



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

INGENIERÍA METABÓLICA EN *Escherichia coli* PARA LA
CONVERSIÓN EFICIENTE DE XILOSA A D-LACTATO

T E S I S

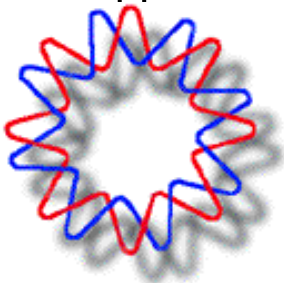
PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBQ. José Utrilla Carreri

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ



CUERNAVACA, MORELOS

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del
Dr. Alfredo Martínez Jiménez
en el **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis** del
Instituto de Biotecnología
de la **Universidad Nacional Autónoma de México.**

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de
los proyectos: EDO. DE MORELOS 2007-C01-80360, SAGARPA-
CONACYT 2004-C01-224; y de la Dirección General de Asuntos del
Personal Académico de la UNAM: PAPIIT IN220908.

Miembros del jurado:

PRESIDENTE:

Dr. Agustín López-Munguía Canales

SECRETARIO:

Dr. Mario Soberón Chávez

VOCAL:

Dr. David Romero Camarena

SUPLENTE:

Dr. Daniel G. Segura González

SUPLENTE:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Agradecimientos:

A mi comité tutorial:

Dr. Miguel Ángel Cevallos G.
Dr. Joel Osuna Q.
Dr. Guillermo Gosset L

Al personal del laboratorio:

Q.I. Luz María Martínez Mejía
M.C. Georgina Hernández
M.C. Ramón de Anda
Dr. Adelfo Escalante
C.D. Mercedes Enzaldo

A la Dra. Ma. Consuelo Vázquez Limón (por el plásmido pK03-*pflB*)

A la unidad de síntesis y secuenciación del IBt-UNAM:

Dr. Paul Gaytan
M.C. Jorge A. Yañez
Q.I. Santiago Becerra
M.C. Eugenio Lopez Bustos

A la secretaria técnica de gestión y transferencia tecnológica del IBt-UNAM:

M.C. Mario Trejo Loyo
M.C. Martín Patiño Vera

A los Dres. Fabien Letisse y Jean Charles Portais del LISBP, Toulouse Fr.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez

A los integrantes del laboratorio Bolivar-Gosset

A mis amigos en Cuernavaca

A Elena

A mi familia

Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
NOMENCLATURA	viii
1.- Resumen	1
2.- Abstract	3
3.-Introducción	5
4.-Antecedentes	8
5.- HIPÓTESIS	13
6.-OBJETIVOS	14
6.1 Objetivo General.....	14
6.2 Objetivos específicos.....	14
7.- Metodología	16
7.1 Microorganismos, plásmidos y oligos.	16
7.2 Condiciones y medios de cultivo.....	18
7.2.1 Inóculos para cultivos.....	18
7.2.2 Medios de cultivo.....	18
7.2.3 Condiciones de cultivo.	19
7.2.4 Muestreo para medición de metabolitos intracelulares.....	19
7.3 Métodos analíticos.....	20
7.3.1 Concentración celular.....	20
7.3.2 Determinación de azúcares y ácidos orgánicos.	20
7.3.3 Determinación de metabolitos intracelulares.....	21
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
8.1 Primera sección: resultados en glucosa	22
8.1.1 Generación y caracterización de cepas productoras de D-lactato	22
8.1.2 Presentación de manuscrito.....	24
8.1.3 Determinación de metabolitos intracelulares.....	30
8.2 Segunda sección: resultados en xilosa.....	33
8.2.1 Caracterización cepas homolácticas en xilosa	33

8.2.2 Eliminación del sistema de transporte <i>xylFGH</i>	34
8.2.3 Evolución adaptativa	35
8.2.3 Resultados de la conversión de xilosa en D-lactato	37
8.2.4 Transporte de xilosa.....	39
8.2.4.1 Inactivación de <i>xyIE</i>	40
8.3 Secuenciación del genoma de JU15	40
8.3.1 Efecto de los cambios a nivel genómico en el fenotipo de JU15.....	43
8.3.2 Efectos de la inactivación de <i>gatC</i>	45
9.- CONCLUSIONES.....	46
10.- Perspectivas	48
11.- Referencias	49
12.- Anexos.....	54
12.1 Anexo I Solicitud de patente	54
12.2 Anexo II Puerto de muestreo anaeróbico.....	56
12.3 Anexo III Metabolitos medidos.....	57
12.4 Anexo III Lista de oligonucleótidos	58
12.4 Anexo IV Otras publicaciones generadas en este trabajo	59

Índice de figuras

Fig.4.1 Metabolismo de glucosa y xilosa en <i>E. coli</i> , principales productos de fermentación y rendimiento de ATP	12
Fig. 8.1 Concentración de metabolitos intracelulares en las cepas MG1655 y CL3. Los números indican la relación de las concentraciones entre las cepas CL3/MG1655	32
Fig. 8.2 Esquema de la estrategia utilizada para la evolución adaptativa. A) Primera etapa de evolución con 40 g/L de xilosa B) segunda etapa de evolución con 120 g/L de xilosa	37
Figura 8.4 A) Cinética de crecimiento de las cepas JU01, JU15 y JU01 Δ reg, B) cinética de consumo de xilosa de las cepas JU01, JU15 y JU01 Δ reg	44
Figura 8.5 Velocidad de crecimiento de las cepas carentes del gen <i>gatC</i> comparadas con las cepas sin dicha mutación	45
Figura 12.1 Puerto de muestreo anaeróbico	56

1.- Resumen

Se llevó a cabo el desarrollo de cepas derivadas de *Escherichia coli* MG1655 productoras de D-lactato; como primera etapa se inactivaron las vías fermentativas para obtener una cepa capaz de producir D-lactato como único producto de fermentación (CL3: MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frdA$). La caracterización de esta cepa en glucosa como fuente de carbono en condiciones no aireadas permitió determinar que la limitación de ATP, que se genera por la falta de producción de acetato derivado de acetyl-CoA, tiene como consecuencia un incremento en el flujo glucolítico. Se encontró que la cepa CL3 tiene una reducción del 40% en su velocidad de crecimiento con respecto a la silvestre. Sin embargo, es capaz de crecer sin mostrar fase de crecimiento retardado, contrastando a lo que se había reportado previamente para otras cepas de *E. coli pfl* en condiciones no aireadas. Se indagó en los mecanismos de generación de acetyl-CoA de la cepa CL3 y se encontró que ésta es producida a través de una actividad basal de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH). También se midió la velocidad inicial de transporte de glucosa, esto con el fin de evaluar si la limitación de ATP que promueve el flujo glucolítico tiene un efecto sobre el transporte de glucosa. Se encontró que la velocidad de transporte de glucosa es igual para la cepa productora de D-lactato y su progenitora.

En una segunda parte del trabajo se caracterizó la cepa homoláctica en xilosa y se encontró que sus velocidades de crecimiento y de consumo de la pentosa son drásticamente menores comparadas a las que presenta en glucosa. Con respecto a la producción, se encontró que la cepa CL3 presenta un alto rendimiento de conversión de xilosa a D-lactato (95% del máximo teórico), pero su baja velocidad de crecimiento y de consumo de xilosa hacen que la productividad volumétrica del proceso sea baja comparado con lo obtenido en glucosa. Se sabe que el transporte de xilosa en *E. coli* se lleva a cabo principalmente por dos mecanismos, uno dependiente de ATP codificado por los genes *xyIFGH* y uno de tipo simporte

codificado por *xylE*. La baja capacidad de crecimiento que tienen las cepas homolácticas en xilosa ha sido atribuida a su bajo rendimiento de ATP. En este trabajo postulamos que esto puede ser aliviado utilizando un transporte de xilosa no dependiente de ATP. Dado lo anterior, se llevó a cabo la eliminación del sistema de transporte dependiente de ATP (*XylFGH*) y se obtuvo la cepa denominada JU01 (MG1655 Δ *pf1B* Δ *adhE* Δ *frdA* Δ *xylFGH::Km*). La cepa JU01 presentó una velocidad de crecimiento 50% mayor a la cepa CL3 en xilosa, esto indica, indirectamente, un mayor rendimiento de ATP alcanzado por la cepa JU01 y sugiere que está usando *XylE* como sistema de transporte alternativo. Aún con lo mencionado anteriormente, la fermentación de 40 g/L de xilosa por la cepa JU01 se demora el doble de lo que se obtiene en glucosa. Para mejorar la velocidad de crecimiento de la cepa JU01 se utilizó una estrategia de evolución en medio mineral-xilosa, del cual se aisló la cepa denominada JU15 (MG1655 Δ *pf1B* Δ *adhE* Δ *frdA* Δ *xylFGH::Km* *evolucionada*). Ésta cepa presenta una velocidad de crecimiento 50% mayor a JU01, reduce el tiempo de fermentación en 24 horas y conserva el rendimiento del 95% de conversión de xilosa a D-lactato. Se llevó a cabo una secuenciación genómica comparativa entre MG1655 y JU15, se encontró que esta última perdió una región de 27.4 kb y que tiene una mutación en el gen *gatC* que provoca el cambio de una serina por una leucina en el aminoácido 183 de la proteína (451 aminoácidos). El cual afecta el dominio tipo PTSIIC, en una región predicha como transmembranal. Se eliminó la región correspondiente a los 27.4 kb en JU01 y se eliminó el gen de *gatC* en JU01 y JU15. Los resultados mostraron que la pérdida de la región por sí sola no tiene un efecto favorable en la velocidad de crecimiento de JU01. Al eliminar *gatC* en JU01 y JU15 las cepas presentaron una reducción drástica de la velocidad de crecimiento y consumo de xilosa. Por otro lado, la inactivación de *xylE* en JU01 y JU15 permitió concluir que existen transportadores de xilosa alternativos a los ya reportados. Estos resultados indican que, a parte de *XylFGH* y *XylE*, *GatC* tiene un papel importante en el transporte de xilosa. Además, permiten sugerir que la mutación encontrada en *gatC* mejora el transporte de xilosa con un menor consumo neto de ATP para su internalización y fosforilación.

2.- Abstract

Metabolic pathway engineering and metabolic evolution were used to develop D-lactate producing strains of *Escherichia coli*. In a first stage, the fermentative pathways were eliminated in *E. coli* MG1655 to obtain a strain capable of producing D-lactate as the only fermentation product (CL3: MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ $\Delta frdA$). The resulting strain was studied using glucose as carbon source under non aerated-(fermentative)-conditions. The results show that the glycolytic flux is increased as a consequence of the ATP limitation resulting from the lack of acetate production from acetyl-CoA. Due to the inactivation of the main acetyl-CoA production pathway, the CL3 strain grew 40% slower than the parental strain. In contrast to other reported results from *pfl* mutants, we found that the MG1655 *pflB* derivative is able to grow in mineral media with glucose as the sole carbon source under fermentative conditions without a lag phase. The mechanisms of acetyl-CoA generation were investigated. It was found that a residual pyruvate dehydrogenase (PDH) activity is responsible for the acetyl-CoA production in CL3. To evaluate if the ATP limitation found had an effect in glucose transport, the initial glucose transport rate was studied in CL3 and its progenitor strain. The results showed that the glucose transport rate is the same in both strains.

In the second stage of this work, CL3 was characterized using xylose as the sole carbon source. In comparison to glucose, results show that the specific rates of growth and xylose consumption were considerably lower. The lactate yield obtained with CL3 from xylose is the same than the one from glucose (95% of the theoretical maximum). However, the volumetric productivity is very low compared to the productivity using glucose since the growth rate is low. Xylose transport in *E. coli* is carried out through two transport systems: an ATP dependent coded by *xyIFGH* genes, and a symporter coded by *xyIE*. The poor growth of homolactic strains in xylose has been attributed to the low ATP yield in this carbon source. In

this work we propose that its low growth rate can be alleviated using a non-ATP dependent xylose transporter. Thus, the *xylFGH* genes were deleted and strain JU01 was obtained (MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frdA \Delta xylFGH::Km$). JU01 showed a growth rate 50% higher than CL3 strain in xylose, suggesting the use of alternative transporter that allows a higher ATP yield. Even with the increase in growth rate of JU01, the fermentation of 40 g/L of xylose still takes the double of time than in glucose. In order to improve JU01 growth rate, an evolution strategy was employed in mineral medium with xylose as sole carbon source. A strain, called JU15 (MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frdA \Delta xylFGH::Km$ evolved), was isolated from the adaptive evolution procedure. Compared to the progenitor strain (JU01), the isolated strain JU15 showed a growth rate increase of 50%, and the fermentation time was reduced 24 hours. Using comparative genome sequencing, it was found that JU15 has a 27.4 kb deletion and a point mutation in *gatC* gene. The mutation is a change of a serine for a leucine in the 183 amino acid of the GatC protein (451 amino acids). The mutation is located in the PTSIIC domain (phosphotransferase system IIC) in a predicted transmembranal region. The deleted 27.4 kb found in JU15 region was eliminated in JU01, also the *gatC* gene was deleted in JU01 and JU15. Results showed that deleting the 27.4 kb region did not improve JU01 growth. Also, when *gatC* was deleted from JU01 and JU15 a drastic reduction in growth and xylose consumption rate was observed. Furthermore, *xyIE* inactivation in JU01 and JU15 allow us to conclude that alternative xylose transporter, exists in *E. coli*. These facts indicate that, besides XylFGH and XylE, GatC has an important role in xylose transport, and allow us to suggest that the mentioned mutation in GatC improves xylose transport with a lower net ATP consumption for xylose internalization and phosphorylation.

3.-Introducción

El futuro agotamiento de las reservas de petróleo y diversos aspectos ambientales plantean la necesidad de desarrollar procesos sustentables para sustituir productos que son obtenidos a partir del mismo. Los residuos agroindustriales constituyen una fuente renovable, de gran abundancia y bajo costo, que potencialmente pueden ser utilizados como materia prima para la fabricación de productos químicos de gran volumen. Estos materiales son altamente heterogéneos y están compuestos principalmente por hemicelulosa, celulosa, lignina y pectinas, los cuales para su bioconversión requieren ser hidrolizados en azúcares solubles, utilizando métodos químicos (hidrólisis con ácidos minerales) y/o enzimáticos. La fracción hemicelulósica está compuesta principalmente de pentosas -xilosa y arabinosa-, y una pequeña fracción de hexosas (glucosa y manosa; Martínez *et al.*, 2001, Grohmann *et al.*, 1985). Después de la glucosa, la xilosa es el monosacárido más abundante en la naturaleza y generalmente se encuentra polimerizado en la fracción hemicelulósica. La variedad de microorganismos que metabolizan tanto pentosas como hexosas es reducida, más aún, no se conocen microorganismos silvestres que puedan catabolizar eficientemente en condiciones anaeróbicas xilosa o arabinosa, mezclas de glucosa-xilosa o glucosa-celobiosa en productos de fermentación (Hernández-Montalvo *et al.*, 2001).

Debido a su uso en la manufactura de plásticos biodegradables de alta calidad, conocidos por el nombre genérico de polilactatos o ácido poliláctico (PLA) (Dien *et al.*, 2002; Skory, 2003, Naranayan *et al.*, 2004), la demanda de ácido láctico se está incrementando sustancialmente y para este propósito es deseable obtenerlo de fuentes renovables que no compitan con materias primas que se utilizan para la alimentación humana. El ácido láctico se produce comercialmente por síntesis química o por fermentación. En comparación con los procesos químicos, los de fermentación tienen potencialmente varias ventajas: a) se pueden obtener por

separado los isómeros ópticamente puros y de esta manera facilitar y reducir sustancialmente los costos de purificación; b) su producción es a partir de material renovable; y c) se pueden usar materias primas que constituyen un desecho para algunas agroindustrias. El proceso fermentativo puede ser llevado a cabo por una gran variedad de microorganismos y algunas bacterias lácticas, como *Lactobacillus bulgaricus*, producen lactato ópticamente puro. La producción por fermentación se ha llevado a cabo con bacterias lácticas como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus amylophilus* y *Lactobacillus delbruekii* (Chang *et al.*, 1999, Narayanan *et al.*, 2004). Las bacterias lácticas tienen requerimientos nutricionales complejos, sus medios de cultivo requieren ser suplementados con aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, pues pertenecen a los grupos de microorganismos que perdieron su habilidad para sintetizar sus propios factores de crecimiento, consecuentemente no pueden crecer en fuentes simples de carbono y sales inorgánicas de nitrógeno (Narayanan *et al.*, 2004, Hébert *et al.*, 2004). Por lo antes mencionado los medios para la producción deben ser suplementados con fuentes de nitrógeno complejas (extracto de levadura, sólidos de licor de maíz, harina de soya. etc.) y la mayor productividad de Lactato se alcanza en concentraciones óptimas de hasta 10 g/L de dichas fuentes (Göksungur *et al.*, 1997); esto incrementa de manera significativa el costo de producción y purificación del producto.

La síntesis y las propiedades físicas y de biodegradación del PLA dependen de la relación usada de los enantiómeros ópticamente puros (Dien *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2003b). En el presente proyecto se pretende desarrollar cepas para utilizarlas en procesos fermentativos en los que se obtengan moléculas que puedan utilizarse como precursores para la producción de bioplásticos, como es el caso del D-lactato, sin utilizar fuentes de carbono que compitan con los alimentos. Es decir, desarrollar cepas capaces de convertir los azúcares presentes en los residuos lignocelulósicos en lactatos ópticamente puros. En ese sentido, dos aspectos importantes que requieren ser estudiados y mejorados son la velocidad volumétrica para producir D o L lactato ópticamente

puros y su producción a partir de pentosas, particularmente xilosa, usando medios minerales y mezclas de azúcares contenidos en los jarabes obtenidos de hidrolizados de hemicelulosa. Así mismo, el lactato que se produce principalmente por medios fermentativos a nivel industrial es el isómero L y para la generación de bioplásticos termoresistentes es deseable tener una alta cantidad de isómero D (PURAC 2008). De tal forma que la producción fermentativa de D-lactato ópticamente puro ha cobrado gran importancia en los últimos años.

4.-Antecedentes

En los últimos años el empleo de la tecnología del ADN recombinante y el análisis sistemático de datos biológicos han aumentado considerablemente, dando lugar a la ingeniería de vías metabólicas (IVM), la cual se define como la modificación y/o introducción de nuevas reacciones bioquímicas para el mejoramiento directo de propiedades celulares mediante tecnología de ADN recombinante (Stephanopoulos, 1999; Bailey, 1991). De esta manera se han iniciado el desarrollo de nuevas cepas, mediante IVM, con la propiedad de crecer en medios minerales, producir ácido láctico, fermentar los azúcares presentes en los materiales lignocelulósicos, además, de que sintetizan solo una forma isomérica del ácido láctico, disminuyendo de esta forma los costos de producción y purificación del producto. A la fecha, las bacterias lácticas, hongos, levaduras y bacterias modificadas genéticamente han sido investigadas como potenciales biocatalizadores para la producción de ácido láctico (Narayanan *et al.*, 2004 Skory, 2003). En la mayoría de los trabajos, se usan medios de cultivo complejos (ricos) para alcanzar rendimientos cercanos al teórico de conversión de glucosa a láctico, siendo pocos los trabajos realizados utilizando medios minerales con altos rendimientos de conversión y en esos trabajos las productividades de lactato son bajas comparadas a las obtenidas con otros organismos en medios complejos (Chang *et al.*, 1999; Dien *et al.*, 2001; Yun y Ryu, 2001; Dien *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2003; Skory, 2003; Zhou *et al.*, 2003a; Zhou *et al.*, 2003b).

Entre los microorganismos que producen D-lactato se encuentra *Escherichia coli*, el cual contiene un gen que codifica para una lactato deshidrogenasa (LdhA), la cual se expresa en condiciones anaeróbicas (Zhou *et al.*, 2003a). Sin embargo, *E. coli* al ser cultivada en condiciones anaeróbicas, en presencia de glucosa o xilosa, sintetiza una mezcla de productos, compuestos principalmente de ácido acético, fórmico, láctico, succínico y etanol (Böck y Sawers 1996; Tao *et al.*, 2001). No

obstante, en comparación con otros microorganismos homolácticos, *E. coli* tiene varias ventajas, tales como crecimiento rápido en aerobiosis y anaerobiosis, habilidad para fermentar pentosas, requerimientos nutricionales simples, gran conocimiento de su fisiología y facilidad de manipulación genética. Debido a lo anterior, se ha iniciado el desarrollo de nuevas cepas mediante IVM, con la propiedad de crecer en medios minerales y producir un solo isómero de lactato (Bai *et al.* 2003; Dien *et al.*, 2002; Zhou *et al.* 2003a y 2003b; Zhu y Shimizu 2004; Zhou *et al.*, 2006a; Zhou *et al.* 2006b; Zhou *et al.*, 2005).

Cuando *Escherichia coli* se encuentra en condiciones de fermentación, la enzima piruvato formato liasa (Pfl) compromete gran parte del flujo de piruvato (más del 45%) (Clark, 1989) a formato y acetil-CoA, este último compuesto es posteriormente convertido en acético, etanol y componentes celulares (Böck y Sawers, 1996). La estrategia más empleada para la generación de cepas de *E. coli* productoras de D-lactato ópticamente puro consiste en la interrupción de *pflB* (Zhou *et al.* 2003a y 2003b; Zhu y Shimizu 2004; Zhou *et al.* 2006a; Zhou *et al.* 2006b; Zhou *et al.*, 2005). Con esta estrategia se han obtenido rendimientos de conversión de glucosa en D-lactato superiores al 95% del teórico (Zhou *et al.*, 2003a y 2003b). No obstante, como respuesta a una baja disponibilidad de acetil-CoA se reduce drásticamente la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa a la mitad (< 0.35 g/L). La alta afinidad de la lactato deshidrogenasa (Ldh) por el piruvato ($K_m = 7$ mM), la regulación positiva de la Ldh por la mayor disponibilidad de piruvato intracelular y la eliminación de vías que compiten por su disponibilidad, ocasionan que la velocidad específica de obtención de lactato sea alta (2.5 g_{LACTATO} / g_{DCWH}). Además, mediante la eliminación de las vías que compiten por el poder reductor (alcohol deshidrogenasa y fumarato reductasa) se logra que piruvato sea el único aceptor de electrones en condiciones de fermentación y se favorece su producción. Sin embargo, la baja concentración celular no favorece altas tasas de producción volumétrica (Zhou *et al.*, 2003a).

Por otro lado, de acuerdo a la red metabólica funcional de *E. coli* en condiciones de fermentación, por cada mol de glucosa catabolizada hasta piruvato se obtienen dos moles de ATP. Si la mitad del piruvato generado es convertido en acético, el rendimiento se incrementa a $3 \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{Glc}}$. En el caso de la xilosa el rendimiento es tan solo de $0.67 \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{Xil}}$ cuando *E. coli* cataboliza este azúcar hasta piruvato. De tal manera que Pfl y Ack son primordiales en el crecimiento de *E. coli* con xilosa, dado que la conversión de un mol de piruvato en acetyl-CoA y posteriormente en acetato genera un mol extra de ATP, pudiendo aumentar el rendimiento del mismo hasta $1.5 \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{Xil}}$. En consecuencia, las cepas de *E. coli* W3110 interrumpidas en *pflB* no pueden crecer en dicha pentosa, debido a que únicamente se obtienen $0.67 \text{ mol}_{\text{ATP}}/\text{mol}_{\text{Xil}}$ (Fig.1). La insuficiencia de ATP fue confirmada inactivando el gen de la acetato cinasa (*ack*) en W3110 (con Pfl funcional), la mutante fue incapaz de crecer en medio mínimo suplementado con xilosa en condiciones anaeróbicas (Hasona *et al.*, 2004). En el caso de la glucosa, el transporte y fosforilación se lleva a cabo por el sistema PTS con el gasto de un equivalente de ATP. En cambio para xilosa, la célula gasta dos moléculas de ATP, una para el transporte (transportador de alta afinidad tipo ABC codificado por *xyIF*, *xyIG* y *xyIH*.) y la segunda para la fosforilación (Lin, 1996; Linton y Higgins 1998). En arabinosa la internalización de la pentosa a la célula se lleva a cabo por simporte (arabinosa/H⁺) mediante AraE, un transportador de baja afinidad y alta capacidad. Esto conserva una molécula de ATP gastada en el transporte de pentosas mediante el transportador ABC y ambas mutantes (*pfl* y *ack*) crecen en arabinosa (Hasona *et al.*, 2004).

Mediante la inactivación del operón *pfl* en la cepa etanológica KO11 (*E. coli* B $\Delta\text{frd } pfl:: pdc_{\text{Zm}}\text{-}adh_{\text{Zm}}$ Cat; Ohta *et al.*, 1991) y su evolución en medios minerales con alta concentración de glucosa a través transferencias subsecuentes, se han obtenido cepas que fermentan 12% de glucosa a lactato con alta productividad y rendimiento (Zhou *et al.*, 2006a, Zhou *et al.* 2006b, Zhou *et al.*, 2005). Con esta estrategia, llamada “evolución metabólica” (Zhou *et al.*, 2005) o “evolución adaptativa” (Ibarra *et al.*, 2002; Honisch *et al.*, 2004), se pueden seleccionar cepas

que mejoran la producción de un metabolito seleccionado (Elena y Lenski, 2003). En años recientes la evolución adaptativa ha sido una estrategia ampliamente utilizada para desarrollar cepas productoras (Orencio-Trejo et al., 2010). Mediante la secuenciación de cepas así obtenidas se han encontrado mutaciones en genes clave para optimizar la producción de un metabolito de interés o para el consumo de algún sustrato (Orencio-trejo et al., 2010; Herring et al., 2006).

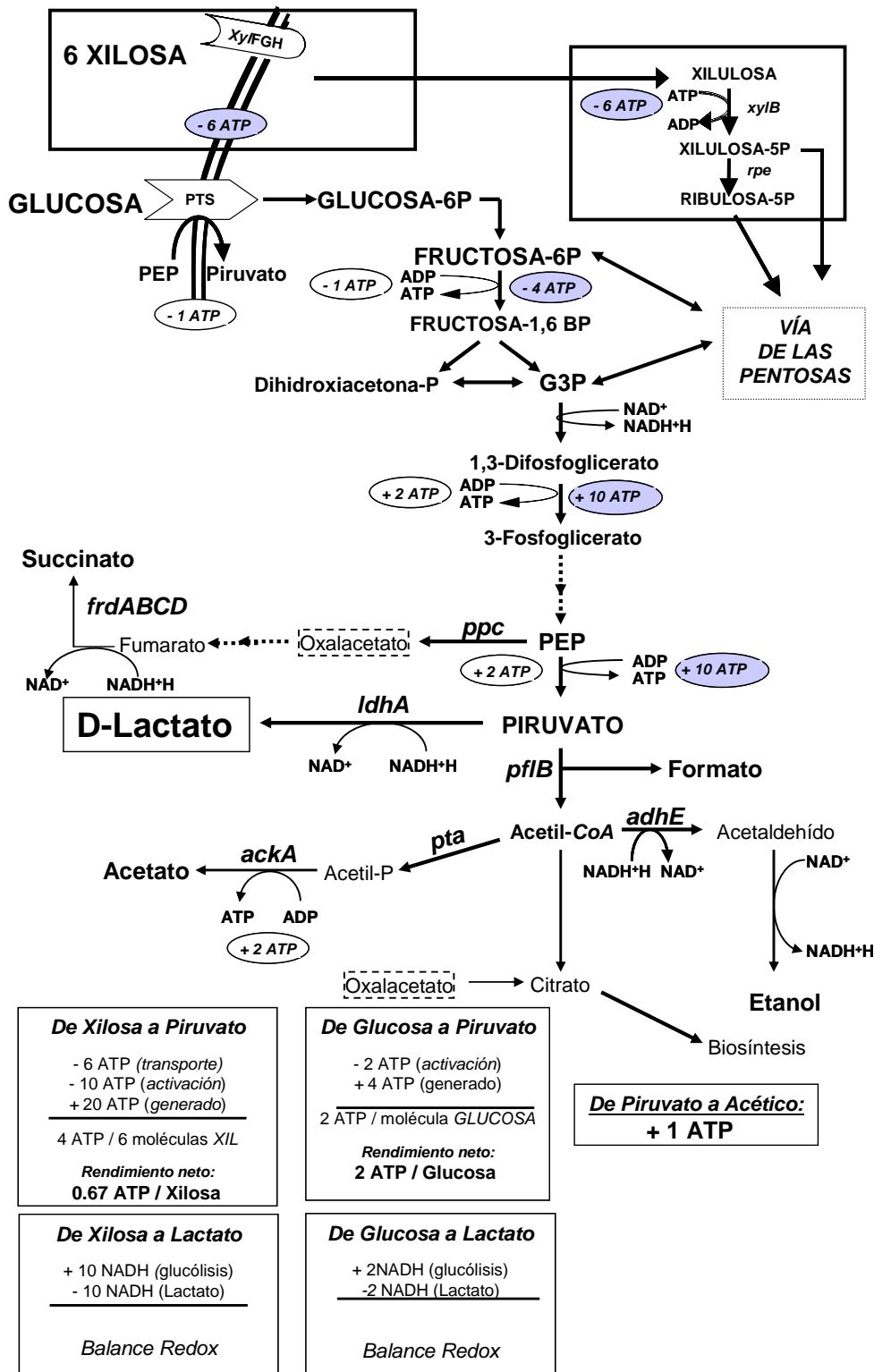


Fig.4.1 Metabolismo de glucosa y xilosa en *E. coli*, principales productos de fermentación y rendimiento de ATP

5.- HIPÓTESIS

La eliminación de las vías fermentativas y la reducción del uso de ATP en el transporte de xilosa, seguido de un proceso de evolución adaptativa permitirá obtener cepas de *Escherichia coli* capaces de crecer en xilosa en condiciones anaeróbicas y de producir D-lactato con alto rendimiento y productividad.

6.-OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Generar cepas de *E. coli* productoras de D-lactato con alto rendimiento y productividad, capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono a través de la modificación de las vías fermentativas, el transporte de xilosa y evolución adaptativa. Estudiar los cambios que ocurrieron en las cepas generadas para explicar el fenotipo obtenido.

6.2 Objetivos específicos

Eliminar los genes que codifican para las enzimas fermentativas: piruvato formato liasa (*pf1B*), alcohol deshidrogenasa (*adhE*) y fumarato reductasa (*frdA*) en la cepa MG1655 de *E. coli*, y caracterizar las cepas obtenidas en su velocidad de crecimiento, velocidad específica de consumo de glucosa y xilosa, rendimiento y productividad de D-lactato.

Evaluar los efectos de la inactivación de las vías fermentativas en el transporte de glucosa, relación ATP/ADP y la contribución de la piruvato deshidrogenasa a la formación de acetil-CoA en la cepa obtenida (MG1655 $\Delta pf1B \Delta adhE \Delta frdA$).

Comparar las pozas de metabolitos intracelulares clave de las cepas MG1655 $\Delta pf1B \Delta adhE \Delta frdA$ y su progenitora crecidas en glucosa.

Inactivar el sistema de transporte de xilosa dependiente de ATP (*xyIFGH*) y evaluar su efecto sobre las velocidades específicas de crecimiento, de consumo de xilosa y de producción de lactato.

Seleccionar mediante evolución adaptativa una mutante derivada de la cepa MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frda \Delta xylFGH$, que mejoren su crecimiento en xilosa como única fuente de carbono a nivel de mini-fermentador y evaluar su productividad de D-Lactato en medio mineral-xilosa.

Caracterizar una mutante obtenida mediante: la cuantificación de la velocidad de transporte de xilosa; la contribución de otros transportadores en el consumo de xilosa; secuenciación genómica comparativa de la cepa; y evaluación de la contribución de los cambios detectados en el fenotipo observado.

7.- Metodología

7.1 Microorganismos, plásmidos y oligonucleotidos.

Los microorganismos plásmidos y oligonucleotidos utilizados en el presente estudio se presentan en las tablas 7.1, 7.2, 7.3. Con excepción de la eliminación de *pflB*, que se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Lara et al., 2006, todas las eliminaciones de genes se llevaron a cabo por el método para la inactivación de genes cromosomales por productos de PCR (Datsenko y Wanner 2000)

Tabla 7.1 Cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo

Cepas	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> MG1655	Cepa silvestre	
CL3	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd	Este trabajo
JU01	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd $\Delta xyIFGH::Km$	Este trabajo
JU15	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd $\Delta xyIFGH::Km$ E15 cepa evolucionada en xilosa como única fuente de carbono y condiciones no aireadas	Este trabajo
JU01 $\Delta xyIE$	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd $\Delta xyIFGH$ $\Delta xyIE$	Este trabajo
JU15 $\Delta xyIE$	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd $\Delta xyIFGH::Km$ E15	Este trabajo
JU01 Δreg	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd $\Delta xyIFGH::Km$ Δreg 27.4 <i>kpb</i>	Este trabajo
JU01 $\Delta gatC$	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd $\Delta xyIFGH::Km$ $\Delta gatC$	Este trabajo
JU15 $\Delta gatC$	MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ Δfrd $\Delta xyIFGH::Km$ E15 $\Delta gatC$	Este trabajo

Tabla 7.2 Plásmidos empleados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia
pKO3- <i>pflB</i>	Derivado del vector pKO3 (Church <i>et al</i> 1999) con regiones de homología a <i>pflB</i>	Lara et al., 2006
pKD46	Vector termosensible e inducible por arabinosa para expresión del sistema de la recombinasa red	Datsenko y Wanner 2000
pKD4	Templado para amplificar el cassette de resistencia a Km flanqueado por sitios FRT	Datsenko y Wanner 2000
pKD3	Templado para amplificar el cassette de resistencia a Cm flanqueado por sitios FRT	Datsenko y Wanner 2000
pCP20	Vector termosensible que codifica para la FLP recombinasa	Datsenko y Wanner 2000

Tabla 7.3 Oligos usados en este trabajo.

Gene	Oligo ^a Nombre / secuencia	Uso
AdhForw AdhRev	5'TAACATTATCAGGAGAGCATT ATGGCTGTTACTAAT GTGCTGAACTTT TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG3' 5'CTCAGCTTTAGCCGGAGCAGCTTCTTTCTTCGCTGC AGTTT CACCTTCCATATGAATATCCTCCTTAG3'	Interrupción de <i>adhE</i>
AdhckF AdhckR	5'AAT CTT GCT TAC GCC ACC TGG AAG3' 5'TTG TGC AGA GGG CGG AGG CAT AAG3'	Verificar interrupción de <i>adhE</i>
frdForw frdRev	5'GTACGTGGCTGTGGGATAAAAACAATCTGGAGGAAT GTCTGTGTTAGGCTGGAGCTGCTTC3' 5'GTTATAGCGCACCACTCAATTTTCAGGTTTTTCATC TCAGCCATTCATATGAATATCCTCCTTA3'	Interrupción de <i>frdA</i>
frdckF frdckR	5'GGAGTACGTGGCTGTGGG3' 5'TGC AGA GCC TGA CCA TCA GA3'	Verificar interrupción de <i>frdA</i>
XylFor XylRev	5'AACGTTGCTGCACACGCCAAAGAAGTCAAATAGGT ATGGCGATTGATT TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' 5'GCACCTTTAACGATATACTGCCAGAAGGTCGGTACA TCCATCATACTCCATATGAATATCCTCCTTAG 3'	Interrupción de <i>xylFGH</i>
XylckF XylckR	5' TGTCCCTAACTACAGAAAGGC 3' 5' TATCAAATCAAGAACGGCG 3'	Verificar interrupción de <i>xylFGH</i>
xylEF xylER	5'GGCAGGTCTGAATGAATACCCAGTATAATTCCAGTT ATATATTTTCGATTT TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG3' 5'ACAGGAAGATTACAGCGTAGCAGTTTGTGTGTTTT CTTCGTTTCCGGCATATGAATATCCTCCTTAG3'	Interrupción de <i>xylE</i>
xylEckF xylEckR	5'CCTGACAATTCCAACATCAA3' 5'GTGTAATTGAAACGGCTGA3'	Verificar interrupción de <i>xylE</i>
gatCF gatCR	5'CTATCTTACAGGGGTGACCTATGTTTTCAGAAGTCA TGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG3' 5'GCCACGCGCTCTACGCCAGGTCATGAAAATACCGG TCAGACATATGAATATCCTCCTTAG3'	Interrupción de <i>gatC</i>
gatC-CF gatC-CR	5'TCTACGATGGCGGCGGAAGA3' 5'CATCACGCCGCGAGCCAATA3'	Verificar interrupción de <i>gatC</i>
regFor	5'TGAACCCTGTTCTATGGCTCCAGATGACAAACATGA	Interrupción de

regRev	TCTCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG3' 5'TGGCTGCTCCGCATGAGCTACCGGCATTGTTGGCG CGTATCATATGAATATCCTCCTTAG3'	región cromosomal de 27.4 kpb
UpsFor DwnRev	5'GGCCAGTTGATGCTGCTCCA3' 5'AACATACGAAGGGCAGGAAC3'	Verificar pérdida de región cromosomal de 27.4 kbp y su interrupción

^a Fuente: Unidad de síntesis IBt – UNAM. Las bases sombreadas las secuencias de reconocimiento al plásmido pKD4 o pKD3

Tanto los productos de PCR como los plásmidos empleados en este trabajo se analizaron en geles de agarosa al 1.2 % por patrones de restricción.

7.2 Condiciones y medios de cultivo.

7.2.1 Inóculos para cultivos.

A partir de las células congeladas en glicerol (40%) se sembraron tubos estériles con 5 mL de medio mineral con la fuente de carbono a usar (xilosa o glucosa) con antibiótico cuando fue necesario (kanamicina 40 mg/L, cloramfenicol 10-30 mg/L), y se incubaron a 37°C de 8 – 12 h. A partir de este precultivo se sembró un mini-fermentador con 200 mL de medio y controlando el pH con adición de KOH 2-4N a 37°C y agitación de 150 rpm. Los inóculos se incubaron durante 12-16 h, hasta alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 1 a 1.5. Todos los cultivos fueron inoculados centrifugando (5000 rpm, 10 min y 4°C) la cantidad suficiente de inóculo para obtener una DO_{600} inicial ≈ 0.1 (0.037 g_{DCW}/l), las células fueron transferidas a cada cultivo resuspendiéndolas en el medio respectivo.

7.2.2 Medios de cultivo.

La composición del medio AM2 (Martínez et. al., 2007) fue: 2.63 g/L (NH₄)₂HPO₄, 0.87 g/L NH₄H₂PO₄, 1.0 mL/L MgSO₄·7H₂O (1M), 1.5 mL/L elementos traza, 1.0 mL/L KCl (2M), 1.0 mL/L Betaina HCl (1M), 100 mg/L ácido cítrico. Los elementos traza contienen (en g/L): 1.6 de FeCl₃, 0.2 de CoCl₂·6H₂O, 0.1 de CuCl₂, 0.2 de ZnCl₂·4H₂O, 0.2 de Na₂MoO₄, 0.05 de H₃BO₃ y 0.33 de MnCl₂·4H₂O₂. El medio fue suplementado con concentraciones diferentes de xilosa y glucosa. La composición del medio mínimo M9 (Maniatis et al., 1982) para cultivo en mini-fermentadores,

contiene por litro: 6 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 1 g NH_4Cl ; 0.5 g NaCl ; 1 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M; 0.1 ml de CaCl_2 0.1M; 1 ml de Tiamina 1 mg/ml (esterilizada por filtración). El medio Luria (Maniatis *et al.*, 1982) contiene por litro: 10 g Bactotripton; 5 g extracto de levadura; y 5 g NaCl . La composición del medio bajo en fosfatos usado en los cultivos para la medición de metabolitos intracelulares contiene por litro: 0.263 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.087 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.3 mL/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M), 1.5 mL/L elementos traza, 1.0 mL/L KCl (2M), 1.0 mL/L Betaina HCl (1M). Los elementos traza contienen (en g/L): 1.6 de FeCl_3 , 0.2 de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 de CuCl_2 , 0.2 de $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 de Na_2MoO_4 , 0.05 de H_3BO_3 y 0.33 de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

7.2.3 Condiciones de cultivo.

Los cultivos anaeróbicos se realizaron en sistemas de mini-fermentadores o mini-fleakers (Beall *et al.*, 1991), con un volumen de trabajo de 200 mL. La temperatura se controló a 37°C y el pH a 7.0 mediante la adición automática de KOH 2N. Para garantizar el mezclado, los cultivos se mantuvieron a una velocidad de agitación de 100 rpm. Para los experimentos de medición de metabolitos intracelulares, los cultivos se llevaron a cabo en fermentadores de 500 mL, usando 400 mL de volumen de operación con las mismas condiciones utilizadas para las fermentaciones en mini-fermentadores. Se utilizó una presión de nitrógeno de 0.1 a 0.3 bares en el espacio de cabeza del fermentador para mantener las condiciones anaeróbicas estrictas. Los cultivos aeróbicos se realizaron en matraces nefelométricos de 125 ml con 25 ml de medio AM2, a una temperatura de 37°C, sin control de pH y una velocidad de agitación de 300 rpm.

7.2.4 Muestreo para medición de metabolitos intracelulares

Las muestras fueron tomadas usando un puerto anaeróbico diseñado en este trabajo para tal fin (Anexo II). Dos muestras fueron tomadas en diferentes puntos de la fase de crecimiento exponencial para poder asumir la condición de estado pseudo-estable, demostrando que el cambio de la concentración de los

metabolitos en el tiempo es igual a cero. Se analizaron 3 réplicas de cada muestra. Al momento de la toma de muestra se agregaron 100 μL de metabolitos obtenidos de un extracto de *E. coli* cultivada en glucosa uniformemente marcada con C^{13} para tal fin. Los metabolitos marcados en C^{13} se utilizaron como estándar interno de acuerdo a lo reportado por Wu et al (2005). Se utilizó el método diferencial midiendo metabolitos en el caldo total y en el caldo filtrado (Taymaz-Nikerel et al., 2009). El arresto de las actividades metabólicas (quenching) y la extracción de metabolitos fue realizado con etanol caliente al 75% (Gonzalez et al 1997). Las muestras extraídas fueron secadas al vacío o liofilizadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis. Las muestras fueron resuspendidas en agua mQ y filtradas antes de ser analizadas. El muestreo y extracción para tioésteres de CoA fue realizado con acetonitrilo frío, de acuerdo a Peyraud *et al.*, (2009).

7.3 Métodos analíticos

7.3.1 Concentración celular

La densidad óptica fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU-70) y convertida a peso seco de células (DCW: dry cell weight), de acuerdo a una curva de calibración: $1 \text{ DO}_{600} = 0.37 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{l}$. Todas las muestras fueron centrifugadas (5,000 rpm y temperatura ambiente); el paquete celular se desechó y el sobrenadante se congeló para su posterior análisis. Las mediciones de densidad óptica en los matraces nefelométricos se llevaron a cabo empleando un fotocolorímetro Klett/summerson modelo 800-3.

7.3.2 Determinación de azúcares y ácidos orgánicos.

Las determinaciones de glucosa y xilosa, presentes en el sobrenadante, se realizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Los productos de fermentación, ácidos orgánicos (acético, fórmico, succínico, láctico, etc.) y etanol también fueron cuantificados por HPLC. Las determinaciones por HPLC, se llevaron a cabo por cromatografía isocrática con H_2SO_4 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 ml/min en una columna Aminex HPX-87H (Biorad) a 50°C . La

detección de los compuestos separados, se llevó a cabo simultáneamente con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). El análisis y procesamiento de datos se realizó con el sistema Milenium (Versión 3.01 Waters). Las temperaturas interna y externa de la columna fueron ajustadas a 45 y 50°C respectivamente. Los sobrenadantes de las muestras a analizar se filtraron con membranas de 0.45 µm y se inyectaron automáticamente con ayuda del autoinyector (Waters 717). Para la confirmación de los azúcares y los productos analizados por HPLC se inyectaron estándares de xilosa, ácidos orgánicos, alcoholes e intermediarios metabólicos.

7.3.3 Determinación de metabolitos intracelulares

La cuantificación de metabolitos intracelulares fue realizada por LC-ESI-MS/MS como se describe en Kiefer et al (2007). Algunos metabolitos no pudieron ser cuantificados debido a la falta de estándares o a que presentaron una alta concentración extracelular, enmascarando la concentración intracelular. Para medir la concentración intracelular de piruvato se utilizó HPLC con una columna Aminex HPX-87H con H₂SO₄ 5mM como fase móvil, usando un detector de arreglo de diodos a 200 nm. Los análisis de tioesteres de CoA fueron realizados por LC-MS usando un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap como lo reportado por Peyraud *et al.*, 2009.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo se divide en la caracterización primero en glucosa y luego en xilosa de las cepas generadas. En la primera etapa se discute la generación de cepas homolácticas y su caracterización en glucosa como fuente de carbono. En la segunda, se presenta la modificación de las cepas previamente obtenidas para la eficiente conversión de xilosa a D-lactato. Así mismo, se analiza la caracterización de las cepas obtenidas.

8.1 Primera sección: resultados en glucosa

8.1.1 Generación y caracterización de cepas productoras de D-lactato

En la primera etapa del proyecto se construyeron cepas derivadas de *E. coli* MG1655 a las que se les inactivaron secuencialmente los genes que codifican para las enzimas fermentativas: piruvato formato liasa (*pflB*), alcohol deshidrogenasa (*adhE*) y fumarato reductasa (*frdA*). La cepa obtenida, denominada CL3 (*MG1655 ΔpflB ΔadhE ΔfrdA*), se caracterizó en mini-fermentadores, con pH controlado (7) en medio mineral, M9 (Maniatis *et al.*, 1982) o AM2 (Martinez *et al.*, 2007) glucosa 40 g/L. Se encontró que se obtiene un rendimiento de conversión de glucosa a lactato del 95% respecto al teórico. Comparada con la cepa silvestre, se presentó una reducción en la velocidad de crecimiento del 40% y un aumento casi al triple, con respecto a la cepa silvestre, en la velocidad específica de consumo de azúcar. Este aumento en el consumo de glucosa puede ser atribuido a la disminución del rendimiento de ATP cuando la cepa produce únicamente lactato. El resultado concuerda con un estudio en el que mediante la disminución del rendimiento de ATP, por la expresión de una ATPasa heteróloga, se logró estimular el flujo glucolítico (Koebmann *et al.*, 2002). El aumento en el flujo glucolítico y el alto rendimiento de lactato obtenido a partir de glucosa, hacen que la productividad volumétrica sea alta (1.11 g_{Lact}/L.h). Además, usando el medio mineral AM2 (Martinez *et al.*, 2007), se logró un aumento en la producción de biomasa (38%) comparado con lo que se obtenía usando el medio

M9, lo que impacta en la productividad volumétrica ($1.31 \text{ g}_{\text{Lact}}/\text{L.h}$), siendo ésta la más alta reportada en un proceso tipo lote para una cepa de *E. coli* que no haya sido sometida a evolución adaptativa. Adicionalmente, se encontró que la cepa CL3 tiene una relación ATP/ADP 22% menor a la de la cepa MG1655. Lo anterior se atribuye a que el rendimiento de ATP cuando únicamente se produce lactato es de 2 ATP/ mol de glucosa, de tal manera que la cepa CL3 tiene que incrementar su flujo glucolítico para complementar sus necesidades de ATP para crecer. La eliminación del gen *aceF* en las cepas MG1655 y CL3 permitió concluir que el complejo de la piruvato deshidrogenasa es funcional en las condiciones evaluadas. Estos resultados sugieren que el flujo de piruvato a acetyl-CoA en la cepa CL3 y sus derivadas depende de la actividad del complejo de la PDH y que el decremento en la relación ATP/ADP causa un incremento en el flujo de glucosa a lactato. Para determinar si el incremento en el flujo glucolítico en CL3 está relacionado con el transporte de glucosa, se midió la velocidad inicial de transporte del azúcar. Se encontró que las cepas MG1655 y CL3 presentaron la misma velocidad, el no encontrar aumento en la velocidad de transporte de glucosa en la cepa CL3 nos permite concluir que el transporte de glucosa no es un paso limitante en la velocidad de consumo del mismo azúcar en las condiciones evaluadas. Los detalles de esta parte del trabajo, incluyendo la metodología para cuantificar la relación ATP/ADP, el transporte de glucosa y los resultados en extenso se muestran en el manuscrito presentado a continuación.

8.1.2 Presentación de manuscrito

J Ind Microbiol Biotechnol
DOI 10.1007/s10295-009-0589-9

ORIGINAL PAPER

ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate

José Utrilla · Guillermo Gosset · Alfredo Martínez

Received: 20 February 2009 / Accepted: 28 April 2009
© Society for Industrial Microbiology 2009

Abstract A derivative strain of *Escherichia coli* MG1655 for D-lactate production was constructed by deleting the *pfkB*, *adhE* and *frdA* genes; this strain was designated "CL3." Results show that the CL3 strain grew 44% slower than its parental strain under nonaerated (fermentative) conditions due to the inactivation of the main acetyl-CoA production pathway. In contrast to *E. coli* B and W3110 *pfkB* derivatives, we found that the MG1655 *pfkB* derivative is able to grow in mineral media with glucose as the sole carbon source under fermentative conditions. The glycolytic flux was 2.8-fold higher in CL3 when compared to the wild-type strain, and lactate yield on glucose was 95%. Although a low cell mass formed under fermentative conditions with this strain (1.2 g/L), the volumetric productivity of CL3 was 1.31 g/L h. In comparison with the parental strain, CL3 has a 22% lower ATP/ADP ratio. In contrast to wild-type *E. coli*, the ATP yield from glucose to lactate is 2 ATP/glucose, so CL3 has to improve its glycolytic flux in order to fulfill its ATP needs in order to grow. The *aceF* deletion in strains MG1655 and CL3 indicates that the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex is functional under glucose-fermentative conditions. These results suggest that the pyruvate to acetyl-CoA flux in CL3 is dependent on PDH activity and that the decrease in the ATP/ADP ratio causes an increase in the flux of glucose to lactate.

Keywords D-Lactate · *Escherichia coli* · ATP · Glycolytic flux

Introduction

D-Lactate demand has increased as consequence of its use in biopolymer applications. This compound can be transformed into a polymer that can be used as a substitute for oil-derived plastics and has the advantage of being biodegradable. The properties of polylactides can be controlled by using different proportions of each of the two lactate isomers [15]. Lactate can be produced in fermentative processes by bacteria using glucose as a raw material. Lactic acid bacteria have been used for this purpose; however, complex nitrogen sources are needed to obtain elevated productivities [14]. *Escherichia coli* is able to grow in mineral media under fermentative conditions, and it produces D-lactate as part of a mixture of products [2]. With the aim of increasing lactate production, metabolically engineered strains of *E. coli* have been generated and studied. The most commonly used strategy for strain generation involves inactivation of the pyruvate formate lyase (*pfl*) [5, 16, 21]. Under anaerobic conditions, 45% of the pyruvate flux is channeled through PFL [3]; acetyl-CoA and formate are produced by this enzyme. The *pfl* mutants can produce lactate as the main fermentation product, showing high sugar-to-lactate conversion yields, but their growth capacity is drastically hindered as a consequence of the limited flux to acetyl-CoA [16, 22]. These previous studies were done using derivatives of the *E. coli* strains W3110 and B. W3110 derivatives display poor growth in mineral media with glucose as the sole carbon source, so lactate productivities are low [16]. *E. coli* B derivatives engineered for D-lactate production rapidly ferment 10% (w/v) glucose but

J. Utrilla · G. Gosset · A. Martínez (✉)
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de
México, Apdo. Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico
e-mail: alfredo@ibt.unam.mx

J. Utrilla
e-mail: utrilla@ibt.unam.mx

complex media are required. A metabolic evolution strategy has been used to improve those strains, achieving high lactate yields and productivities of up to 2.88 g/L h in mineral media [7, 13, 17, 20, 21].

In this study we developed a D-lactate-producing strain derived from MG1655 that converts glucose to D-lactate with a 95% yield and the highest productivity reported so far in an unevolved strain. The ATP/ADP ratio, the pyruvate dehydrogenase contribution to acetyl-CoA formation, and the initial rate of glucose transport were studied in order to understand the high glycolytic flux present in MG1655 *ApflB AdhE AfrdA* (Fig. 1).

Materials and methods

Organisms and culture conditions

Escherichia coli MG1655 was used as the parental strain. The CL3 strain was constructed by deleting the *pflB*, *adhE* and *frdA* genes (Table 1). Deletion of *pflB* was done as previously reported [10]. Deletions of *adhE*, *frdA* and *aceF* were done with a chromosomal gene inactivation method using PCR products [4]. Primers were designed to amplify FRT-Kan-FRT from pKD4 or FRT-cat-FRT from pKD3 with 40–50 nucleotides homologous to the chromosome

sequence in order to inactivate the target genes. All antibiotic markers were removed for the CL3 strain. Batch fermentations were performed employing a modified mineral AM1 medium [13] named AM2, supplemented with 40 g/L of glucose (pH adjusted to 7.0 with 2 N KOH), and (per liter) 2.63 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.87 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.0 mL $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 M), 1.5 mL trace element solution, 1.0 mL KCl (2 M), 1.0 mL betaine HCl (1 M), and 100 mg citric acid. The trace element solution contained (per liter) 1.6 g FeCl_3 , 0.2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g CuCl_2 , 0.2 g $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g Na_2MoO_4 , 0.05 g H_3BO_3 and 0.33 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Solid anaerobic cultures were carried out in anaerobic jars under a CO_2 atmosphere using a Gas Pak kit (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). M9 mineral medium [12] plates supplemented with glucose 2 g/L or a mixture of glucose 2 g/L and acetate 1 g/L were used; per liter: 6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl and 0.5 g NaCl. The following components were sterilized by filtration and then added (per liter of final medium): 2 mL of 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL of 0.1 M CaCl_2 , 1 mL of 1 mg/mL thiamin HCl. Cultures were carried out in fleaker mini-fermentors [1] containing 200 mL of AM2 media, without aeration, at 37 °C, pH 7, 100 rpm and with 0.05 g/L of dry cellular weight as initial inoculum. pH was kept constant by automatically adding KOH 2 N. Resazurin (1 µg/mL), a nontoxic redox indicator, became colorless in less than 1 h

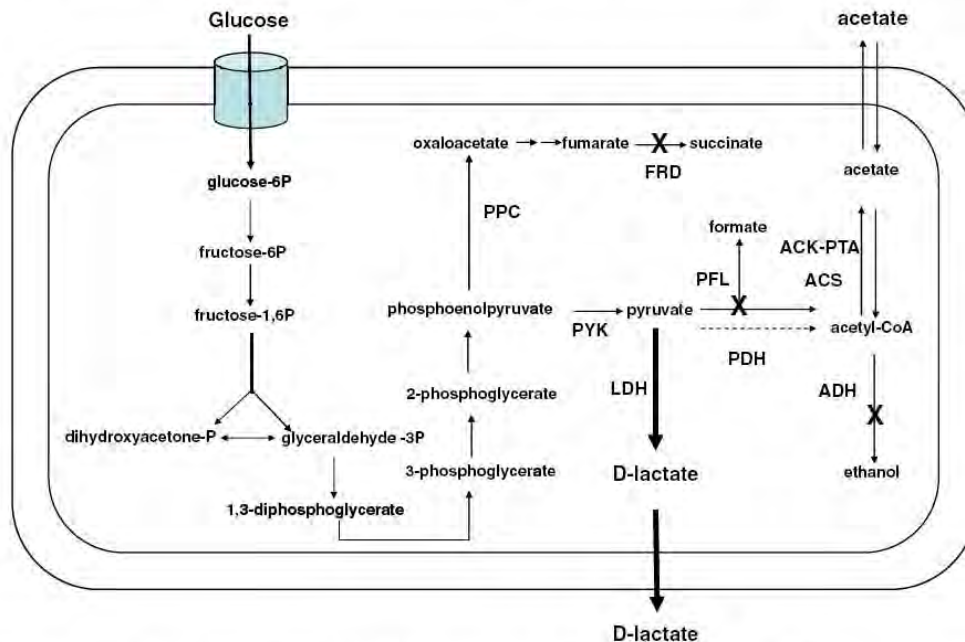


Fig. 1 Glucose to D-lactate metabolism in CL3. Deletions of competing pathways are marked with "X." ACS, acetyl-CoA synthetase; ACK, acetate kinase; ADH, alcohol dehydrogenase; FRD, fumarate reduc-

tase; LDH, lactate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PFL, pyruvate formate lyase; PPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PTA, phosphotransacetylase; PYK, pyruvate kinase

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strain	Relevant genotype	Source
<i>MG1655</i>	Wild type	Laboratory stock (this strain came from Dr. Blattner's laboratory, and shows no growth defects under anaerobic conditions)
<i>CL3</i>	<i>MG1655 ΔpflB ΔadhE ΔfrdA</i>	This work
<i>CL3 aceF</i>	<i>CL3 ΔaceF::cat</i>	This work
<i>MG1655 aceF</i>	<i>MG1655 ΔaceF::cat</i>	This work

when wild-type *E. coli* strains were cultivated under the abovementioned conditions. These conditions were maintained during the exponential and stationary phases of the fermentations. Although the cultures were not sparged with an inert gas in the headspace of the mini-fermentors, the behavior described above indicates that anaerobic conditions were maintained during most of the time covered by the batch cultures (from 24 to 30 h). All fermentations were carried out in triplicate (average and standard deviations are shown in plots and tables).

Analyses

Growth was determined spectrophotometrically as the optical density at 600 nm (DU-70, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) and converted to dry cell weight per liter using a calibration curve (1 optical density = 0.37 g_{DCW}/L). Samples were centrifuged and the cell-free culture broth was frozen until analysis. Glucose, ethanol, acetic, formic, succinic, lactic, and pyruvic acids were determined by HPLC analysis (Waters U6 K, Millipore Co., Milford, MA, USA), using an Aminex HPX-87H ion exclusion column (300 × 7.8 mm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), with a 5.0 mM H₂SO₄ solution used as the mobile phase (0.5 mL/min) at 60 °C, and with a photodiode array detector at 210 nm (Model 996, Waters, Millipore Co.) and a refractive index detector (Model 2410, Waters, Millipore Co.).

Measurements of the intracellular ATP and ADP concentrations

To measure the ATP/ADP ratio, a nucleotide extraction was performed using hot phenol, as reported by Koebmann et al. [9]. The ATP and ADP concentrations were then measured using the ENLITEN[®] ATP assay (PROMEGA, Madison, WI, USA), as recommended by the manufacturer. The concentration of ATP was measured first, and then the ADP content in the same sample was converted to ATP by adding 2 U of pyruvate kinase, 1 mM phosphoenolpyruvate (PEP), 5 mM KCl and 50 mM MgCl₂, and the concomitant increase in luminescence was recorded.

Measurement of the initial rates of glucose transport

Cells were harvested from fermentations in the mid log phase (5,000×g for 10 min at 4 °C), cooled on ice, washed in 1× AM2 salts, and dissolved in the same medium without sugars at an OD₆₀₀ of 0.5. Since the cells were kept on ice before the transport experiments, metabolic activity was reduced, so it is considered that the amount of sugar transport protein is the same as that present during growth under fermentative conditions. For the [¹⁴C]-glucose uptake assays, 540 μL of cell suspension were incubated for 15 min at 37 °C, and then the reaction was started by adding 60 μL of [¹⁴C]-glucose (0.5 mM, 5 mCi/mmol). The reaction was kept at 37 °C with shaking, and 50 μL samples were taken at 0, 1, 2, 3, 5, and 10 min intervals. Samples were filtered immediately through membrane filters (pore size 0.22 μm) and washed three times with AM2 salts. Filters were dried and placed in vials with 5 mL of Ecolite scintillation cocktail (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA). Radioactivity was measured in a scintillation counter (Beckman LS6000IC, Fullerton, CA, USA). Protein was measured with the Folin phenol reagent [11]. The [¹⁴C]-glucose uptake rates were calculated from the initial linear data in a plot of intracellular [¹⁴C]-glucose versus time. A Student's *t*-test with a *P* value of ≤0.05 was applied to each set of data in order to determine statistical differences in [ATP]/[ADP] ratios and glucose transport rates.

Results

Fermentation performance

Batch fermentations were carried out in AM2 mineral medium in controlled-pH mini-fermentors. Growth rate, biomass yield, glucose consumption rate, and fermentation products were measured. Figure 2 and Table 2 show that the CL3 strain grew at 0.24 h⁻¹, 44% slower than the parental strain MG1655 (0.44 h⁻¹). The parental strain produced up to 3 g/L of dry cell weight and consumed 43 g/L of glucose in 24 h. MG1655 showed

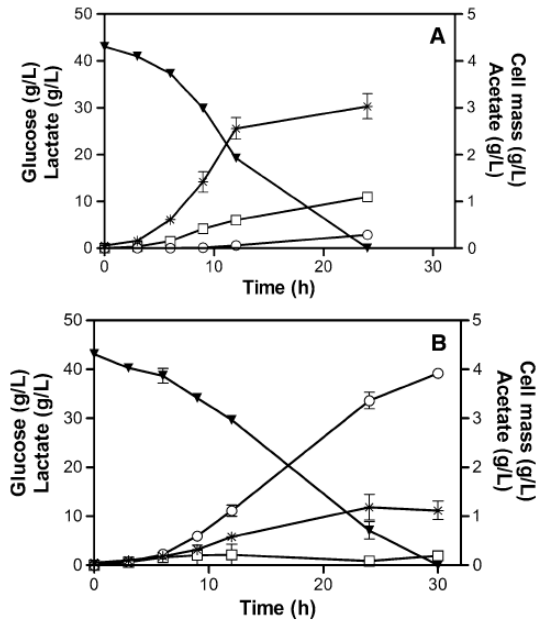


Fig. 2 Fermentation of 4% glucose by MG1655 (A) and CL3 (B). Filled inverted triangles, glucose; asterisks, cell mass; circles, lactate; squares, acetate

mixed acid fermentation, and the main products were acetate, formate, ethanol, lactate and succinate (Table 2). CL3 had a 61% lower final cell concentration than MG1655, but it consumed the 43 g/L of glucose in less than 30 h (Fig. 2). As a consequence of the fermentation pathway deletion, lactate yield was 95% (g/g) in CL3. No formate, succinate or ethanol were detected in the fermentation broth, and less than 1.0 g/L acetate was produced by CL3 at the exponential phase, which was partially consumed during the stationary phase. During the exponential growth phase, the specific glucose consumption rate was 2.8-fold higher in CL3 than in the parental strain (Table 2). In addition, the specific lactate production rate was 55-fold higher in CL3. The measured volumetric productivity of lactate for CL3 was 1.31 g/L h.

Table 2 Specific growth rate (μ), specific glucose consumption rate (q_s), specific lactate production rate (q_p), fermentation products, lactate yield on glucose ($Y_{p/s}$), ATP/ADP ratio, and volumetric productivity (Q_{vol}) for MG1655 and CL3 strains

Strain	μ (h ⁻¹)	q_s (g/g h)	q_p (g/g h)	Lactate (g/L) ^a	Acetate (g/L) ^a	Formate (g/L) ^a	Ethanol (g/L) ^a	Succinate (g/L) ^a	$Y_{p/s}$ (g/g)	ATP/ADP (-)	Q_{vol} (g/L h)
MG1655	0.44 (0.018)	2.33 (0.20)	0.09 (0.05)	2.88	11.39	10.19	5.26	2.20	0.083	0.873 (0.143)	0.305
CL3	0.24 (0.004)	6.43 (0.36)	4.92 (0.63)	39.20	0.47	ND	ND	ND	0.95	0.685 (0.039)	1.31

Where appropriate, values in parentheses indicate the SD

ND, not detected

^a Maximum amount of product detected

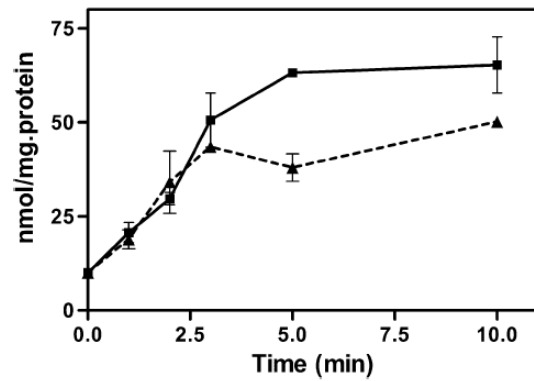


Fig. 3 Glucose transport rate kinetics for MG1655 (straight line) and CL3 (dotted line)

Measurement of glucose transport capacity

In order to investigate if the increase in the specific glucose consumption rate showed by CL3 had an effect on the rate of glucose transport, and considering that it is the first step of glycolysis, the glucose transport rate was measured (Fig. 3). A Student's *t*-test (P value of ≤ 0.05) showed that the glucose transport rates for CL3 (11.2 ± 0.46 nmol_{GLC}/mg_{PROTEIN} min) and MG1655 (10.6 ± 0.21 nmol_{GLC}/mg_{PROTEIN} min) were not significantly different. These results show that the glucose transport capacity of CL3 is not higher than the parental strain under the evaluated conditions, so glucose transport is not a limiting step in glucose consumption for the MG1655 strain.

ATP/ADP ratio

Homolactic fermentation from glucose yields only 2 ATP/mol of glucose, compared to mixed fermentation in wild-type *E. coli* that yields 3 ATP/glucose. The slower growth rate displayed by CL3 and the observed glycolytic flux increase may be attributed to a lower ATP pool [9, 22]. Table 2 shows that the ATP/ADP ratio in CL3 was 22% lower than the ratio in the wild-type strain. The Student's

t-test shows that this difference is statistically significant (*P* value of ≤ 0.05).

PDH contribution to acetyl-CoA formation in CL3

In order to quantify the contribution of pyruvate dehydrogenase (PDH) complex activity to acetyl-CoA formation from pyruvate in CL3, the gene *aceF* was deleted in both the MG1655 and the CL3 strains (Table 1, Fig. 1). Phenotypic analyses were carried out in anaerobic jars using solid mineral media with glucose or glucose and acetate mixtures (see “Culture conditions” for details). Results showed that *aceF* deletion caused acetate auxotrophy under aerobic conditions for both strains (MG1655 and CL3). Under anaerobic conditions, MG1655 $\Delta aceF$ was able to grow without acetate supplementation, but CL3 $\Delta aceF$ was not able to grow in glucose as the sole carbon source. These results indicate that PDH contributes to acetyl-CoA formation in CL3 under fermentative conditions.

Discussion

In contrast to other D-lactate production strains reported elsewhere, CL3 shows several advantages: (a) a growth rate of 0.24 h^{-1} and a maximal cell concentration of 1.2 g/L ; (b) a 95% lactate yield from glucose; (c) less than 1 g/L of acetate as byproduct; and (d) a high glycolytic flux. Under the evaluated conditions, CL3 achieved a volumetric productivity of 1.31 g/L , which is the highest reported for an unevolved strain of *E. coli* in batch fermentation. The effects of *pfl* knockout on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and production yields under microaerobic conditions have been previously studied using *E. coli* BW25113 derivatives [22]. Results show that the ATP/AMP ratio in the *pfl* knockout is 44% lower compared to the progenitor strain, and glycolytic flux and the activity levels of glycolytic pathway enzymes are increased. It has been proposed that the ACK-PTA pathway may be active in the direction that produces acetyl-CoA from acetate while consuming 1 mol of ATP (see Fig. 1) [22]. The acetyl-CoA pool under microaerobic conditions was the same as in the parental strain, but cell yield was lowered. Low succinate formation was also found, even upon supplying CO_2 , which indicates that in the phosphoenol pyruvate node the pyruvate kinase reaction showed a higher flux than phosphoenol pyruvate carboxylase; hence the ATP demand is favored over other reactions, favoring homolactic fermentation [22].

In contrast to aerobic conditions, where pyruvate dehydrogenase (PDH) is more active, in our experiments the only pyruvate dissimilation pathway is D-lactate fermentation. It has been demonstrated that a low ATP/ADP ratio

increases glycolytic flux under aerobic conditions [9]. The lower ATP/ADP ratio found in CL3 when compared to the parental strain, and the conversion of acetate to acetyl-CoA by the ACK-PTA pathway, as has previously been proposed for *pfl* mutants, may be the causes of the 2.8-fold increase in the specific glucose consumption rate shown by CL3. The slow growth rates and reduced cell yields of previously reported *pfl* mutants of *E. coli* have been attributed to the lack of flux of pyruvate to acetyl-CoA and to the lower ATP yield in homolactic strains [16, 22]. Using *E. coli* B, it has previously been shown that there is $\sim 5\%$ residual PDH activity under anaerobic conditions relative to aerobic culture conditions [18]. In addition, it has been shown that PDH can carry out the pyruvate to acetyl-CoA conversion in *pfl* mutants that have evolved to produce ethanol with the native *E. coli* pathway [8, 18]. These previous results show the capacity of PDH to carry out pyruvate to acetyl-CoA conversion, even under nonaerobic conditions. Our results show that the residual activity of PDH under anaerobic conditions, possibly due to incomplete transcription repression, may be responsible for acetyl-CoA formation in CL3; this characteristic may constitute the main phenotypic difference between MG1655 derivatives and other parental strains used in the development of lactic acid-producing *E. coli* strains.

The transport rate measurements experiments revealed that the low ATP/ADP ratio has no influence on the *E. coli* glucose transport capacity; hence, the higher glucose consumption rate shown by CL3 may be dependent on higher activities of glycolytic enzymes [22], and may perhaps be due to changes in feedback regulation, as PFK and PYK enzymes are susceptible to ATP, phosphoenol pyruvate or pyruvate inhibition [6].

The production of lactate by *pfl* mutants of *E. coli* has been widely reported [13, 16, 19–22]. W3110-based biocatalysts with *pfl* and other fermentative gene deletions (*frd* and *adhE*)—strains SZ40 and SZ58—were able to produce optically pure D-lactate in mineral media with a 98% yield from glucose. However, as previously mentioned for *pfl* mutants, cell yield is drastically reduced (0.495 g/L), and so the volumetric productivity is also reduced (0.66 g/L h) [16]. Adaptive evolution has been used as a method to overcome the growth limitations resulting from *pfl* deletion. D-Lactate-producing derivatives of *E. coli* B have been developed using these approaches. Strain SZ132 was obtained using LB medium with 10% glucose. No results for the initial strain in mineral media are reported [21]. Further improvements were made by using several rounds of adaptive evolution, adding 1 mM of betaine [17] and deleting genes from the methylglyoxal bypass pathway. High lactate yields and productivities, up to 2.88 g/L h in mineral media, were reported [7, 17] for the evolved strain. Our work shows that, compared with other progenitor strains,

MG1655 has a better genetic background for D-lactate production. The glycolytic and lactate fluxes achieved by CL3 are the highest reported for an unevolved *E. coli pfl* mutant. These characteristics make CL3 a good candidate for use in D-lactate production.

Acknowledgments We thank Georgina Hernández for the HPLC analysis; Montserrat Orencio, Martín Patiño and Mario Trejo for technical support; and E. López and P. Gaytan for oligonucleotide synthesis. This work was supported by grants from UNAM (PAPIIT-DGAPA: IN220908) and the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT—SAGARPA 2004-C01-224 and CONACyT—Estado de Morelos 2007-COL-80360). J.U. held a scholarship from CONACyT.

References

1. Beall DS, Ohta K, Ingram LO (1991) Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 38:296–303. doi:10.1002/bit.260380311
2. Böck A, Sawers G (1996) Fermentation. In: Neidhardt FC et al. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, vol 1. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp 262–282
3. Clark DP (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 63:223–234. doi:10.1016/0168-6445(89)90033-8
4. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12):6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297
5. Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:259–264. doi:10.1038/sj.jim.7000195
6. Fraenkel DG (1996) Glycolysis. In: Neidhardt FC et al. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, vol 1. American Society for Microbiology Press, Washington DC, pp 262–282
7. Grabar TB, Zhou S, Shanmugam KT, Yomano LP, Ingram LO (2006) Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(–) lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 28:1527–1535. doi:10.1007/s10529-006-9122-7
8. Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT (2007) Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanogenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Appl Environ Microbiol* 73(6):1766–1771
9. Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR (2002) The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol* 184:3909–3916. doi:10.1128/JB.184.14.3909-3916.2002
10. Lara AR, Vazquez-Limón C, Gosset G, López-Munguía A, Ramirez OT (2006) Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-product during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng* 94(6):1164–1175. doi:10.1002/bit.20954
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
12. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
13. Martínez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO (2007) Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett* 29:397–404. doi:10.1007/s10529-006-9252-y
14. Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A (2004) L-(+)-lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electron J Biotechnol* 7(2):167–179
15. Tsuji F (2002) Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made polylactides: effects of L-lactide content, tacticity, and enantiomeric polymer blending. *Polymer (Guildf)* 43:1789–1796. doi:10.1016/S0032-3861(01)00752-2
16. Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO (2003) Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl Environ Microbiol* 69:399–407. doi:10.1128/AEM.69.1.399-407.2003
17. Zhou S, Grabar TB, Shanmugam KT, Ingram LO (2006) Betaine tripled the volumetric productivity of D-lactate by *Escherichia coli* strain SZ132 in mineral salts medium. *Biotechnol Lett* 28:671–676. doi:10.1007/s10529-006-0033-4
18. Zhou S, Iverson AG, Grayburn WS (2008) Engineering a native homoethanol pathway in *Escherichia coli* B for ethanol production. *Biotechnol Lett* 30:335–342. doi:10.1007/s10529-007-9544-x
19. Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO (2003) Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(–)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Appl Environ Microbiol* 69:2237–2244. doi:10.1128/AEM.69.4.2237-2244.2003
20. Zhou S, Shanmugam KT, Yomano LP, Grabar TB, Ingram LO (2006) Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. *Biotechnol Lett* 28:663–670. doi:10.1007/s10529-006-0032-5
21. Zhou S, Yomano LP, Shanmugam KT, Ingram LO (2005) Fermentation of 10% (w/v) sugar to D-lactate by engineered *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett* 27:1891–1896. doi:10.1007/s10529-005-3899-7
22. Zhu J, Zhimizu K (2004) The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:367–375. doi:10.1007/s00253-003-1499-9

8.1.3 Determinación de metabolitos intracelulares

Como se mencionó previamente, CL3 tiene un flujo glucolítico mayor que MG1655, las modificaciones llevadas a cabo en CL3 ocasionan que el piruvato tenga que ser transformado en D-lactato para mantener el balance redox. Se realizó la determinación de la concentración intracelular de metabolitos en las cepas MG1655 y CL3 en glucosa. Dichos experimentos fueron realizados en reactores de 500 mL, utilizando 400 mL de volumen de trabajo y una concentración de glucosa de 10 g/L. Las mediciones realizadas muestran que CL3 tiene mayor concentración de metabolitos en la vía glucolítica y en la vía de las pentosas fosfato. El piruvato es un metabolito clave para ser medido, pues su principal vía de consumo en condiciones fermentativas está eliminada (Pfl). El incremento en las pozas de los metabolitos puede estar favorecido por la acumulación de piruvato en CL3, ya que la actividad de la lactato deshidrogenasa de *E. coli* es activada tanto alostérica como transcripcionalmente por piruvato (Jiang *et al.*, 2001), para sostener la elevada producción de lactato que presenta la cepa CL3 debe ser necesario activar dicha actividad enzimática. La figura 8.1 muestra las relaciones de concentración de metabolitos en CL3/MG1655. El aumento en las pozas de los metabolitos en la cepa CL3, comparada con la cepa MG1655 es conservado para todos los metabolitos medidos con excepción de la glucosa 1-fosfato y de la acetil-CoA. La acumulación de G6P, FBP y piruvato comparada con la cepa silvestre fue previamente reportada para mutantes en *pflB* (Zhu y Shimizu, 2004). La relación acetil-CoA/CoA en CL3 está reducida al 50% con respecto a la encontrada en MG1655. Esto es de esperarse por la eliminación de *pflB* en CL3, la menor poza de acetil-CoA podría estar limitando el crecimiento de CL3. El aumento de metabolitos encontrados en el presente experimento ha sido explicado cómo una respuesta celular a la necesidad de acumulación de piruvato para la activación de la lactato deshidrogenasa. De tal forma que existe una respuesta en el resto de los metabolitos de las vías centrales de carbono, lo que permitiría compensar y así mantener la dirección del flujo glucolítico. Las reacciones de FBP a PEP en la glucólisis son reversibles y se ha encontrado que

no están fuertemente direccionadas hacia la formación de PEP, de tal manera se ha propuesto que un incremento en la poza de los metabolitos de la parte baja de la vía debe ser compensado en la parte alta. Lo anterior para mantener la direccionalidad de la misma (Bennet et al., 2009).

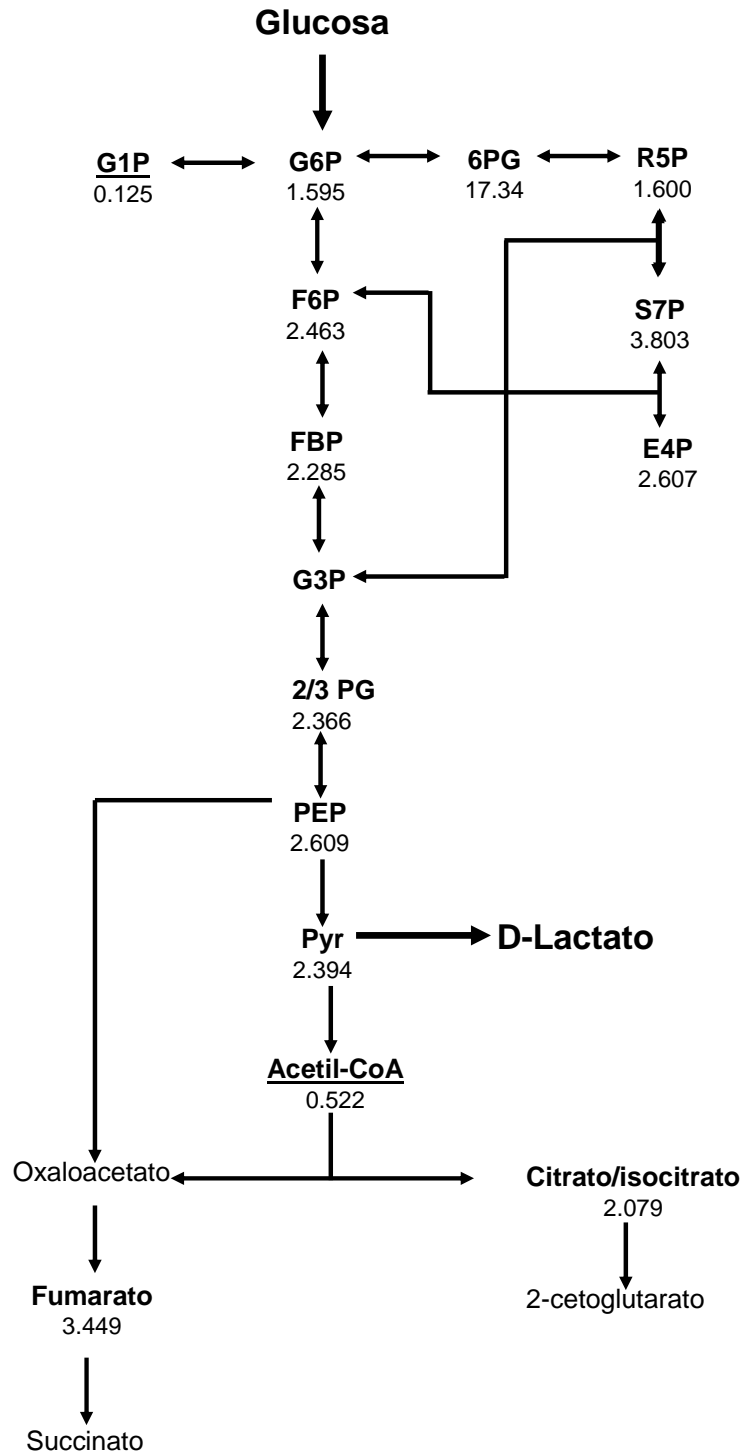


Fig. 8.1 Concentración de metabolitos intracelulares en las cepas MG1655 y CL3. Los números indican la relación de las concentraciones entre las cepas CL3/MG1655

8.2 Segunda sección: resultados en xilosa

8.2.1 Caracterización cepas homolácticas en xilosa

Como se mencionó en los antecedentes, se reportó previamente que las cepas carentes de la piruvato formato liasa (Pfl) son incapaces de crecer en medio mineral, en condiciones anaeróbicas, con xilosa como única fuente de carbono (Hasona *et al.*, 2004). Se caracterizó la cepa CL3 en AM2-xilosa y se encontró que, contrastando con lo reportado anteriormente, son capaces de crecer a una velocidad baja, de 0.08 h^{-1} . Comparado con lo obtenido en glucosa, en CL3 se tiene una velocidad de crecimiento menor en un 63% y una velocidad específica de consumo de azúcar menor en un 81% cuando se utiliza xilosa como única fuente de carbono. La reducción en la velocidad de crecimiento es del 68% comparada con la cepa silvestre en xilosa. Dicha reducción es más drástica que la encontrada para la misma cepa creciendo en glucosa. La reducción en la velocidad de crecimiento y en la velocidad de consumo de xilosa limita la productividad volumétrica de la fermentación a solo $0.375 \text{ g}_{\text{Lact}}/\text{L} \cdot \text{h}$. Esto es solo el 29% de lo obtenido en glucosa en las mismas condiciones ($1.31 \text{ g}_{\text{Lact}}/\text{L} \cdot \text{h}$). Por tal motivo, se decidió continuar trabajando en la modificación de la cepa CL3 para una conversión a mayor velocidad de xilosa a D-lactato (Tabla 8.1).

Tabla 8.1 Comparación de parámetros cinéticos entre las cepas CL3 (MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE$) y su progenitora (MG1655)

Parámetro	Glucosa		Xilosa	
	MG1655	CL3	MG1655	CL3
μ (h^{-1})	0.44	0.24	0.28	0.08
X_{max} (g_{DWC}/L)	2.8	1.23	2.08	1.12
q_s ($g_{azúcar}/g_{DWC}\cdot h$)	2.33	6.43	0.98	1.2
q_p ($g_{Lact}/g_{DWC}\cdot h$)	0.09	4.92	0.037	1.4
Rendimiento ($g_{Lact}/g_{azúcar}\%$)	40	95	11	95

8.2.2 Eliminación del sistema de transporte *xyIFGH*

Como se mencionó en los antecedentes, el uso de un transportador de xilosa dependiente de ATP (tipo ABC), que utiliza una mol de ATP por cada mol de xilosa internalizada, es una limitante para el crecimiento de las cepas mutantes en *pfl* en condiciones fermentativas (Hasona *et al.*, 2004). Para tratar de aumentar el rendimiento de ATP por mol de xilosa, se llevó a cabo la eliminación de los genes que codifican para dicho transportador (*xyIF*, *xyIG*, *xyIH*) en la cepa CL3 y se obtuvo la cepa denominada JU01 (*E. coli* MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frd \Delta xyIFGH::Km$). La cepa JU01 se caracterizó en medio AM2-xilosa 40 g/L y se encontró que crece a una velocidad de $0.12 h^{-1}$, 50% más rápido que la cepa CL3. Esto sugiere que se utiliza un sistema alternativo de transporte de xilosa no dependiente de ATP, tal como XylE o AraE, entre otros, lo que permitiría un mayor rendimiento de ATP por mol de xilosa metabolizada y esto explicaría el aumento en la velocidad de generación de biomasa. Así mismo, la cepa JU01 consumió 40

g/L de xilosa en un tiempo menor a 72 horas (Tabla 8.2) aumentando la productividad volumétrica en un 34% en comparación con CL3. La cepa JU01 fue capaz de crecer y consumir xilosa sin limitación aparente en el transporte de la pentosa. El sistema de transporte XylFGH es un sistema de alta afinidad (K_m 0.2 – 4 μ M) por la xilosa, el simporter XylE tiene una menor afinidad que el anterior, aunque está en el orden de los micromoles (K_m 63-169 μ M). En los experimentos anteriores las concentraciones de xilosa utilizadas fueron de 40 g/L (0.26 M), por lo tanto la menor afinidad de XylE o de otro sistema de transporte utilizado para la xilosa no es un factor determinante en la capacidad de utilización de la pentosa. El transporte de xilosa se abordará de nuevo en la sección 8.2.4 de la presente tesis.

Tabla 8.2 Comparación de parámetros cinéticos durante la fase exponencial de crecimiento, CL3 (MG1655 Δ *pfIB* Δ *adhE* Δ *frdA*) y JU01 (MG1655 Δ *pfIB* Δ *adhE* Δ *frdA* Δ *xylFGH::Km*)

Parámetro	CL3	JU01
μ (h^{-1})	0.08	0.12
X max (g_{DWC}/L)	1.12	1.09
qs ($g_{azúcar}/g_{DWC}\cdot h$)	1.2	1.4
qp ($g_{Lact}/g_{DWC}\cdot h$)	1.4	1.7
Qvol ($g_{Lact}/g_{DWC}\cdot h$)	0.40	0.53
Rendimiento ($g_{Lact}/g_{azúcar}\%$)	95	95

8.2.3 Evolución adaptativa

Se sometió a la cepa JU01 a un proceso de evolución adaptativa con el objetivo de aislar una mutante que fuera capaz de crecer más rápidamente en xilosa como única fuente de carbono y convertirla a D-lactato con una productividad más elevada de la que se tiene con JU01. La evolución adaptativa se llevó a cabo en

dos etapas. En la primera etapa se hicieron 9 transferencias en medio AM2 con 40 g/L de xilosa. En esta etapa no se logró incrementar significativamente la velocidad de crecimiento ni la producción de ácidos orgánicos evaluada a través del consumo de base utilizada para controlar el pH en el minifermentador. En la segunda etapa, se decidió utilizar una concentración de 120 g/L de xilosa para aumentar la presión de selección y así obtener mutantes con mejor capacidad de crecer en xilosa en concentraciones totales de azúcares similares a las encontradas en hidrolizados de bagazo de caña (Martínez *et al.*, 2001). A través de este proceso de evolución adaptativa (figura 8.2), se aisló una cepa denominada JU15 (MG1655 $\Delta pflB$ $\Delta adhE$ $\Delta frdA$ $\Delta xyIFGH::Km$ evolucionada). La cepa JU15 no fue capaz de completar la fermentación de 120 g/L de xilosa que se había propuesto como meta del proceso de evolución adaptativa. Buscando lograr el objetivo mencionado anteriormente se llevó a cabo una segunda ronda de evolución. Partiendo de la cepa JU15, se hicieron 17 pases en 23 días, de los cuales se aisló y caracterizó la cepa JU32. Durante esta etapa de evolución no se observó ninguna ganancia en la cantidad de biomasa obtenida, ni se aumentó la velocidad de crecimiento, así mismo no se logró completar la fermentación de 120 g/L de xilosa. La cepa JU32 presentó una velocidad de crecimiento similar a JU15 (0.19 h^{-1}) y no redujo el tiempo de fermentación de 40 g/L de xilosa. Esto permite sugerir que con lo obtenido previamente en la cepa JU15 probablemente se está llegando al límite de lo que el sistema de evolución adaptativa permite alcanzar en las condiciones empleadas, y que se necesitan otras estrategias para aumentar la capacidad de las cepas para metabolizar la xilosa. Habiendo logrado una mejoría sustancial en la capacidad de las cepas para convertir la xilosa en D-lactato, y para fines del presente proyecto se decidió utilizar a la cepa JU15 para su caracterización.

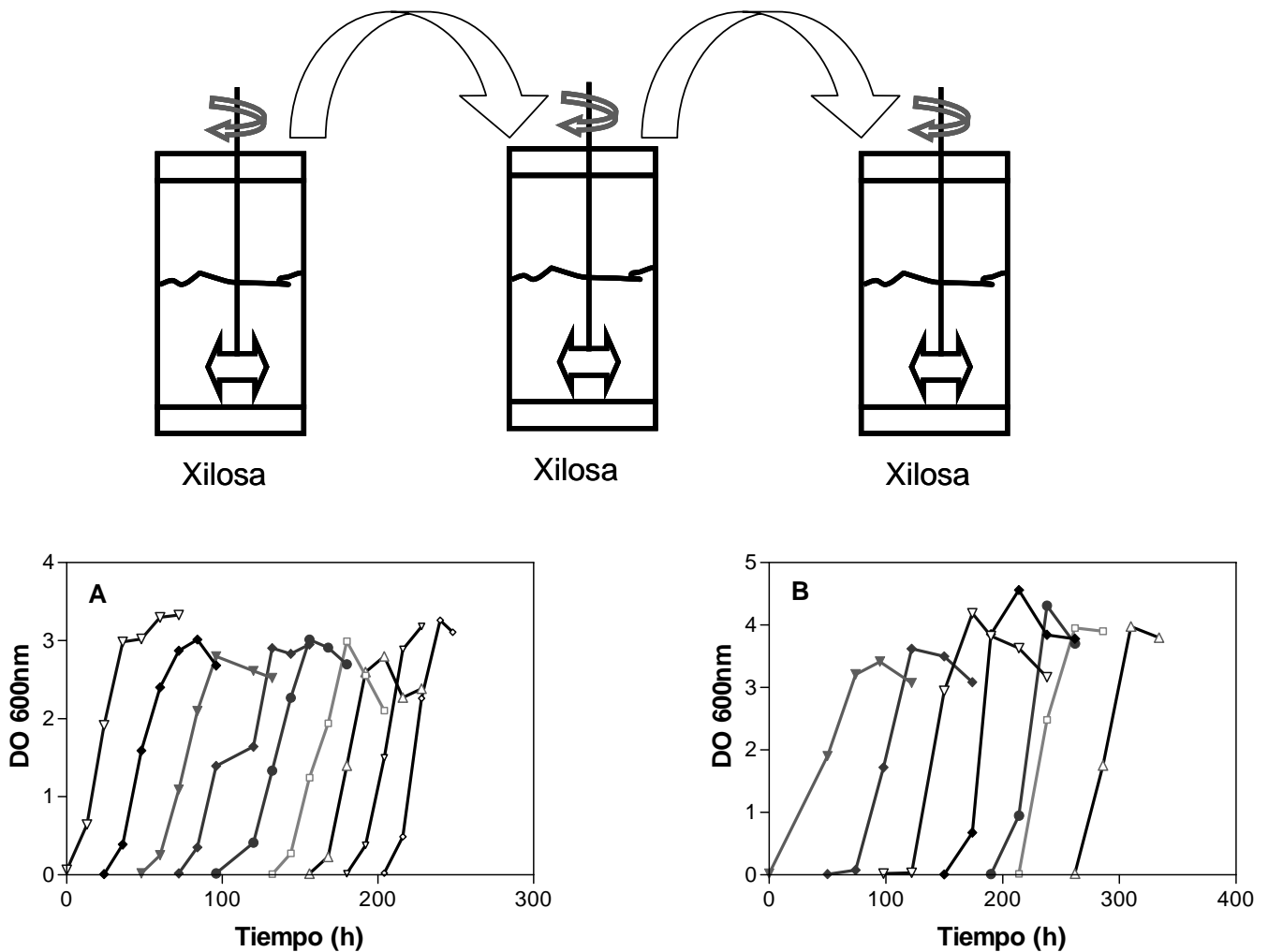


Fig. 8.2 Esquema de la estrategia utilizada para la evolución adaptativa. A) Primera etapa de evolución con 40 g/L de xilosa B) segunda etapa de evolución con 120 g/L de xilosa

8.2.3 Resultados de la conversión de xilosa en D-lactato

Las cepas generadas fueron caracterizadas en su capacidad de conversión de xilosa a D-lactato. La figura 8.3 compara la velocidad de crecimiento y la velocidad específica de consumo de xilosa de las cepas MG1655, CL3, JU01 y JU15. Como se mencionó previamente, la eliminación de las vías fermentativas, específicamente de Pfl, en la cepa homoláctica CL3 causa una reducción del 63% en la velocidad de crecimiento comparada con la cepa silvestre MG1655.

Mediante la eliminación del sistema de transporte dependiente de ATP (*xyIFGH*), se logró aumentar la velocidad de crecimiento en un 50% en la cepa JU01. La cepa JU15, aislada a partir del proceso de evolución adaptativa, logró incrementar un 50% su velocidad de crecimiento con respecto a JU01 y con respecto a CL3 se incrementó 1.25 veces. En cuanto a la velocidad específica de consumo de xilosa, se encontró que las variaciones entre las cepas MG1655, CL3 y JU01 no son significativas. Sin embargo, la cepa JU15 incrementó al doble su velocidad específica de consumo de xilosa comparada con las demás cepas. La productividad volumétrica de D-lactato con la cepa JU15 fue de 0.75 g/L y el rendimiento de producción de D-lactato en JU15 es 95%, como lo encontrado para las cepas CL3 y JU01. Usando HPLC con una columna quiral se determinó que el D-lactato producido con JU15 es ópticamente puro.

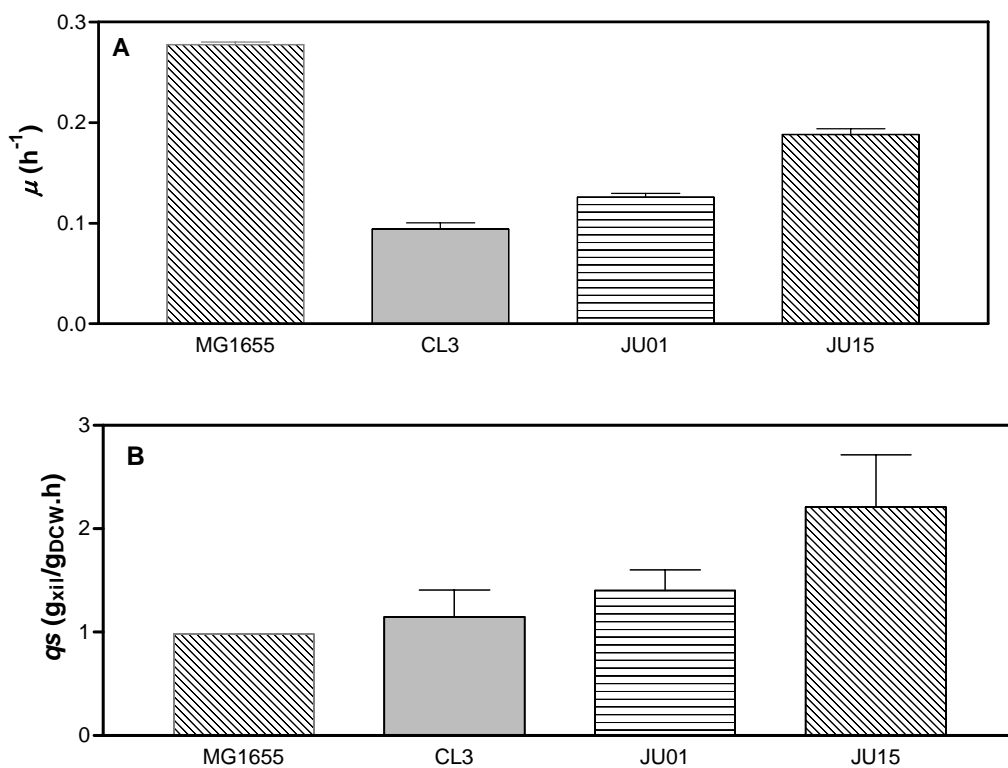


Fig 8.3. A) Velocidad de crecimiento y B) velocidad específica de consumo de xilosa de las cepas MG1655, CL3, JU01 y JU15.

Durante el desarrollo del presente proyecto la cepa JU15 fue empleada en un estudio para la conversión de hidrolizados de la fracción hemicelulósica de bagazo de caña (Trujillo-Martínez 2008). Mediante evolución llevada a cabo haciendo pases para adaptar a la cepa a un medio con una composición similar a los encontrados en los hidrolizados de la fracción hemicelulósica, se obtuvo una cepa derivada capaz de tolerar concentraciones elevadas (aprox. 20 g/L a pH 7.0) de acético a la que se nombró JU15A. Dicha cepa fue utilizada para la fermentación de hidrolizados de la fracción hemicelulósica de bagazo de caña obtenidos en la planta piloto del IBt-UNAM. La cepa JU15A mostró la capacidad de fermentar todos los azúcares presentes en los hidrolizados (Xilosa 59 g/L, glucosa 8 g/L, arabinosa 3 g/L) con rendimiento del 100% de conversión y una productividad de 0.5 g/L.h en un proceso lote a un volumen de 10L. De la misma manera, la cepa JU15A fue modificada para la producción de etanol llevando a cabo la eliminación del gen que codifica para la lactato deshidrogenasa (*ldhA*) y la inserción de los genes *pdC* y *adhII* de *Zymomonas mobilis* (Fernández-Sandoval 2009). A la cepa carente de *ldhA* se le integró en cromosoma el gen que codifica para la lactato deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*, esta cepa nombrada LL26 es capaz de convertir la xilosa a L-lactato con la misma velocidad que JU15 para D-lactato (Leal, 2010). El diseño original de la cepa JU15, así como sus derivadas, fueron protegidos en la solicitud de patente presentada al Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial titulada: "Cepas de *Escherichia coli* modificadas por ingeniería metabólica para la producción de compuestos químicos a partir de lignocelulosa hidrolizada, pentosas, hexosas u otras fuentes de carbono" cuyo resumen se presenta en el anexo I.

8.2.4 Transporte de xilosa

Se decidió evaluar la sobreexpresión del gen que codifica para la permeasa de galactosa (*galP*), debido a que es factible una deficiencia en el transporte de xilosa por parte de las cepas a las que se les eliminó el transportador de xilosa de mayor afinidad (*xyIFGH*). GalP es un simporter inespecífico que se ha evaluado para el

transporte de xilosa en *E. coli* (Hernandez-Montalvo *et al.*, 2001). Se transformaron ambas cepas (JU01 y JU15) con el plásmido pCLv1GalP, que es derivado del vector pCL1920 y contiene el gen *galP* bajo el control del promotor *trc*, siendo inducible por IPTG. Se llevaron a cabo experimentos aeróbicos en matraces agitados, ya que se observó que la carga metabólica presentada por plásmidos multicopia enmascara los efectos de la expresión del gen a evaluar en condiciones anaeróbicas. Se comprobó que la sobreexpresión de *galP* no favorece incrementos significativos en la velocidad de crecimiento, ni en la velocidad de consumo de xilosa de las cepas JU01 y JU15 (datos no mostrados).

En los experimentos anteriores no se observó limitación de transporte de xilosa en la cepa JU15. Se propone medir el mismo para confirmar esta observación y caracterizar la capacidad de las cepas JU01 y JU15 (mutantes en los genes *xyIFGH*) en su transporte de xilosa.

8.2.4.1 Inactivación de *xylE*

Para evaluar la contribución del simporter XylE al transporte de xilosa se llevó a cabo su interrupción en las cepas MG1655, CL3, JU01 y JU15. En experimentos en condiciones no aireadas con xilosa 40 g/L se encontró que las cepas JU01 y JU15 redujeron su velocidad de crecimiento en 24% y 45% respectivamente. Sin embargo, fueron capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono. Estos resultados indican la presencia de transportadores inespecíficos-alternos, capaces de internalizar xilosa a la célula y que podrían estar reemplazando el papel del sistema de transporte codificado por *xyIFGH*.

8.3 Secuenciación del genoma de JU15

Se llevó a cabo secuenciación genómica comparativa de la cepa JU15 (CGS: comparative genome sequencing; Roche-NimbleGen). A través de esta

secuenciación se pueden detectar mutaciones puntuales o SNP's (Single nucleotide polymorphisms); regiones cromosomales eliminadas, así como duplicaciones de genes. Se reportaron 5 mutaciones puntuales en regiones codificantes y 26 en regiones intergénicas. En el mapa de mutaciones reportado por la compañía se encontró una región de 27.4 kb donde se muestra hibridación de la cepa de referencia (JU01) y en la cepa problema no hay hibridación, lo que podría indicar una posible eliminación de la región completa. Para confirmarlo se hizo una reacción de amplificación por PCR y en lugar de obtener un producto del tamaño esperado en un fondo silvestre se obtuvo un producto de 700 pares de bases aproximadamente, confirmando la eliminación de dicha región. Adicionalmente, se resecuenciaron la totalidad de las mutaciones reportadas, se encontró que solo uno de los cambios reportados fue verdadero. Lo que nos permite concluir que a través de la secuenciación genómica comparativa realizada se lograron detectar:

- Una eliminación de 27.4 kb
- Una mutación puntual en el gen *gatC*

En la tabla 8.3 se muestran los genes codificados en la región eliminada. Destacan los genes implicados en la respiración, tanto citocromos y grupos hemo, como los implicados en la respiración de nitratos. Así mismo se encontró la eliminación de *ompC* y de un gen que codifica para un dominio de una malato deshidrogenasa (*mgo*).

Tabla 8.3 Genes y productos eliminados en JU15

Gen	Producto
<i>insH</i>	IS5 transposase and trans-activator
<i>narP</i>	DNA regulatory system with NarQ or NarX binding response regulator in two component
<i>ccmH</i>	heme lyase, CcmH subunit
<i>ccmG</i>	periplasmic thioredoxin of cytochrome c-type biogenesis
<i>ccmF</i>	heme lyase, CcmF subunit
<i>ccmE</i>	periplasmic heme chaperone
<i>ccmD</i>	cytochrome c biogenesis protein
<i>ccmC</i>	heme exporter subunit
<i>ccmB</i>	heme exporter subunit
<i>ccmA</i>	heme exporter subunit
<i>napC</i>	nitrate reductase, cytochrome c-type, periplasmic
<i>napB</i>	nitrate reductase, small, cytochrome C550 subunit, periplasmic
<i>napH</i>	ferredoxin-type protein essential for electron transfer from ubiquinol to periplasmic nitrate reductase (NapAB)
<i>napG</i>	ferredoxin-type protein essential for electron transfer from ubiquinol to periplasmic nitrate reductase (NapAB)
<i>napA</i>	nitrate reductase, periplasmic, large subunit
<i>napD</i>	assembly protein for periplasmic nitrate reductase
<i>napF</i>	ferredoxin-type protein, predicted role in electron transfer to periplasmic nitrate reductase (NapA)
<i>yojO</i>	hypothetical protein
<i>eco</i>	ecotin, a serine protease inhibitor
<i>mgo</i>	malate dehydrogenase, FAD/NAD(P)-binding domain
<i>yojI</i>	fused predicted multidrug transport subunits of ABC superfamily: membrane component/ATP-binding component
<i>alkB</i>	oxidative demethylase of N1-methyladenine or N3-methylcytosine DNA lesions
<i>ada</i>	fused DNA-binding transcriptional dual regulator/O6-methylguanine-DNA methyltransferase
<i>apbE</i>	predicted thiamine biosynthesis lipoprotein
<i>ompC</i>	outer membrane porin protein C
<i>rcsD</i>	phosphotransfer intermediate protein in two-component regulatory system with RcsBC
<i>csB</i>	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with RcsC and YojN
<i>rscC</i>	hybrid sensory kinase in two-component regulatory system with RcsB and YojN

La mutación encontrada en *gatC* provoca el cambio de una Serina por una Leucina en el aminoácido 183 de la proteína (451 aminoácidos). Esto afecta en el dominio tipo PTSIIC y en una región transmembranal predicha. El dominio IIC de los sistemas PTS forma el canal de translocación y el sitio de unión específico para cada sustrato.

8.3.1 Efecto de los cambios a nivel genómico en el fenotipo de JU15

Para determinar la contribución de la pérdida de los genes codificados en la región antes mencionada en el fenotipo de JU15 se realizó la secuenciación del fragmento restante en JU15 y posterior eliminación de dichos genes en la cepa progenitora JU01. Una vez obtenida la cepa denominada JU01 Δ reg, se caracterizó en mini fermentadores con control de pH en medio mineral-xilosa 40 g/L y condiciones no aireadas. La velocidad de crecimiento que presentó la cepa JU01 Δ reg es similar a la de la cepa JU01, en cuanto a la velocidad de consumo de xilosa y de formación de ácidos orgánicos se encontró que es también similar a la cepa JU01 (Fig. 8.4). Lo anterior plantea que la pérdida de la región de 27.4 kb no resulta benéfica para la cepa JU01 (en relación al crecimiento no aireado en medio mineral con xilosa y la producción de lactato), y que es posible que los cambios en el fenotipo de JU15 sean resultado de otras mutaciones o la combinación de otras mutaciones con la pérdida de los genes de dicha región. Adicionalmente, se ha comprobado que la eliminación de la región de 27.4 kb no afecta el crecimiento aeróbico de JU15 y sus derivadas.

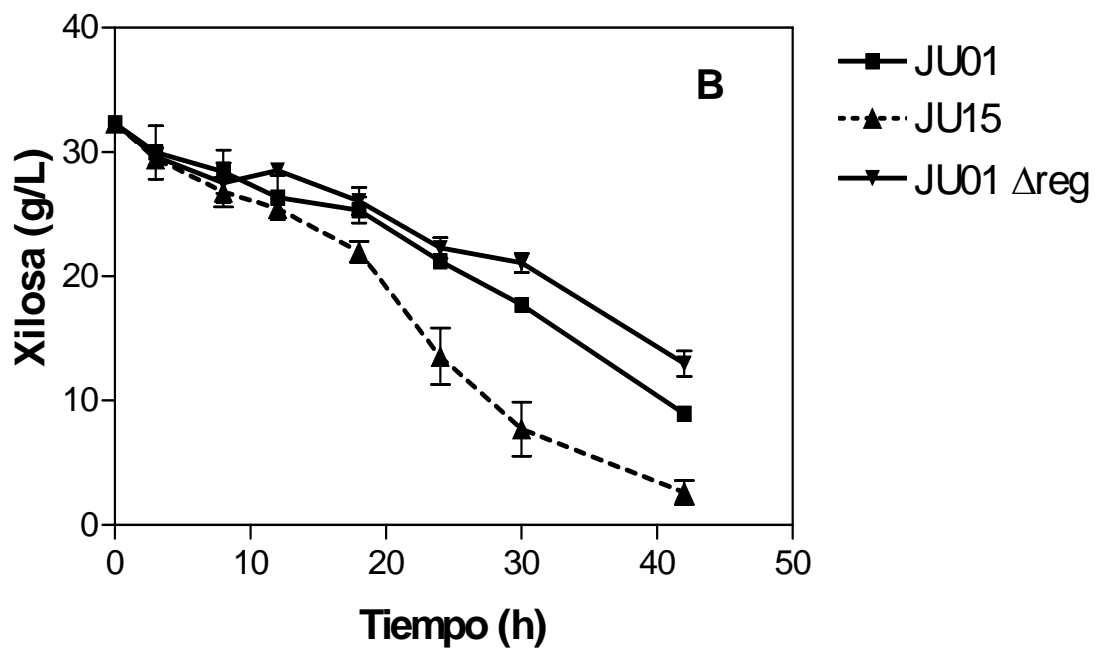
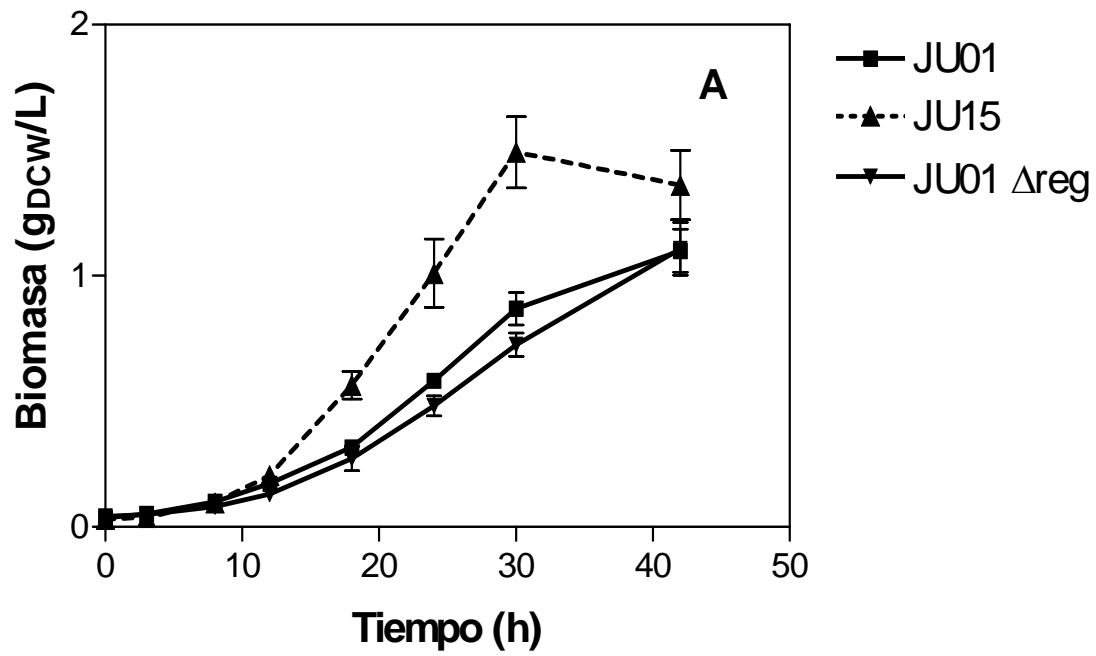


Figura 8.4 A) Cinética de crecimiento de las cepas JU01, JU15 y JU01 Δ reg, B) cinética de consumo de xilosa de las cepas JU01, JU15 y JU01 Δ reg

8.3.2 Efectos de la inactivación de *gatC*

Se llevó a cabo la inactivación de *gatC* en las cepas JU01 y JU15 y se caracterizaron sus efectos. Se encontró que (figura 8.5): a) la velocidad de crecimiento para la cepa JU15 se redujo 69 % al inactivar *gatC*; b) para la cepa JU01 la velocidad de crecimiento se redujo 14%; y c) el consumo de base utilizada para neutralizar los ácidos orgánicos en la fermentación a las 48 horas se redujo 71% y 31% respectivamente. Con los resultados antes presentados se puede inferir que *gatC* tiene un papel como transportador inespecífico de xilosa y que JU15 es más dependiente de ese transporte de xilosa que JU01. Para terminar de analizar la contribución de GatC o bien el operón *gatYZABC*, que codifica para el sistema de transporte de galactitol tipo PTS, se propone llevar a cabo la clonación de dicho operón en un vector de expresión monocopia y realizar los ensayos de complementación con el gen *gatC* mutado y silvestre. Así mismo, se plantea introducir la mutación puntual de *gatC* encontrada en JU15 en JU01 y evaluar su efecto en el fenotipo.

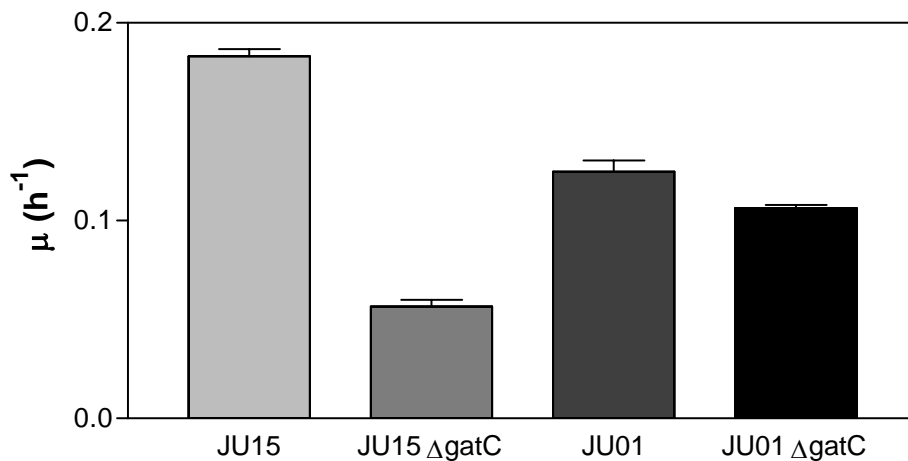


Figura 8.5 Velocidad de crecimiento de las cepas carentes del gen *gatC* comparadas con las cepas sin dicha mutación

9.- CONCLUSIONES

Se obtuvo la cepa CL3 derivada de MG1655 capaz de convertir glucosa en D-lactato con la velocidad específica más alta reportada hasta el momento para una cepa de *E. coli* que no ha sido sometida a un proceso de evolución adaptativa. La actividad residual de PDH en CL3 es la responsable de la conversión de piruvato en acetil-CoA, lo cual a su vez permite su crecimiento en condiciones anaeróbicas. La reducción de la relación ATP/ADP en CL3 comparada con MG1655 tiene un efecto positivo en la regulación del flujo glucolítico y no tiene efecto en la velocidad inicial de transporte de glucosa.

Las mediciones de metabolitos intracelulares en CL3 mostraron la acumulación de intermediarios del metabolismo central y la reducción de la poza de acetil-CoA en comparación con la cepa MG1655.

La inactivación del sistema de transporte de xilosa tipo ABC (XylFGH) provocó un aumento en la velocidad de crecimiento de JU01, probablemente debido al incremento en el rendimiento de ATP por mol de xilosa generado por el uso alternativo de otro tipo de transportador de xilosa como XylE.

La cepa JU15 obtenida a través de evolución adaptativa crece 50% mejor que JU01 y aumentó la productividad volumétrica de D-lactato de 0.5 a 0.75 g/L.h con un rendimiento de conversión del 95%.

La inactivación del sistema de transporte de xilosa tipo ABC no tuvo efectos negativos en el transporte de xilosa en la cepa JU01. Mediante experimentos en condiciones aeróbicas y sobre-expresando la permeasa de galactosa, se confirmó que las cepas JU01 y JU15 no tienen limitación en el transporte de xilosa con respecto a CL3. Además, la velocidad específica de crecimiento incrementó cuando se interrumpieron *xylFGH* en CL3, lo que sugiere un aumento en el rendimiento de ATP por mol de xilosa consumida.

A través de la inactivación de *xyIE* se encontró que existen transportadores de xilosa alternativos a los ya reportados.

Mediante secuenciación genómica comparativa en JU15 se encontró la eliminación de una región de 27.4 kb y la mutación puntual en *gatC*, que provoca el cambio de una Serina por una Leucina en el aminoácido 183. La eliminación de *gatC* en las cepas JU01 y JU15 produce un efecto negativo en la velocidad de crecimiento y consumo de xilosa. Por lo cual se concluye que además del transporte que se lleva a cabo por *xyIE*, *gatC* también contribuye al transporte de dicho azúcar en JU15.

10.- Perspectivas

- Llevar a cabo los ensayos de complementación de *gatC* en las cepas JU01 $\Delta gatC$ y JU15 $\Delta gatC$. Evaluar su contribución al transporte de xilosa y al fenotipo de JU15.
- Evaluar la contribución de la pérdida de la región de 27.4 kbp combinada con la mutación de *gatC* en JU01, estudiar su contribución al fenotipo de JU15.
- Encontrar los transportadores alternos que contribuyen a la internalización de xilosa en *E. coli*.
- Medir transporte de xilosa en las cepas JU01 y JU15, así como sus respectivas mutantes en *xyIE*, compararlas con la cepa silvestre y CL3.
- Estudiar los cambios ocurridos en JU15 mediante análisis de flujos metabólicos, y en combinación con la secuencia del genoma de la cepa evolucionada y complementados con datos de transcripción de genes o proteómica, ampliar el entendimiento de los mecanismos encontrados por la cepa evolucionada para mejorar su fenotipo en las condiciones evaluadas.
- Usar a JU15 como una plataforma para generar cepas derivadas para la producción de metabolitos en condiciones anaeróbicas a partir de xilosa y de residuos agroindustriales, p. ej. cepas productoras de L-lactato, etanol, succinato y alanina, entre otros.
- Mejorar la capacidad de producción de D-lactato con concentraciones de hasta 100 g/L de glucosa o xilosa y sus mezclas. Realizar estudios de escalamiento para la producción de D-lactato con JU15 y la purificación del mismo con miras a integrar un proceso de producción.

11.- Referencias

1. Bai D-M., Jia M-Z., Zhao X-M., Ban R., Shen F., Li X-G., Xu S-M. 2003. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. Chem. Eng. Science. 58:785-791.
2. Bailey E. J. 1991. Toward a science of metabolic engineering. Science. 252: 1668-1674
3. Beall D. S, Ohta K., Ingram L. O. 1991 Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 38: 296-303.
4. Bennett B.D., Kimball E.H., Gao M., Osterhout R., Van Dien S.J., Rabinowitz J.D. 2009. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. Nature chemical biology, vol. 5, pp. 593-9.
5. Böck A., Sawers G. 1996. Fermentation: En *Escherichia coli* and *Salmonella*. Celular and molecular biology. Eds. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology. Press Washington D.C. 1:262-282
6. Chang D.E., Jung H.C., Rhee J.S., Pan J.G. 1999 Homofermentative production of D or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1384-1389
7. Clark D.P. 1989. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Reviews. 63: 233-234
8. Datsenko K. A., Wanner B.L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(12):6640-5.
9. Dien BS., Nichols NN., Bothast RJ. 2001. Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27:259-264.
10. Dien BS., Nichols NN., Bothast RJ, 2002. Fermentation of sugar mixture using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29:221-227.
11. Elena F.S., Lenski R.E., 2003. Evolution Experiments with microorganisms: The Dynamics and genetic bases of adaptation. Nature Reviews. 4: 457-469

12. Fernandez-Sandoval M.T. 2010 Cultivos continuos para la producción de etanol a partir de mezclas xilosa-glucosa y *Escherichia coli* etanológica. Tesis de Doctorado en proceso. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
13. Fraenkel D. G. 1996 *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Eds. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology. Press Washington D.C. 1:189-198
14. Göknsungur G., Güvenç U., 1997. Batch and Continuous Production of Lactic Acid from Beet Molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 J.Chem Tech Biotechnol 69: 399-404.
15. Gonzalez, B., Franc, J., and Renaud, M. 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. Yeast 13, 1347-1355.
16. Grohmann K., Torget R., Himmel M. 1985. Optimization of dilute acid pretreatment for biomass. Biotechnol. Bioeng. 15: 59-80.
17. Hasona A., Kim Y., Healy F.G., Ingram L.O., Shanmugam K.T., 2004. Pyruvate Formate Lyase and Acetate Kinase Are Essential for Anaerobic Growth of *Escherichia coli* on Xylose. J Bacteriol 22: 7593-7600.
18. Hébert E.M., Raya R.R., Savoy de Goiri G. 2004. Nutricional Requiriments of *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *lactis* in a Chemically Defined Médium. Current Microbiol 49: 341-345.
19. Hernández-Montalvo V., Valle F., Bolívar F., Gosset G. 2001. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. Appl. Microbiol Biotechnol. 57:186-191.
20. Herring C.D., Raghunathan A., Honisch C., Patel T., Applebee K.M., Joyce A.R., Albert T.J., Blattner F.R., van den Boom D., Cantor C.R., Palsson B.Ø. 2006. Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. Nature genetics 38:12: 1406-12.
21. Honisch C., Raghunathan A., Cantor C.R., Palsson B.O., Van den Boom D. 2004. High-throughput mutation detection underlying adaptive evolution of *Escherichia coli* K-12. Genome Res. 14:2495-2502
22. Ibarra U.I., Jeremy S.E., Palsson B.O. 2002. *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptative evolution to achieve *in silico* predicted optimal growth. Nature 420: 186-189.
23. Jiang, G., Nikolova, S., & Clark, D. 2001. Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Microbiology, 147(9), 2437.

24. Kiefer, P., Nicolas, C., Letisse, F., and Portais, J. 2007. Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 360, 6.
25. Koebmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., Nilsson D., Jensen P.R., 2002. The Glycolytic Flux in *Escherichia coli* Is Controlled by the Demand for ATP. *J Bacteriol* 14: 3909-3916
26. Lara A.R., Vazquez-Limón C., Gosset G., López-Munguía A., Ramirez O.T. 2006. Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of By-Product during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotech Bioeng.* 94(6):1164-1175
27. PURAC. Improving heat-resistance of PLA using poly (D-lactide). *Bioplastics Magazine* 3:21-25
28. Leal, L. 2010. Ingeniería Metabólica de *Escherichia coli* para producir L-lactato. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas.
29. Lin E.C.C, 1996. Dissimilatory pathways for sugars polyols, and carboxylates, *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and molecular biology*. Eds. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology. Press Washington D.C. 307-342
30. Linton, K.J., Higgins C.F., 1998 The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* 28: 5-13
31. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring N. Y.: Cold spring harbor laboratory press. pp. 68-69
32. Martínez A., Rodríguez M.E., Wells M.L., York S.W., Preston J.F., Ingram L.O. 2001. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol. Progress.* 17, 287-293.
33. Martinez, A, Grabar T.B., Shanmugam K.T., Romano L.P., Work S.W., Ingram L.O. 2007. Low Salt Medium for Lactate and Ethanol Production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol. Lett.* 29(3), 397-404
34. Narayanan N., Roychoudhury P.K., Srivastava A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Elec J Biotechnol* 7-2: 167-179
35. Orencio-Trejo M, Utrilla J., Fernández-Sandoval M.T., Huerta-Beristain G., Gosset G., Martinez A. 2010. Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* En Prensa.

36. Peyraud, R., Kiefer, P., Christen, P., Massou, S., Portais, J., and Vorholt, J. A. 2009. Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using ^{13}C metabolomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 4846-51.
37. Skory C., D. 2003. Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rizopus oryzae* lactate deshydrogenase gene. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 22-27.
38. Stephanopoulos G. 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.* 1:1-11.
39. Tao H., González R., Martínez A., Rodríguez M., Ingram L. O., Preston J. F., Shanmugam K. T. 2001. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *J. Bacteriol.* 183:2979-2988.
40. Taymaz-Nikerel, H., de Mey, M., Ras, C., ten Pierick, A., Seifar, R. M., van Dam, J. C., Heijnen, J. J., and van Gulik, W. M. 2009. Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*. *Anal biochem* 386, 9-19.
41. Trujillo-Martínez, B. 2008. Producción de D-lactato por *Escherichia coli* recombinante a partir de hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Veracruz.
42. Wu, L., Mashego, M. R., van Dam, J. C., Proell, A. M., Vinke, J. L., Ras, C., van Winden, W. A., van Gulik, W. M., and Heijnen, J. J. 2005. Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly ^{13}C -labeled cell extracts as internal standards. *Anal biochem* 336, 164-71.
43. Yun J-S., Ryu H-W. 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Process Biochemistry.* 37:235-240.
44. Zhou S., Causey T. B., Hasona A., Shanmugam K. T., Ingram L. O. 2003a. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:399-407.
45. Zhou S., Yomano L.P., Shanmugam K.T. Ingram L.O. 2005. Fermentation of 10% (w/v) sugar to D-Lactate by engineered *Escherichia coli* B. *Biotechnol Lett* 27: 1891-1896
46. Zhou S., Shanmugam K. T., Ingram L. O. 2003b. Functional replacement of the *Escherichia coli* D- (-)-Lactate Dehydrogenase gene (*ldha*) with the L-(+)-Lactate Dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2237-2244.

47. Zhou S., Shanmugam K. T., Yomano L.P., Grabar T.B., Ingram L. O. 2006a Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. *Biotechnol Lett* 28: 663-670.
48. Zhou S., Grabar T.B., Shanmugan K.T., Ingram L.O. 2006b. Betaine tripled the volumetric productivity of D-Lactate by *Escherichia coli* strain SZ132 in mineral salts medium. *Biotechnol Lett* 28: 671-676
49. Zhu J, Zhimizu K. 2004. The effect of *pfl* gene knockout on the metabolism for optically pure D-Lactate production by *Escherichia coli*. *App. Microbiol Biotechnol.* 64:367-375.

12.- Anexos

12.1 Anexo I Solicitud de patente

Alfredo Martínez Jiménez, Guillermo Gosset Lagarda, Georgina Teresa Hernández Chávez, Gerardo Huerta Beristain, Berenice Trujillo Martínez, **José Utrilla Carreri**. “Cepas de *Escherichia coli* modificadas por ingeniería metabólica para la producción de compuestos químicos a partir de lignocelulosa hidrolizada, pentosas, hexosas u otras fuentes de carbono”.

Patente Sometida el 7 de Agosto de 2009 al Instituto Mexicano de Protección la Industrial. Expediente: MX/a/2009/008453; Folio: MXEX/2009/050826.

Nota: esta patente en su mayor parte contiene el trabajo desarrollado por el que presenta esta tesis, además de que también realizó la compilación y estructuración de la misma.

RESUMEN

La presente invención se refiere a nuevas cepas de *Escherichia coli* denominadas CL3, JU15, JU15A, LL26, MS04 y derivadas que producen metabolitos de forma preferencial, particularmente D-Lactato, L-Lactato e inclusive etanol, con un alto rendimiento y alta selectividad a partir de una variedad de fuentes de carbono como: medios de cultivo abundantes en xilosa (como fuente de carbono principal), particularmente medios formulados con hidrolizados de vegetales, como el bagazo de caña, además de una amplia variedad de residuos agroindustriales, como el suero de leche o desechos forestales, celulosa, pastos, arbustos y en general cualquier material derivado de lignocelulosa. Estas cepas usan la producción del metabolito de interés (particularmente D-lactato, L- lactato o etanol) como única vía de regeneración del poder reductor del microorganismo. También se refiere a los métodos fermentativos para producir dichos metabolitos a partir de medios con fuentes de carbono diversas, incluyendo glucosa, lactosa o xilosa .

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisonal de Patentes

Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial

Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría Economía y Oficinas Regionales IMPI

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud Expediente: MX/a/2009/008453
 Fecha: 7/AGO/2009 Hora: 13:22
 Folio: MX/E/2009/050826 72531



Antes de llenar la forma lee las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 2) Nacionalidad (es): MEXICANA.
 3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
 Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL.
 4) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (clave): 56 65 46 44

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ, GUILLERMO GOSSET LAGARDA, GEORGINA TERESA HERNÁNDEZ CHÁVEZ, GERARDO HUERTA BERISTAIN, BERENICE TRUJILLO MARTÍNEZ y JOSÉ UTRILLA CARRERA.
 7) Nacionalidad (es): MEXICANAS.
 8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: BENITO JUÁREZ N° 50, COLONIA AMPLIACIÓN CHAMILPA, C.P. 62210
 Población, Estado y País: CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.
 9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): LIC. JESÚS GARCÍA MONCADA 12) R G P: DDAJ-10052
 13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO "B" 3er. PISO, ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
 Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL 14) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31 15) Fax (clave): 56 65 46 44
 16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: LIC. ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ, LIC. RUBÉN GONZÁLEZ GALINDO, LIC. MARÍA VANESSA REYES CEBALLOS y LIC. CLAUDIA LIZBETH LLANOS ARGÜELLO.

17) Denominación o Título de la invención: "CEPAS DE ESCHERICHIA COLI MODIFICADAS POR INGENIERÍA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS A PARTIR DE LIGNOCELULOSA HIDROLIZADA, PENTOSAS, HEXOSAS U OTRAS FUENTES DE CARBONO".

18) Fecha de divulgación previa 19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI

10-14 | Agosto | 2008

20) Divisional de la solicitud 21) Fecha de presentación

Número Figura jurídica Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:

País	Fecha de presentación			No. de serie
	Día	Mes	Año	

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
X 1	Comprobante de pago de la tarifa	X 6	Documento de cesión de derechos
X 62	Descripción y reivindicación (es) de la invención	X 12	Constancia de depósito de material biológico
X 41	Dibujo (s) en su caso	X 3	Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
X 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
X 1	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		127	TOTAL DE HOJAS

Observaciones: Se anexa Listado de Secuencias en 12 hojas.

LIC. JESÚS GARCÍA MONCADA CD. UNIVERSITARIA, D.F., A 7 DE AGOSTO DE 2009
 Número y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

12.2 Anexo II Puerto de muestreo anaeróbico

A continuación se muestra la figura del puerto de muestreo anaeróbico utilizado en los experimentos para la determinación de metabolitos intracelulares. Se utilizó manguera de neopreno para evitar la permeabilidad al oxígeno. A través de la presión de nitrógeno que se tiene en el reactor (0.1-0.3 bar) y utilizando dos válvulas de 3 salidas se llena una pipeta para medir el volumen desplazado. Posteriormente, se toma la muestra directo al etanol caliente, de esa manera se logra tener una muestra tomada en anaerobiosis con un volumen preciso y en muy poco tiempo.

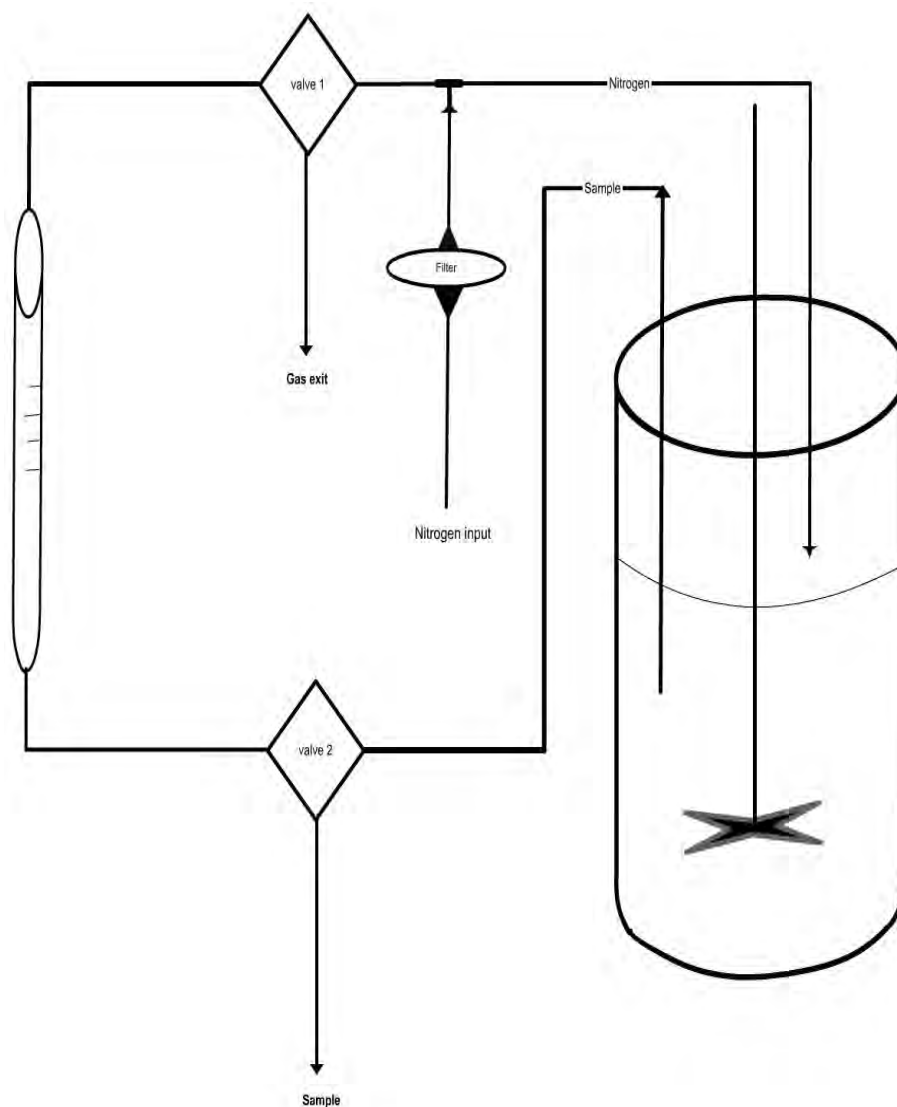


Figura 12.1 Puerto de muestreo anaeróbico

12.3 Anexo III Metabolitos medidos

Tabla 12.3 Metabolitos medidos en las cepas MG1655 y CL3.

Metabolito	Concentración en la cepa MG1655 (nmol/g _{DCW})	Concentración en la cepa CL3 (nmol/g _{DCW})	Relacion MG1655/CL3
<i>Glucólisis</i>			
G6P	13.234 ±(10.528)	21.110 ±(12.367)	1.595
G1P	0.080 ±(0.349)	0.010 ±(0.0934)	0.125
FBP	16.970 ± (6.095)	38.782 ±(3.628)	2.285
F6P	2.346 ±(2.299)	5.778 ±(3.096)	2.463
2/3-PG	9.121 ±(2.649)	21.582 ±(2.588)	2.366
PEP	1.252 ±(0.957)	3.267±(0.339)	2.609
Pyr	26.755 ±(21.803)	64.061 ±(11.539)	2.394
<i>Vía de las Pentosas Fosfato</i>			
6PG	0.259 ±(0.149)	4.491±(2.948)	17.340
R5P	2.089 ±(0.643)	3.343 ±(1.008)	1.600
S7P*	23.615 ±(19.051)	89.807 ±(21.945)	3.803
E4P*	42.809 ±(15.364)	111.616 ±(30.015)	2.607
<i>Ácidos orgánicos</i>			
Fumarato	5.044 ±(3.071)	17.399 ±(8.716)	3.449
Citrato/isocitrato	13.083 ±(14.881)	27.195 ±(13.099)	2.079
<i>Tioesteres de CoA</i>			
Acetil-coA*	8.460x10 ⁷ ±(1.30x10 ⁷)	4.673x10 ⁷ ±(1.05x10 ⁷)	0.552
coA*	8.193x10 ⁶ ±(1.875x10 ⁶)	1.045x10 ⁷ ±(1.769x10 ⁶)	1.275
Succinil-coA*	1.533 x10 ⁶ ±(4.507 x10 ⁵)	8.520 x10 ⁶ ±(1.868 x10 ⁶)	5.558
Propionil-coA*	2.118x10 ⁵ ±(1.565 x10 ⁵)	5.520 x10 ⁵ ±(1.323 x10 ⁵)	2.606
<i>otros</i>			
F1P	0.756 ±(0.273)	3.774 ±(0.761)	4.992
M6P	0.888 ±(0.411)	4.343 ±(1.205)	4.891
PRPP*	1.153 x10 ⁵ ±(6.978 x10 ⁴)	1.815 x10 ⁶ ±(5.220 x10 ⁵)	15.611
GDP	2.018 ±(0.695)	1.280945 ±(0.468)	0.635
UMP	6.218 ±(1.238)	13.717 ±(3.249)	2.206
UTP	5.906 ±(2.152)	5.627 ±(1.206)	0.953

*Metabolitos para los que no se cuenta con estándar y su concentración se expresa en términos de área. Los valores en paréntesis indican la desviación estándar de las mediciones de 6 replicas.

12.4 Anexo III Lista de oligonucleótidos

A continuación se presenta la lista de oligonucleótidos utilizados para la verificación de los SNP's reportados por la secuenciación genómica comparativa.

Tabla 12.4 Oligonucleótidos utilizados para secuenciación

	nombre	Tamaño (pb)	Secuencia	Coordenadas en el genoma de <i>E.coli</i> cepa MG1655
1	nlpE-F	20	5' TTA CCT ATG ACG CCG ATG AC 3'	215 693
2	nlpE-R	20	5' TGC TCA CTG AAT CCG TTC TC 3'	216 491C
3	kefA-F	20	5' TGG TCG TTG ACT GAC ACT AC 3'	488 740
4	kefA-R	20	5' CGT GAA GTG GAA GCC TAT GA 3'	489 599C
5	purK-F	20	5' CAT GCC ACA CCG GAT GAG TT 3'	550 383
6	purK-R	20	5' CGT GAT GGC GAT GGA GTG TT 3'	551 156C
7	sdhFor	20	5' TCC GCG ATT ATG GGC AGC TT 3'	754 871
8	sdhRev	20	5' CCA TTC CCA GTT ATC TTC AT 3'	755 571C
9	ybhC-F	20	5' GGC GAA TAT TGC CGA GGA GT 3'	804 694
10	ybhC-R	20	5' GCT GGT GAC CAA CAG CTA CA 3'	805 687C
11	ybiJ-F	20	5' GAT TGT AAC GCG CAG ACC GA 3'	836 430
12	ybiJ-R	20	5'GAA CAA GGC GGT CAA TTC TC 3'	837 259C
13	stfR-F	20	5' TGC AGA TGA AGG CGC ATT AC 3'	1 429 664
14	stfR-R	20	5' TCA ACG AGA TGC CAC GAT GA 3'	1 430 641C
15	wzxC-F	20	5' GGC GTG TGG ATT GAG AAT GT 3'	2 116 328
16	wzxC-R	20	5' CCG GTT CTT GGT TCC AGT TA 3'	2 116 971C
17	gatCfor	20	5' ATG TTT TCA GAA GTC ATG CG ..3'	2 171 500
18	gatCrev	20	5' TTG CGC TGA ATA TCG TCG GC ..3'	2 172 000C
19	nrdB-F	20	5' CGC CAC TAA CGG TAT TGA AC 3'	2 344 777
20	nrdB-R	20	5' AGC GCC TGG TAA TCT ATA CG 3'	2 345 603C
21	gabT-F	20	5' GAA GAC GGC GAT CAC AAC AA 3'	2 791 837
22	gabT-R	20	5' CCG GCA ATA GAC AAC ATG GT 3'	2 792 351 C
23	yhdP-F	20	5' CGC CGC TAG CAA TTG TTC AC 3'	3 390 013
24	yhdP-R	20	5' GGC CAA CGA GCC AGA ACA TA 3'	3 390 429 C
25	uvrD-F	20	5' TGG CCT ACG TTG GCG TAA CC 3'	3 997 799
26	uvrD-R	20	5' TGT TGA GCC AGC AGG CAA CA 3'	3 998 494 C
27	FadA-F	20	5' TAC GCT GGC AGA GCA TGA TA 3'	4 025 123
28	FadA-R	20	5' ACG CTG CTG AAT CTG ATG GA 3'	4 025 734 C
29	AceKF	20	5' CTT GCG CGT CTT ATC ATG CC 3'	4 216 076
30	AceKR	20	5' TAT TCG CGG TAG CTT TCG GT 3'	4 217 057 C
31	gltP-F	20	5' CGC TGG CTT ATG AGC GTG AA 3'	4 293 763
32	gltP-R	20	5' AAG CGT CGC ATC AGG CAT TG 3'	4 294 437 C
33	gltP-2F	20	5' GCT GCA CTG GTT GAA CCT GA 3'	4 294 539 C
34	phnK-F	20	5' GCG AGC GTA GCA GAG TTG AT 3'	4 315 760
35	phnK-R	20	5' TGG CTG GAA GAG GTG GAG AT 3'	4 316 407C
	yjdN-F	20	5' TCC GTT AGC GGC AAG ATT GT 3'	4 323 436
	yjdN-R	20	5' TGT GAT CGG TAA GCC GGA TA 3'	4 324 416 C

12.4 Anexo IV Otras publicaciones generadas en este trabajo

Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. Montserrat Orencio-Trejo, **José Utrilla**, Marco T. Fernández-Sandoval, Gerardo Huerta-Beristain, Guillermo Gosset, Alfredo Martinez. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. 2010. En esta publicación el que suscribe la tesis participó desarrollando dos capítulos, los que resumen el estado del arte en la ingeniería metabólica de *E. coli* para producir lactatos y succinato.

OBTENCIÓN DE L Y D LACTATOS ÓPTICAMENTE PUROS EN *Escherichia coli*. **José Utrilla Carreri**, Alfredo Martínez Jiménez. En Memorias del III Simposio sobre Biofábricas. La Biotecnología como Herramienta para el Desarrollo y el Bienestar. Medellín Colombia, 2007.

Engineering *Escherichia coli* for Xylose Conversion to D-lactate **José Utrilla**, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez. *En preparación*.