo (con formato 100mM).

ANEXO D. PRODUCCIÓN DE HIDROGENO DE LAS MUTANTES FUSIONADAS.

Cepas	Producción de hidrogeno Inicial ($\mu\text{mol}/\text{mg}\text{-proteína}/\text{h}$) ² LPP		Conversión de Hidrogen ³ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína LPP		Producción de Hidrogeno ⁴ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína (método corto)			Producción de hidrogeno ⁴ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína (Método largo)	
	30 min.	Relativo a la original	30 min.	Relativo a la original	1h	Relativo a la 6/18	Relativo a la original	1h	% incremento 6/18
BW25113 <i>hyaB hybC hycA</i> <i>fdoG/pCA24N-FhIA-wild type</i>	59.8± 7.23	-	0.91±0.08	-	1.47	-	-	-	-
BW25113 <i>hyaB hybC hycA</i> <i>fdoG/pCA24N-FhIA-6/18</i>	73.4± 4.76	1.22	0.87±0.04	0.9	4.54 ±1.58	-	3.10	42.8 ± 4.44	-
BW25113 <i>hyaB hybC hycA</i> <i>fdoG/pCA24N-FhIA-15/68</i>	194.3± 39.5	3.25	1.08 ± 0.16	1.2	4.77 ±1.05	1.1	3.24	59.96	40%
BW25113 <i>hyaB hybC hycA</i> <i>fdoG/pCA24N-FhIA-8/49</i>	178.6 ± 79.7	3.0	0.984 ±0.17	1.1	11.63±0.63	2.56	7.91	62.47 ± 3.62	46%

² La producción de hidrogeno Inicial fue determinada a los 30minutos (LPP low partial pressure).

³ 16 horas de incubación.

⁴ 1 h en medio complejo (con formato 100mM).

**ANEXO E. VOLUMEN DESPLAZADO DEBIDO A LA PRODUCCIÓN DE
HIDRÓGENO DE LAS DIFERENTES MUTANTES EN SISTEMA ABIERTO
LPP (ENSAYO DE BAJA PRESIÓN PARCIAL)**

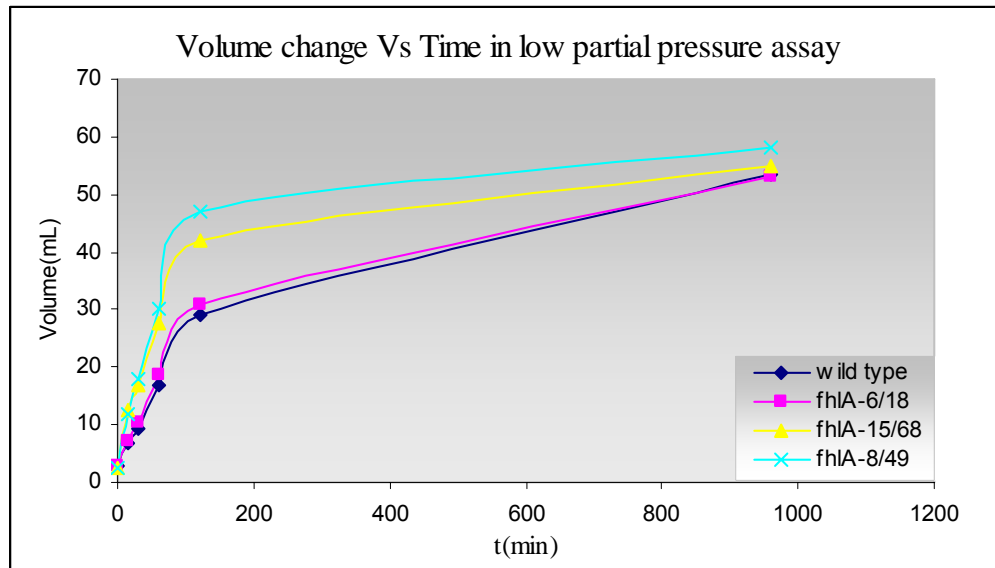


Tabla 3. Cambio del volumen del gas en el tiempo

Cepas <i>ΔhyaBΔhybCΔhycAΔfdoG/pCA24N-fhIA-</i>	Gas volume (mL)					
	0 min	15 min	30 min	1 h	2h	16 h
6/18	3.0	7.0	9.5	18.0	32.0	53.0
	3.0	7.5	11.0	18.5	30.0	51.5
8/49	1.0	12.0	18.0	31.0	47.0	59.0
	4.0	12.0	17.5	29.0	46.0	56.0
Wild type	3.0	7.0	9.0	15.0	26.0	56.0
	3.0	7.0	10.0	19.0	32.0	51.0
15/68	2.0	16.0	20.0	30.0	44.0	57.0
	3.0	9.0	13.5	25.0	40.0	53.0

Tabla 4. Área de pico, Volumen actual del espacio de cabeza y proteína total de la *E.coli* BW25113 Δ hyaB Δ hybC Δ hycA Δ fdoG/pCA24N-fhIA.-

Cepas <i>ΔhyaBΔhybCΔhycAΔfdoG/pCA24N-fhIA-</i>	Pico de hidrógeno					O.D (600nm)	Volumen actual del espacio de cabeza (mL)					Proteína total (mg)
	15min	30min	1h	2h	16h		15min	30min	1h	2h	16h	
6/18	415.06	841.4	1872.9	3369.5	5661.1	1.60	41.9	44.4	52.9	66.9	87.9	7.05
	370.00	788.0	1826.0	3408.2	5343.9	1.70	42.4	45.9	53.4	64.9	86.4	7.48
8/49	1309.6	2169.9	3742.6	5068.9	7046.99	1.70	46.9	52.9	65.9	81.9	93.9	7.48
	1008.2	1841.9	3216.9	4982.8	5811.8	1.91	46.9	52.4	63.9	80.9	90.9	8.40
Wild type	317.00	643.00	1433.1	2812.9	5937.0	1.70	41.9	43.9	49.9	60.9	90.9	7.48
	258.00	728.80	2081.7	3681.9	5487.0	1.66	41.9	44.9	53.9	66.9	85.9	7.30
15/68	1568.0	2209.8	3388.9	4673.7	6663.0	1.70	50.9	54.9	64.9	78.9	91.9	7.48
	706.00	1404.0	2877.6	4506.7	5392.6	1.83	43.9	48.4	59.9	74.9	87.9	8.05

- La proteína total de las cepas *E. coli* fueron calculadas 0.22 mg/OD. El actual espacio de cabeza (mL) = el espacio de cabeza del cultivo en el vial (40 mL) + el volumen de gas de la muestra de cultivo (mL) – volumen de gas de células muertas del cultivo de BW25113 *hyaBhybChycA fdoG/pCA24N-FhIA* (5.1 mL durante 30 min medio complejo)
- La proteína total fue calculada con OD600 al finalizar el experimento en medio complejo

Tabla 5. Cantidad de hidrógeno y Producción de hidrógeno de diferentes cepas

Cepas <i>ΔhyaBΔhybCΔhycAΔfdoG/pCA24N-fhIA-</i>	Cantidad de Hidrógeno (μmol)					Producción de hidrógeno (μmol/mg-proteína)				
	15min	30min	1h	2h	16h	15min	30min	1h	2h	16h
6/18	63.0	135.2	358.7	816.0	1801.4	8.9	19.2	50.9	115.8	255.6
	56.80	130.9	352.9	800.7	1671.4	7.60	17.5	47.2	107.0	223.4
8/49	222.3	415.5	892.8	1502.8	2395.4	29.7	55.6	119.4	200.9	320.2
	171.2	349.4	744.2	1459.3	1912.4	20.4	41.6	88.5	173.6	227.6
Wild type	48.08	102.2	258.9	620.1	1953.6	6.43	13.66	34.61	82.91	261.2
	39.10	118.5	406.2	891.70	1706.2	5.40	16.2	55.6	122.1	233.6
15/68	288.9	439.2	796.2	1334.9	2216.6	38.63	58.7	106.4	178.5	296.3
	112.2	246.0	624.0	1221.9	1715.9	13.9	30.6	77.5	151.8	213.1

- Hidrógeno total en la cabeza de la muestra = área del pico * 0.181 (nmol/área del pico) * actual espacio de cabeza (μL; volumen del espacio de cabeza) / 50 (μL; volumen de inyección)
- Hidrógeno (μmol/mg-protein) = cantidad total de hidrógeno en el espacio de cabeza / cantidad total de proteína

Tabla 5. Cantidad total de hidrógeno y conversión de la reacción para la producción de hidrógeno de diferentes cepas

Cepas <i>ΔhyaBΔhybCΔhycAΔfdoG/pCA24N-fhlA-</i>	Cantidad total de hidrógeno (μmol)¹	promedio	Conversión de la reacción para producción de Hidrógeno (mol-H₂/mol-formate)²	promedio	Relativo a la wild type
6/18	1801.4 1671.4	1736.4±91.9	0.901 0.84	0.87±0.043	-
8/49	2395.4 1912.4	2153.9±341.5	1.198 0.96	1.08±0.168	1.2
Wild type	1953.6 1706.2	1829.9±174.9	0.977 0.85	0.91±0.089	-
15/68	2216.6 1715.9	1966.25±354.0	1.108 0.86	0.984±0.175	1.1

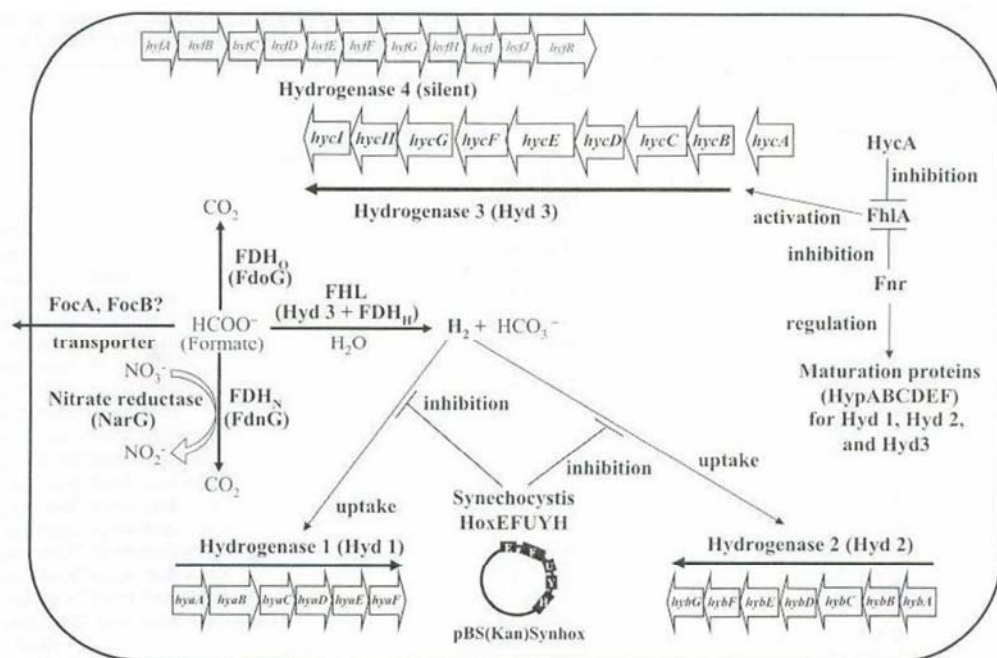
- ¹16 h en medio complejo (consumido en larga incubación 16 h)
- ²La conversión de hidrógeno fue calculada dividiendo la conversión total de hidrógeno en (mmol) por la cantidad total de formato (2 mmol)

Tabla 6. Inicial producción de hidrógeno (30 minutos) en medio de diferentes cepas

Strain <i>ΔhyaBΔhybCΔhycAΔfdoG/pCA24N-fhLA-</i>	Initial hydrogen production (μmol/mg-protein/h)¹	Average	Times higher than Wild type	Times higher than 6/18
6/18	76.76 70.02	73.4 ± 4.76	1.22	----
8/49	222.2 166.3	194.3 ± 39.5	3.25	2.65
Wild type	54.64 64.87	59.8 ± 7.23	----	0.81
15/68	234.9 122.2	178.6 ± 79.7	3.0	2.43

➤ ¹La producción de hidrógeno fue determinada a los 30 minutos.

ANEXO F. ESQUEMA FERMENTATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE HIDROGENO EN LA ESCHERICHIA COLI. HIDRÓGENO ES PRODUCIDO A TRAVÉS DEL COMPLEJO FHL FORMATE HYDROGEN LYASE (HIDROGENASA 3 Y FORMATO DESHIDROGENADA-H (FDH), LA CUAL ES ACTIVADA POR LA PROTEINA FHLA (QUE ES REGULADA POR FNR) Y REPRESADA POR LA HYCA. EL HIDROGENO ES CONSUMIDO A TRAVÉS DE LA HIDROGENASA 1 Y HIDROGENASA 2. EL FORMATO ES EXPORTADO POR LA FOCA Y /O FOCB Y ES METABOLIZADA POR LA FORMATO DESHIDROGENADA-N, LA CUAL ESTA VINCULADA CON LA NITRATO REDUCTASA A Y FORMATO DESHIDROGENADA-O. CYANOBACTERIAL HYDROGENASA (HOXEFUYH) DERIVADA DE SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803 INHIBE LA ACTIVIDAD DE LA HIDROGENASA 1 E HIDROGENASA 2 E.COLI RESULTANDO UN INCREMENTO EN LA PRUCCION DE HIDROGENO.



REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Bisaillon. A., Turcot. J., and Hallenbeck. C. P. 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli* **31**: 1504-1508.

Chang, S., and S. N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. Mol Gen Genet **168**:111-115.

Gotz, F., S. Ahrne, and M. Lindberg. 1981. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in *staphylococci*. J Bacteriol **145**:74-81.

Hopper. S., Babst. M., Schelnsong. V., Martin. H., Hennecke. H and Bock. A. 1994. The Journal of Biological Chemistry **269**: No 30 19597-19604

Lawley, P. D., and S. A. Shah. 1972. Methylation of ribonucleic acid by the carcinogens dimethyl sulphate, N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Comparisons of chemical analyses at the nucleoside and base levels. Biochem J **128**:117-132.

Maeda, T. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production

Maeda .T., Sanchez. T. V., Word. T. K., 2007 Biotechnologically relevant enzymes and proteins. *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and síntesis activities.

Melis. A., Melnicki. R. M., 2006 Integrated biological hidrogen production. *Internacional journal of Hydrogen Energy* **31**:1563-1573

Mnatsakanyan. N., Vassikian. A., Navasardyan. L., Bagramyan. K. and Trchounian. A. 2002. Regulation of *Escherichia coli* Formate Hydrogenlyase Activity by Formate at Alkaline pH. **45**: 281-286.

Nagy. L. E., Meuser. J. E., Plimmer. S., Seibert. M. L., King. P. W., Ahmann. D., and Posewitz M. C. 2006 Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel (FeFe)-hydrogenase libraries **29**:421-430

Nandi. R., bhattacharyya. K. P., Bhaduri. N. A., and sengupta. S. 1992. Synthesis and lysis of formate by immobilized cells of *Escherichia coli* Biotechnology and Bioengineering **39**: 755-780

Penfold. W. D., Sargent. F., and Macaskie. E. L. 2006. inactivation of the *Escherichia coli* K-12 twin-arginine translocation system promotes increased hydrogen production FEMS Microbiol lett **262**: 135-137

Penfold. W. D., Forster. F. C., Macaskie. E. L. 2003. Increased hydrogen production by *Escherichia coli* strain HD701 in comparison wild-type parent strain MC4100. Enzyme and microbiol technology **33**: 185-189.

Petri. R. and Schmidt. C. D., 2004 Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. Elsevier **15**:298-304

Rachman, M., Y. Furutani, Y. Nakashimada, T. Kakizono, and N. Nishio. 1997. Enhance hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *enterobacter aerogenes*. Journal of fementation and bioengineering **83**:358-363.

Redwood. D. M., and Macaskie. E. L. 2006 International Journal of Hydrogen Energy **31**: 1514-1521

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schlesong, V., Lutz, S., and Bock, A. 1994. Purification and DNA-binding properties of FHLA, the transcriptional Activator of the Formate Hydrogenlyase system from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological chemistry* **269**: 19590-19596

Schaeffer, P., B. Cami, and R. D. Hotchkiss. 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**:2151-2155.

Shuler, M. L and Kargi, F. Bioprocess Engineering Basic concepts. 2002. printce Hall PTR. 1-10: 49-53: 219-236:

Vignais, M. P., Magnin, P. J., Willison, C. J. 2006 Increasing biohydrogen production by metabolic engineering *Internacional journal of Hydrogen Energy* **31**:1478-1483

Vignais, M., P. J. P. Magnin and J. C. Willison. 2006. Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. *J. Hydrogen Energy*. 1478-1483

Wyrick, P. B., and H. J. Rogers. 1973. Isolation and characterization of cell wall-defective variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* **116**:456-465.

Yoshida, A., Nishiamura, T., Kawaguechi, H., INRI, M and Yukawa, H. 2006. Enhance hydrogen production from glucosa using IDH- and frd-inactivated *Escherichia coli* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 67-72

Yoshida. A., Nishiamura. T., Kawaguechi. H., Inui. M and Yukawa. H. 2005. Enhance Hydrogen Production from Formic Acid by Formate Hydrogen Lyase-Overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 6762-6768

Zinder, L., and Champerness, W. 2003. *Molecular Genetic of bacteria* 1-75; 113-121; 157-160.