



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ELIMINACIÓN DE TRANSPORTADORES PARA EL CONSUMO DE XILOSA Y GLUCOSA
EN UNA CEPA LACTOGÉNICA DE *ESCHERICHIA COLI*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
TLAKAELEL AKOLMIZTLI HERNÁNDEZ RÍOS

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Alfredo Martínez Jiménez
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Humberto Flores Soto
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

Dr. José Utrilla Carreri
[Centro de Ciencias Genómicas-UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Mayo, 2019



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.

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente	Dr. Mario Soberón Chávez
Secretario	Dr. Carlos Felipe Peña Malacara
Vocal	Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
Vocal	Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Vocal	Dr. Fernando Martínez Morales

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 financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto apoyado por el FONCICYT: SMIBIO - ERANet-LAC número C0013 – 248192 y de la UNAM con el proyecto PAPIIT – DGAPA – IV100119.

Agradecimientos

A mi madre Leticia por llenarme de amor y estar al pendiente de mí siempre. A mi padre José Luis por su apoyo y sus consejos. A Topiltzin y Tupak por ser muy buenos hermanos conmigo. También quisiera agradecer a mis familiares: abuela Rufina, tías Blanca, Amada, Luisa y a mis primos. Gracias a todos por motivarme y forjar la persona que soy.

A mi tutor el Dr. Alfredo Martínez Jiménez por haberme aceptado como su estudiante y permitirme desarrollarme en lo profesional y académico, así como por ese lado humano que lo caracteriza.

A los miembros de mi comité tutor el Dr. Humberto Flores Soto y el Dr. José Utrilla Carreri por sus observaciones y aportaciones a este trabajo en cada tutorial.

A la M. en C. Alexandra Roncancio y a la Dra. Estefanía Sierra por su capacitación introductoria y sus recomendaciones durante el inicio de mi proyecto.

A la M. en C. Georgina Hernández y a la I.Q. Luz María Martínez por su apoyo técnico y metodológico que me brindaron en la maestría.

A Aurelia González, el Biólogo Manuel Saucedo y Adrián, por su dedicación y trabajo, ya que con ello facilitaron mi proyecto y estancia en el instituto.

A mis amigos del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, así como mis compañeros de generación de la maestría y del IBt. También con mucho aprecio para mis amigos de PiSA y mis compas de la FES Zaragoza. A todos ustedes gracias por su amistad y compañía, me han regalado bellos recuerdos.

Contenido

1. Resumen.....	11
2. Introducción.....	12
3. Marco teórico	14
3.1. Generalidades de sistemas de transporte de azúcares en <i>E. coli</i>	14
3.2. Sistemas de transporte de glucosa en <i>E. coli</i>	16
3.3. Represión por catabolito de carbono.....	19
3.4. Sistemas de transporte de xilosa en <i>E. coli</i>	20
3.5. Metabolismo de glucosa y xilosa en <i>E. coli</i>	22
4. Antecedentes	24
4.1. Eliminación de transportadores de xilosa y de glucosa en cepas de <i>E. coli</i> para el consumo de estas fuentes de carbono	24
4.2. Cepa JU15	26
5. Justificación.....	27
6. Hipótesis	28
7. Objetivos	28
7.1. Objetivo General	28
7.2. Objetivos Específicos	28
8. Metodología	29
8.1. Cepas, cebadores y plásmido utilizados.....	29
8.2. Construcción de las cepas	31
8.3. Medios de cultivo, condiciones y evaluación de las cepas mutantes	32
8.4. Métodos analíticos	34
9. Resultados y discusión.....	36
9.1. Evaluación de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, en medio AM1 con xilosa	36
9.2. Evaluación de las cepas JU15* $\Delta gatC S184L$, JU15* $\Delta araH \Delta gatC S184L$, JU15* $\Delta galP \Delta gatC S184L$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC S184L$, en medio AM1 con xilosa.....	41

9.3. Evaluación de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, en medio AM1 con glucosa-xilosa	47
9.4. Evaluación de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, en medio AM1 con glucosa	53
9.5. Evolución adaptativa de la cepa JU15* $\Delta ptsG$	59
10. Conclusiones	64
11. Perspectivas	65
12. Referencias.....	66
13. Anexos.....	71
13.1. Construcción de las cepas JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$, JU15* $\Delta araH \Delta galP$, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$	71
13.2. Eliminación del gen <i>gatC S184L</i> de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$	79
13.3. Análisis estadístico de las mutantes <i>gatC</i>	80
13.4. Evaluación de cepas MG1655 y MG1655 $\Delta galP$ en medio AM1 con xilosa 40g/L.....	81
13.5. Procedimiento de eliminación de casete de kanamicina de la cepa JU15	82

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas de mutantes de los transportadores de xilosa.	25
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	29
Tabla 3. Cebadores utilizados en este trabajo.	30
Tabla 4. Plásmido utilizado en este trabajo.	30
Tabla 5. Cepas donadoras utilizadas en la transducción con fagos.	31
Tabla 6. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, medio AM1 con 40g/L de xilosa.	36
Tabla 7. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas mutantes del gen <i>gatC S184L</i> , medio AM1 con 43 g/L de xilosa.	43
Tabla 8. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15* y JU15* $\Delta gatC S184L$, medio AM1 con xilosa.	45
Tabla 9. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, medio AM1 con 20g/L de glucosa y 20g/L de xilosa.	47
Tabla 10. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa.	53
Tabla 11. Resultados promedio de los parámetros cinéticos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada, medio AM1 con 40g/L glucosa.	60
Tabla 12. Comprobación de las cepas KEIO y los genes a eliminar de la cepa JU15*.	71
Tabla 13. Comprobación de la eliminación de los genes <i>ptsG</i> , <i>galP</i> y <i>araH</i> en la cepa JU15*.	73
Tabla 14. Comprobación de genotipo $\Delta ptsG::km^R$ y <i>galR</i> ⁺ en la variante obtenida.	75
Tabla 15. Comprobación de la eliminación del casete de resistencia en las cepas JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta araH$	76
Tabla 16. Comprobación de las mutantes JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$	77
Tabla 17. Comprobación de los genotipos $\Delta gatC::km$ en la cepa KEIO, <i>gatC S184L</i> en JU15* y $\Delta gatC S184L::km$ en las mutantes construidas.	79
Tabla 18. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas MG1655 y MG1655 $\Delta galP$, medio AM1 con 40g/L de xilosa.	81

Índice de Figuras

Figura 1. Sistemas de transporte de azúcares en <i>E. coli</i>	15
Figura 2. Mecanismo de transporte de glucosa a través del sistema PTS	17
Figura 3. Internalización de xilosa a través de sus sistemas de transporte	22
Figura 4. Cinética de crecimiento, consumo de xilosa y producción de ácido D-láctido de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, medio AM1 con 40 g/L de xilosa.	37
Figura 5. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, medio AM1 con 40g/L de xilosa.	38
Figura 6. Cinética de crecimiento, consumo de xilosa y producción de ácido D-láctido de las cepas JU15* $\Delta gatC S184L$, JU15* $\Delta araH \Delta gatC S184L$, JU15* $\Delta galP \Delta gatC S184L$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC S184L$, medio AM1 con 43 g/L de xilosa.....	41
Figura 7. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15* $\Delta gatC S184L$, JU15* $\Delta araH \Delta gatC S184L$, JU15* $\Delta galP \Delta gatC S184L$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC S184L$, medio AM1 con 43 g/L de xilosa.....	42
Figura 8. Producción de ácido fórmico y ácido acético de las mutantes $gatC S184L$, medio AM1 con 43 g/L de xilosa..	46
Figura 9. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa-xilosa y producción de ácido D-láctido de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG variante$ y JU15* $\Delta ptsG \Delta galR variante$, medio AM1 con 20g/L glucosa y 20g/L xilosa.	48
Figura 10. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG variante$ y JU15* $\Delta ptsG variante \Delta galR$, medio AM1 con 20g/L de glucosa y 20g/L de xilosa.	49
Figura 11. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido D-láctido de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG variante$ y JU15* $\Delta ptsG variante \Delta galR$, medio AM1 con 40 g/L glucosa.....	54
Figura 12. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG variante$ y JU15* $\Delta ptsG variante \Delta galR$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa.	55
Figura 13. Evolución adaptativa de la cepa JU15* $\Delta ptsG$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa.	60
Figura 14. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG variante$ y JU15* $\Delta ptsG$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa.	61

Figura 15. Comprobación de los genotipos <i>ptsG</i> , $\Delta ptsG::km^R$, <i>galR</i> y $\Delta galR::km^R$ en las cepas KEIO y la cepa JU15*.	72
Figura 16. Comprobación de los genotipos <i>araH</i> , $\Delta araH::km^R$, <i>galP</i> y $\Delta galP::km^R$ en las cepas KEIO y la cepa JU15*.	72
Figura 17. Comprobación del genotipo de la mutante JU15* $\Delta ptsG::km^R$.	73
Figura 18. Comprobación de los genotipos de las mutantes JU15* $\Delta araH::km^R$ y JU15* $\Delta galP::km^R$.	74
Figura 19. Comprobación de los genotipos $\Delta ptsG::km^R$ y <i>galP</i> ⁺ en la cepa JU15* <i>ΔptsG variante</i> .	75
Figura 20. Comprobaciones del genotipo <i>FRT</i> y del gen <i>galR</i> en la cepa JU15* $\Delta ptsG::FRT$.	76
Figura 21. Comprobación del tamaño de banda de <i>FRT</i> en la cepa JU15* $\Delta araH::FRT$.	77
Figura 22. Comprobación del genotipo $\Delta ptsG::FRT \Delta galR::km^R$.	78
Figura 23. Comprobación del genotipo $\Delta galP::km$ en la cepa JU15* $\Delta araH::FRT \Delta galP::km$.	78
Figura 24. Comprobación del genotipo $\Delta gatC::km^R$ en KEIO, <i>gatC S184L</i> en JU15* y $\Delta gatC S184L::km$ en mutantes construidas.	80
Figura 25. Cinética de crecimiento y consumo de xilosa de las cepas MG1655 y MG1655 $\Delta galP$, medio AM1 con 40 g/L de xilosa.	81

Símbolos

%	Porcentaje
±	Más menos (Desviación estándar)
Δ	Eliminación de gen(es)
°C	Grado centígrado
μg	Microgramo
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
g	Gramo
h	Hora
H ⁺	Protón
L	Litro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
nm	Nanómetro

Abreviaturas

acetilCoA	Acetil coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Analysis of variance (Análisis de varianza)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CCR	Carbon catabolic repression (Represión catabólica por carbono)
DCW	Dry cell weight (Peso seco de células)
DO 600nm	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
F _c	F calculada
F _t	F de tablas
K _b	Kilo bases
K _M	Constante de Michaelis-Menten
K _m ^R	Resistencia a kanamicina
NADH	Nicotinamida Adenina dinucleótido
pb	Pares de base
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción de cadena a la polimerasa)
PEP	Phosphoenolpyruvate (Fosfoenolpiruvato)
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto

1. Resumen

En este trabajo se estudió el consumo de xilosa asociado a la eliminación de dos transportadores inespecíficos de este azúcar, AraFGH y GalP, en la cepa lactogénica JU15* de *E. coli*. Los resultados revelan que mutantes de estos transportadores no presentan cambios en la velocidad de crecimiento y en la velocidad específica de consumo de xilosa. Posteriormente, a las cepas mutantes de los genes *araH*, *galP* y *araH-galP* se les eliminó el gen *gatC S184L* para observar si el transportador que expresa este gen evita ver el efecto que conlleva la eliminación de los genes *araH* y *galP*. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la velocidad de crecimiento y en la velocidad específica de consumo de xilosa en las cepas JU15* Δ *araH*, JU15* Δ *galP* y JU15* Δ *araH* Δ *galP*. Como resultado de la eliminación del gen *gatC S184L*, las velocidades de crecimiento y de consumo de xilosa disminuyeron 50 %, lo que resalta la importancia de este sistema de transporte. En la cepa JU15* también se evaluó la eliminación de la represión catabólica por la pérdida del componente PtsG del sistema de transporte PTS, mediante la eliminación del gen que lo codifica, *ptsG*. La pérdida del principal sistema de transporte de glucosa (PTS) muestra que en ausencia de represión catabólica se lleva a cabo el consumo simultáneo de la glucosa y la xilosa. Sin embargo, el consumo de glucosa y la velocidad de crecimiento disminuyeron 65 % con respecto a la cepa parental. En este trabajo durante el cultivo de la cepa JU15* Δ *ptsG* se observó que esta cepa había incrementado la velocidad de crecimiento a pesar de carecer del sistema PTS, lo que dio pauta a la obtención de una nueva cepa denominada JU15* Δ *ptsG* variante. Como una estrategia para mejorar el consumo de glucosa, en las cepas JU15* Δ *ptsG* y JU15* Δ *ptsG* variante, se evaluó el efecto que conlleva la pérdida del regulador del operón de galactosa, GalR, mediante la eliminación del gen *galR*. Esta estrategia incrementó 15 % la velocidad de consumo de glucosa en la cepa JU15* Δ *ptsG* y la disminuyó 40 % en la cepa JU15* Δ *ptsG* variante, lo que sugiere que GalR regula de forma positiva y negativa los genes relacionados al metabolismo de glucosa. Debido a que la cepa JU15* Δ *ptsG* variante alcanzó el 75 % de los valores reportados en la cepa JU15* respecto a las velocidades de crecimiento y de consumo de glucosa, se optó por hacer evolución adaptativa en laboratorio de la cepa JU15* Δ *ptsG* con el objetivo de incrementar la velocidad de crecimiento y la velocidad de consumo de glucosa. Durante 16 pases en serie se obtuvo en aproximadamente 100 generaciones una cepa que aumentó 1.3 veces la velocidad de crecimiento y 1.6 veces la velocidad de consumo de glucosa.

2. Introducción

La ingeniería genética ha puesto en el horizonte a la bacteria *Escherichia coli* como una opción para la producción de compuestos de interés industrial, mediante procesos de fermentación. Esto, debido a que se tiene amplio conocimiento de su metabolismo, consume una amplia variedad de fuentes de carbono, tiene requerimientos nutricionales simples, presenta un crecimiento rápido y su manipulación genética es relativamente sencilla, en comparación con otros microorganismos. En busca de optimizar los procesos de fermentación y reducir los costos de operación, se han evaluado diferentes fuentes de carbono. En años recientes, el aprovechamiento de hidrolizados de fibras de materiales vegetales, como son los residuos lignocelulósicos y agroindustriales, para la producción de azúcares fermentables, se ha convertido en una opción viable; ya que son fuentes económicas, amigables con el medio ambiente, no comprometen el uso de alimentos como materia prima y su disponibilidad es elevada. No obstante, a partir de este tipo de residuos se obtienen mezclas heterogéneas de azúcares, como son hexosas y pentosas, que en la práctica afectan los procesos de fermentación. La principal problemática es el fenómeno de represión catabólica, ejercido por la glucosa, el cual limita el consumo simultáneo de las fuentes de carbono obtenidas (Escalante *et al.*, 2009). La xilosa es el segundo azúcar más abundante en la naturaleza y junto con la glucosa, son los principales azúcares que se obtienen a partir de los hidrolizados de la fracción de hemicelulosa, presente en la lignocelulosa. Aunque también se encuentran, pero en proporción baja, otros azúcares como galactosa, manosa y arabinosa. (Ye *et al.*, 2013). Debido a que *E. coli* puede metabolizar pentosas, la xilosa puede ser aprovechada como fuente de carbono para la producción de ácidos orgánicos y otros productos obtenidos por fermentación (Yu *et al.*, 2011). Las proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana plasmática, de las bacterias, son cruciales para la permeabilidad selectiva de nutrientes y metabolitos. Estas proteínas regulan el transporte activo y pasivo de solutos pequeños, como monosacáridos, a través de la membrana celular (Jojima *et al.*, 2010). La internalización de azúcares en la bacteria, mediante transportadores específicos e inespecíficos, representa una limitante para su crecimiento y la producción de compuestos de interés. Para hacer frente a estas desventajas, una de las estrategias se ha enfocado en la eliminación del sistema de

transporte PTS con el objetivo de inhibir la represión catabólica que tiene la glucosa sobre otros azúcares. Por otra parte, en el caso de la xilosa, la eliminación del principal transportador de esta fuente de carbono, XylFGH, le permite ahorrar a la bacteria el ATP que consume este transportador para la internalización de xilosa. En este sentido, se ha reportado que la eliminación de XylFGH incrementa la velocidad de crecimiento en condiciones de fermentación en cultivos con xilosa (Utrilla *et al.*, 2012; Khunnonkwao *et al.* 2018).

3. Marco teórico

3.1. Generalidades de sistemas de transporte de azúcares en *E. coli*

La presencia de proteínas transportadoras de elevada especificidad provee la primera barrera de regulación entre un organismo y su entorno. Los sistemas de transporte juegan un papel importante en el crecimiento celular, homeostasis, metabolismo y transducción de señales (Yan, 2015). El transporte de azúcares en bacterias involucra la translocación de estos compuestos desde el medio ambiente hacia el interior de la célula mediante proteínas de membrana. De forma global, los transportadores de azúcares en *E. coli* se clasifican en tres grupos: el sistema de transporte de fosfotransferasa, la super familia del facilitador principal y los transportadores de casete de unión a ATP (Figura 1); también conocidos por sus abreviaturas en inglés como: PTS, MFS y ABC, respectivamente (Guan, 2004).

El sistema PTS es una familia de transportadores que se encuentra solamente en bacterias y juegan un papel importante en el fenómeno de represión catabólica. Este sistema está conformado por tres proteínas: enzima I (EI), proteína histidina (HPr), enzima II A (EIIA) y enzima II BC (EIIBC). Estas proteínas están acopladas a un proceso de transferencia de grupo fosfato. Todas las reacciones de transferencia del grupo fosfato entre las proteínas del sistema PTS son reversibles y el fosfoenolpiruvato funge como activador energético de este sistema, ya que es quien proporciona el grupo fosfato, por lo que se trata de un transporte activo o primario. Una característica de este transporte es que el sustrato, en este caso el azúcar, entra a la célula en un estado activado, es decir, el sistema fosforila al azúcar durante su transporte (Görke y Stülken, 2008).

El sistema de transporte MFS es una familia de proteínas que internaliza iones y solutos a través de la membrana por mecanismos de difusión facilitada, simporte o antiporte. Estos dos últimos mecanismos utilizan la energía de gradiente electroquímico para el transporte de solutos. En el caso del transporte de azúcares en *E. coli* principalmente se lleva a cabo por simportes de protones, donde el sustrato y un ion hidronio son cotransportados al interior de la célula. Dado que la energía para el transporte proviene de gradientes electroquímicos, este tipo de sistemas no consumen energía a partir de donadores de grupo fosfato, por lo que son

transportes pasivos o también llamados secundarios. Sin embargo, esto limita su capacidad de transporte, además de que el azúcar no entra fosforilado a la célula. Con relación a su estructura y de forma general, los simportes de protones se conforman de una proteína, acoplada a membrana con dos dominios denominados N y C (Yan, 2015; Harris *et al.* 2017).

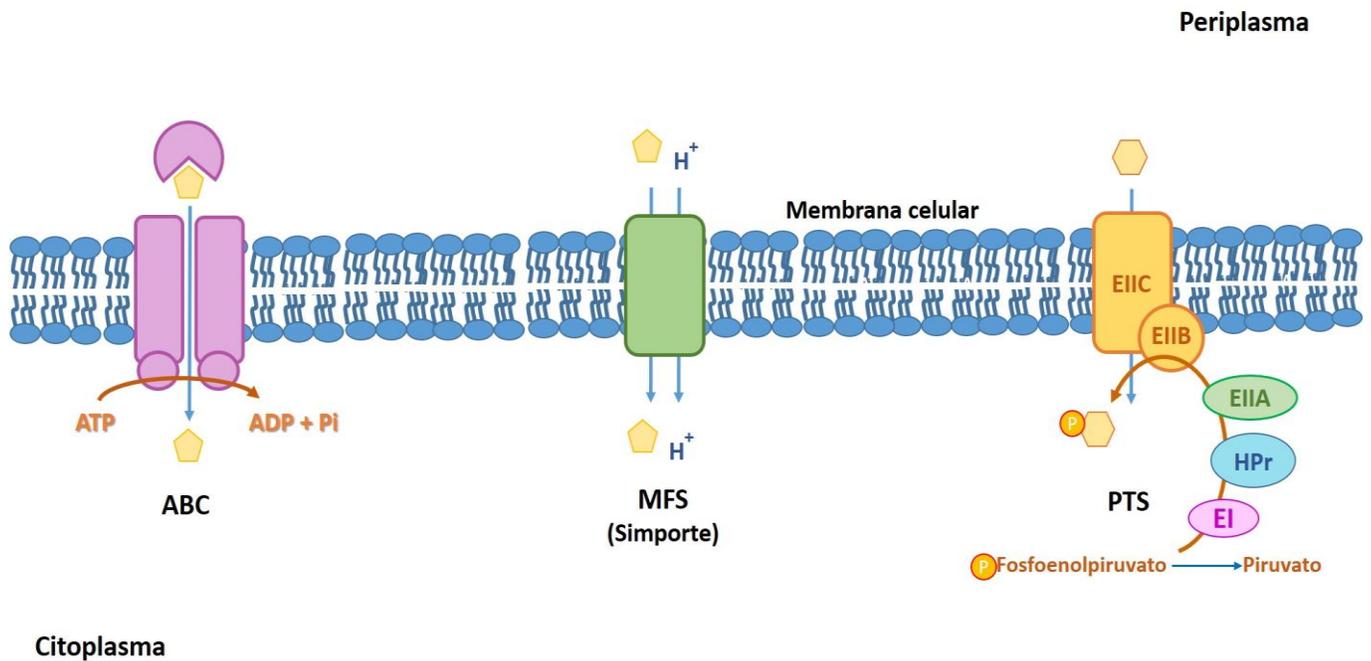


Figura 1. Sistemas de transporte de azúcares en *E. coli*. El transportador de tipo ABC hidroliza ATP para el transporte del azúcar. El simporte MFS internaliza el azúcar mediante gradiente electroquímico de protones. El sistema PTS acopla la transferencia del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato a un sistema de proteínas para la internalización del azúcar.

La familia de transportadores de tipo ABC se compone de 3 estructuras. La primera es una proteína acoplada a membrana que posee dos dominios transmembranales, uno de cada lado de la membrana, la cual funge como el canal de transporte. La segunda estructura consta de dos dominios de unión a nucleótido localizados en la parte interna de la membrana, los cuales representan el motor del transportador, ya que la interacción de estos dominios admite la unión e hidrólisis del ATP, lo que genera cambios conformacionales que permiten abrir o cerrar el

canal de transporte. Por último, la tercera estructura es una proteína soluble localizada en el espacio periplásmico de *E. coli*, la cual se encarga de capturar y entregar el sustrato al transportador, debido a que interactúa con el dominio transmembranal de la proteína acoplada a membrana (Moussatova *et al.*, 2008). El consumo de ATP indica que se trata de un sistema de transporte activo. Sin embargo, a diferencia del sistema PTS, los transportadores de tipo ABC no incorporan el grupo fosfato al azúcar durante su transporte.

3.2. Sistemas de transporte de glucosa en *E. coli*

En bacterias Gram negativas, la internalización de glucosa requiere superar dos envolturas celulares, una membrana externa, que recubre la pared celular, y una membrana citoplasmática. El transporte de glucosa en *E. coli* implica, en un primer paso, atravesar la membrana externa a través de un sistema de porinas, las cuales son muy abundantes y representan alrededor del 2% de todas las proteínas de la célula (Nikaido, 1996). En concentraciones superiores a 0.2 mM de glucosa, esta fuente de carbono es internalizada principalmente por las porinas OmpC y OmpF (Death *et al.*, 1993). De esta última, se ha demostrado *in vitro* que su capacidad de difusión es mayor que la primera (Nikaido y Rosenberg, 1983). Bajo condiciones de limitación de glucosa, se induce la expresión de la glicoporina LamB, la cual contribuye con alrededor de 70% de la capacidad total de transporte de glucosa, en las condiciones mencionadas (Death *et al.*, 1993).

El sistema de transporte PTS es el principal sistema que posee *E. coli* para internalizar glucosa, una vez que ésta se encuentra en el espacio periplásmico (Figura 2). Los componentes de este sistema de transporte son: La enzima I (EI), la proteína de histidina (HPr), la enzima IIA (EIIA) y la enzima IIBC (EIIB y EIIC). Las tres primeras proteínas son solubles y se encuentran en el citosol, mientras que la última tiene sus dos componentes unidos a membrana. Este conjunto de proteínas está acoplado a un proceso de transferencia de grupo fosfato y cerca del 50% de fosfoenolpiruvato disponible en *E. coli* se destina como donador energético de este sistema (Flores *et al.*, 2005).

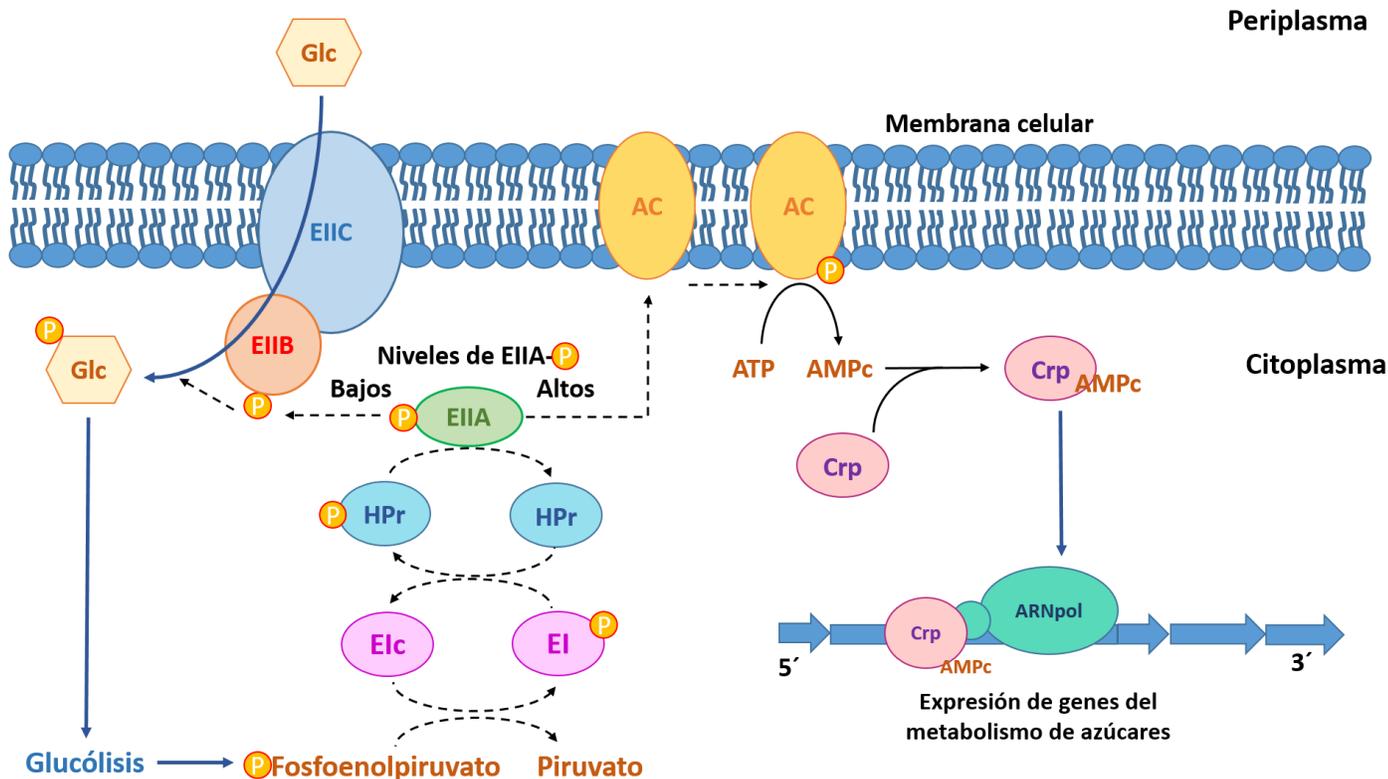


Figura 2. Mecanismo de transporte de glucosa a través del sistema PTS. Este sistema es el principal transportador de glucosa en *E. coli*, además regula la represión catabólica. Al agotarse la glucosa disponible en el ambiente, los niveles de la EIIA fosforilada incrementan, lo que desencadena la formación del complejo Crp-AMPC. Este complejo permite la expresión de genes del metabolismo de azúcares.

EI se encuentra codificada en el gen *ptsI* y posee un sitio de unión que reconoce el fosfoenolpiruvato, el cual utiliza como donador de grupo fosfato. En presencia de ion magnesio (Mg^{2+}), EI es fosforilada (EI-P), a partir de PEP, y transfiere este grupo fosfato a la proteína de histidina. HPr es una proteína codificada en el gen *ptsH*, la cual es fosforilada en su residuo de histidina 15 por EI-P. La enzima IIA se encuentra codificada en el gen *crr* y su función es transferir el grupo fosfato de su residuo de histidina, el cual previamente fue donado por HPr-P, hacia el componente EIIB. EIICB es una proteína codificada en el gen *ptsG*, la cual consta de dos dominios. El primer dominio es EIIC y se trata de dominio hidrofóbico, anclado a la membrana, que posee un sitio de unión a glucosa. El segundo es EIIB, el cual es un dominio hidrofílico que

se encuentra expuesto en la parte citosólica de la membrana y cuya función es transferir el grupo fosfato de EIIA-P hacia la glucosa. EIICB funge como una permeasa que de manera simultánea internaliza y fosforila la glucosa que entra a la célula. Como se describe más adelante, el sistema PTS está involucrado en el fenómeno de represión catabólica.

Existen vías alternas al sistema de transporte PTS, por las cuales la glucosa es internalizada hacia la célula. Dado que la glucosa es un diastereoisómero de la galactosa; la glucosa puede ser reconocida y transportada por los dos principales sistemas de transporte de este isómero conformacional. El primer sistema es un simporte de protones de baja afinidad denominado GalP, el cual se encuentra codificado en el gen *galP*. El segundo sistema es un casete de tipo ABC denominado MglABC. Este último sistema está codificado en el operón *mgl* y esta conformado por los genes *mglB*, *mglA* y *mglC*, los cuales se expresan en ese orden. MglB es la proteína periplásmica que reconoce a la galactosa y la glucosa, MglA funge como la proteína de unión a ATP y MglC es el componente de transporte unido a membrana (Death y Ferenci, 1994). La expresión de ambos sistemas se encuentra regulada por las proteínas GalR y GalS, codificadas en los genes *galR* y *galS*, respectivamente. La proteína GalR reprime principalmente la expresión del gen *galP*, mientras que la proteína GalS se encarga de reprimir la expresión del operón *mgl*. No obstante, se ha reportado que ambas proteínas pueden entrecruzar la regulación, ya que sus secuencias reconocen los mismos operadores, pero interaccionan con diferente afinidad. Componentes del sistema PTS, análogos al sistema PTS de glucosa, también representan una vía alterna por donde esta fuente de carbono es internalizada en *E. coli*. Entre ellos se encuentran la permeasa de manosa EIID^{Man}, codificada en los genes *manXYZ*; la subunidad transportadora específica de fructosa EIIBC^{Fru}, codificada en el gen *fruA*; y la subunidad transportadora específica β -glucosidasa EIIC, codificada en el gen *bglF* (Luo *et al.*, 2014).

3.3. Represión por catabolito de carbono

La mayoría de las bacterias son selectivas al consumo de sustratos a partir de mezclas con diferentes fuentes de carbono, es decir, tienen un consumo jerárquico de azúcares. La regulación de este mecanismo se conoce como represión por catabolito de carbono (CCR, carbon catabolite repression, por sus siglas en inglés) o simplemente represión catabólica. CCR es uno de los sistemas de regulación más importantes en bacterias y aproximadamente entre 5 y 10% de todos los genes bacterianos se encuentran bajo su control (Görke y Stülken, 2008). Este mecanismo de regulación les permite a las bacterias adaptarse rápidamente a la fuente de carbono preferida que se encuentre disponible en el ambiente, esto lo logran mediante la inhibición de la expresión de genes relacionados al metabolismo de azúcares que se encuentran en el medio junto con la fuente de carbono preferida (Deutscher 2008). En *E. coli*, los componentes principales de esta vía de regulación son: la enzima IIA^{Glc} (EIIA), adenilato ciclasa (AC), adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la proteína receptora de AMPc (Crp). Durante la internalización de glucosa, el grupo fosfato es transferido de P-EIIA^{Glc} hacia el azúcar a través del componente EIIBC. La transferencia del grupo fosfato implica que EIIA^{Glc} se encuentre en un estado desfosforilado, dado que el fosfato tiene que ser transferido para internalizar la fuente de carbono. El transporte de glucosa, a través del sistema PTS, demanda el consumo de fosfoenolpiruvato. Este hecho, desvía una parte del flujo de PEP hacia el sistema de transporte PTS y evita que se produzca ATP en la vía glucolítica, el cual es el precursor para la producción de AMPc. Se ha reportado que la expresión de genes involucrados en el metabolismo de azúcares no está asociada a los niveles de AMPc. Más bien, ello depende del estado fosforilado de EIIA^{Glc}, la relación de PEP a piruvato es el factor principal que controla el nivel de fosforilación de EIIA^{Glc} (Hogema *et al.*, 1998). Cuando EIIA^{Glc} no está fosforilado interacciona con permeasas de azúcares, que no utilizan el sistema PTS, como son lactosa, maltosa, melibiosa y rafinosa. Esta interacción bloquea la internalización de estas fuentes de carbono y en consecuencia evita que activen la expresión de genes implicados en su metabolismo. Este fenómeno que involucra el bloqueo de permeasas por EIIA^{Glc} se conoce como exclusión de inductor. En ausencia de glucosa, EIIA^{Glc} se encuentra predominantemente en estado fosforilado. Esto permite que P-EIIA^{Glc} active la enzima de

membrana AC, mediante la transferencia del grupo fosfato (Stülke y Hillen, 1999). P-AC cataliza la producción de AMPc a partir de ATP. El incremento en los niveles de AMPc activa a la proteína receptora de AMPc, Crp, lo cual forma el complejo AMPc-Crp. Este complejo activo reconoce secuencias promotoras y en consecuencia regula de forma positiva la expresión de genes y operones que codifican proteínas involucradas en el metabolismo de otros azúcares, cuya internalización no se realiza a través del sistema PTS, como son transportadores y enzimas. Como se ha descrito, la regulación de CCR se realiza mediante la modulación del estado fosforilado de EIIA^{Glc}, por lo que esta enzima desempeña un papel importante en el fenómeno de represión catabólica, junto con el regulador maestro Crp (Figura 2).

3.4. Sistemas de transporte de xilosa en *E. coli*

Existen tres vías diferentes por las que la xilosa es internalizada por *E. coli* (Figura 3). A continuación, se describen estas vías en orden de mayor a menor jerarquía.

La primera involucra un transportador de alta afinidad de tipo ABC, denominado transportador XylFGH. Este sistema consta de tres proteínas, XylF, XylG y XylH, codificadas en el operón xylFGH, el cual está regulado positivamente por XylR (Song y Park, 1997). La proteína XylF se encuentra soluble en el espacio periplásmico y se encarga de capturar xilosa y entregarla a la permeasa de membrana (Alhem *et al.*, 1982). El componente XylG es la proteína de unión ATP y se encuentra en la parte interna unida a la membrana. Por último, XylH es la proteína que está integrada a membrana y tiene actividad permeasa (Sofia *et al.*, 1994).

La segunda vía involucra la proteína XylE, el cual es un transportador que pertenece al sistema MFS. Se trata de un simporte de baja afinidad cuya actividad es impulsada por la fuerza protón motriz, es decir, la internalización de xilosa se lleva a cabo por un gradiente electroquímico de protones. La proteína XylE se encuentra codificada en el gen *xylE*, cuya expresión también está regulada por *xyIR*. (Luo *et al.*, 2014). Se ha evaluado el crecimiento de *E. coli* en cepas mutantes de los genes *xylG* y *xylE*, pero no de ambos. La eliminación de *xylG* disminuye el crecimiento celular 47% en condiciones aerobias con xilosa 40 mM, mientras que, en condiciones anaerobias con xilosa 60 mM, el crecimiento disminuye 84%. Bajo las mismas condiciones, se reportó que la eliminación del gen *xylE* disminuye el crecimiento celular 9% y

21%, respectivamente (Hasona *et al.*, 2004). Por otro lado, los valores de la constante de Michaelis-Menten, K_M , nos permiten comparar la afinidad que tienen estos transportadores por la xilosa. XylE tiene una K_M entre 63 y 169 μM , mientras que XylFGH tiene una K_M entre 0.2 y 4 μM (Sumiya *et al.*, 1995). Esto revela la importancia de XylFGH como la principal vía de transporte xilosa en *E. coli*.

La tercera vía fue reportada al observar que cepas mutantes de los dos sistemas principales de transporte de xilosa, XylFGH y XylE, aún eran capaces de transportar este azúcar. Esta vía la conforma un conjunto de transportadores que no son específicos para xilosa y sin embargo han demostrado capacidad de internalizarla. En este contexto, hay que destacar la diversidad de la naturaleza y por lo tanto de los diferentes mecanismos de transporte de los sistemas reportados. De forma análoga a los sistemas XylFGH y XylE, la arabinosa es internalizada por los transportadores AraFGH y AraE, aunque contrario a la xilosa, el transporte de arabinosa se realiza principalmente por el simporte de protones AraE. Ambos sistemas son capaces de reconocer a la xilosa e internalizarla (Desai y Rao, 2009). Por lo cual, este conocimiento ha permitido la expresión heteróloga de simportes AraE en *E. coli*, debido a la identidad que comparte su secuencia con XylE (Maiden *et al.*, 1987), para incrementar el consumo de xilosa durante la producción de metabolitos de valor agregado (Bai *et al.*, 2016). Además de internalizar galactosa y glucosa, GalP también es capaz de transportar xilosa (McDonald *et al.*, 1997), ya que su secuencia comparte 64% de identidad con el transportador AraE y 34% de identidad con XylE en *E. coli*. Por último, la permeasa GatC, la cual representa el componente EIIC del sistema PTS de galactitol, también ha demostrado capacidad de transporte xilosa (Utrilla *et al.*, 2012). Además de los transportadores inespecíficos que se citaron, también se ha sugerido la existencia de un mecanismo de transporte de xilosa por difusión a través de la membrana (Khankal *et al.*, 2008; Sacerdote y Szostak, 2005).

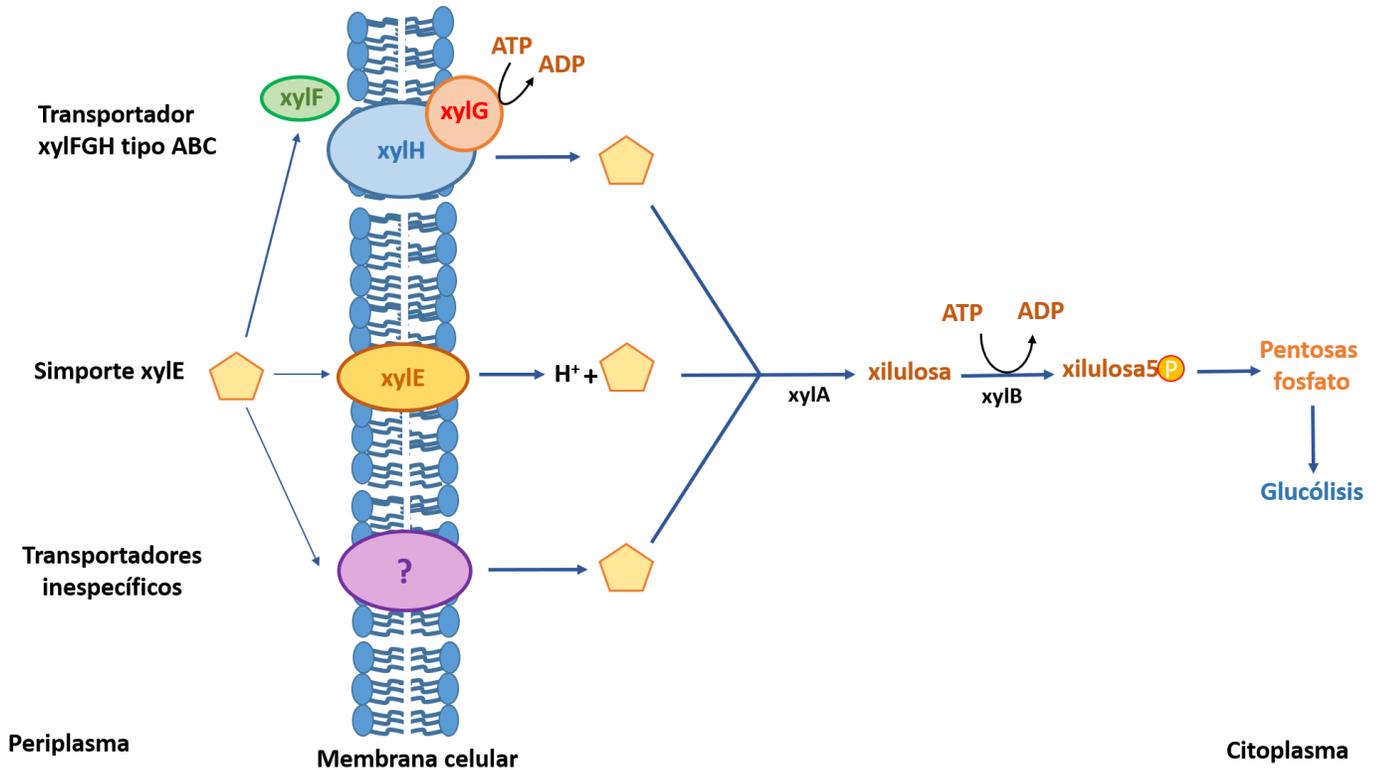


Figura 3. Internalización de xilosa a través de sus sistemas de transporte. XylFGH es un transportador de tipo ABC y es el principal sistema de internalización de xilosa en *E. coli*. XylE es un simporte de protones y es el segundo transportador de xilosa. Existen otros transportadores que no son específicos para la xilosa, pero pueden internalizarla como los de arabinosa, AraFGH y AraE.

3.5. Metabolismo de glucosa y xilosa en *E. coli*

El sistema de transporte PTS es el encargado de llevar a cabo la internalización de la glucosa, este azúcar entra al citosol de la bacteria como glucosa 6-fosfato. Cuando la glucosa es transportada a través de sistemas no PTS, su fosforilación se realiza en citosol por la enzima glucoquinasa, o también llamada Glk (Lunin *et al.*,2004). La fosforilación de la glucosa en el carbono seis, es una limitante para el metabolismo de esta fuente de carbono. En condiciones aerobias, el 76% de la glucosa 6-fosfato se metaboliza por vía de la glucólisis y el 24% restante por vía de las pentosas fosfato. Por el contrario, en condiciones anaerobias, el 92% de la

glucosa 6-fosfato se metaboliza por la vía de la glucólisis y el 8% restante por la vía de las pentosas fosfato (González *et al.*, 2017).

En el caso de la xilosa (Figura 3), su internalización principalmente se lleva a cabo por los transportadores XylFGH y XylE. Dentro de la bacteria, la xilosa es convertida en xilulosa por la xilosa isomerasa, enzima codificada en el gen *xyIA*. Posteriormente, la xilulosa es fosforilada en el carbono 5 por acción de la xiluloquinasa, enzima codificada en el gen *xyIB* (Jagtap y Rao 2018; Kim y Woo, 2018). La expresión de las 2 enzimas, codificadas en el operón *xyIAB*, es regulada de forma positiva por XylR (Song y Park, 1997). Sin importar las condiciones de oxigenación, la xilulosa 5-fosfato es metabolizada por las enzimas de la fase no oxidativa de la vía de las pentosas, para poder ingresar a la vía de la glucólisis como fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato (Desai y Rao, 2009).

4. Antecedentes

4.1. Eliminación de transportadores de xilosa y de glucosa en cepas de *E. coli* para el consumo de estas fuentes de carbono

La eliminación de transportadores de xilosa y de glucosa en cepas de *E. coli* es una estrategia que se ha llevado a cabo con el objetivo de optimizar el consumo de xilosa y de inhibir el mecanismo de CCR. Aunque también permite evaluar el grado en que un sistema de transporte contribuye al consumo de la fuente de carbono evaluada. En el caso de xilosa esta estrategia se ha aplicado en cepas productoras de ácido láctico y ácido succínico (Utrilla *et al.*, 2012; Khunnonkwao *et al.* 2018). Donde, debido a que el proceso de fermentación de xilosa tiene baja producción de ATP. La eliminación del transportador de tipo ABC, XylFGH, permite ahorrar equivalentes energéticos que son requeridos durante la fermentación, por lo que el crecimiento de la cepa incrementa. En otro trabajo, con la finalidad de desarrollar una cepa con capacidad disminuida de consumo de xilosa, se llevó a cabo la eliminación, de manera secuencial, de los genes *xylFGH*, *araH*, *xylE*, *araE*, *galP* y *gatC* en la cepa lactogénica CL3 (fondo genético MG1655 $\Delta pfIB \Delta frdA \Delta adhE$). Al evaluar los parámetros cinéticos del proceso de fermentación de xilosa, se observó que las eliminaciones de los genes *araH*, sobre el fondo genético CL3 $\Delta xylFGH$, y *galP*, sobre el fondo genético CL3 $\Delta xylFGH \Delta araH \Delta xylE \Delta araE$, conllevan a un incremento en las velocidades de crecimiento y de consumo de xilosa, en comparación con sus respectivas cepas antecesoras (Tabla 1). Los resultados sugieren que la eliminación de los genes *araH* y *galP* tienen un papel regulatorio en el transporte de xilosa en la cepa CL3 de *E. coli*. El incremento de los valores de la velocidad de crecimiento y la velocidad de consumo de xilosa reportados en la mutante del gen *araH* podría estar asociado al ahorro energético, ya que este transportador consume una molécula de ATP en la internalización de xilosa. En el caso del gen *galP*, el aumento de los valores en los mismos parámetros cinéticos que para la mutante *araH*, podría relacionarse con el flujo de protones que se pierde con la eliminación del transportador simporte GalP. Esta pérdida podría generar un gradiente de membrana que favorece la internalización de xilosa a través de otros transportadores inespecíficos aún no reportados (3ª vía de transporte).

Tabla 1. Cepas de mutantes de los transportadores de xilosa (Adaptado de Roncancio 2017). Valores promedio reportados de la fermentación de 40 g/L de xilosa en medio AM1 en condiciones no aireadas.

Parámetro	Cepa parental	Cepas obtenidas por eliminaciones secuenciales			
	CL3 (MG1655 $\Delta pflB \Delta frdA$ $\Delta adhE$)	CL3 $\Delta xyIFGH$	CL3 $\Delta xyIFGH$ $\Delta araH$	CL3 $\Delta xyIFGH$ $\Delta araH \Delta xyIE$ $\Delta araE$	CL3 $\Delta xyIFGH$ $\Delta araH \Delta xyIE$ $\Delta araE \Delta galP$
Velocidad de crecimiento μ (h^{-1})	0.096±0.003	0.061±0.018	0.138±0.026	0.063±0.006	0.098±0.011
Velocidad específica de consumo de xilosa, fase exponencial q_s (g xilosa /g DCW*h)	0.89±0.03	0.28±0.02	0.59±0.04	0.33±0.06	0.82±0.02

Por otro lado, mutantes de los componentes del sistema PTS, mediante la eliminación de los genes que codifican para algunos de sus componentes, ha permitido el desarrollo de cepas de *E. coli* que son capaces de consumir simultáneamente diferentes fuentes de carbono. En este sentido, de forma general se podría agrupar en dos las estrategias que se han utilizado para favorecer el consumo simultáneo de glucosa y xilosa. La primera estrategia tiene como objetivo eliminar el componente EIIBC^{Glc} del sistema PTS. Como ya se mencionó, esta proteína, codificada en el gen *ptsG*, tiene actividad de permeasa. Su eliminación incrementa los niveles de EIIA fosforilada, por lo que se inhibe el fenómeno de CCR. No obstante, la presencia de azúcares PTS, diferentes a la glucosa, estimulan la represión catabólica. La segunda estrategia implica la eliminación de los componentes globales o canónicos del sistema PTS. Los cuales son las proteínas EI, HPr y EIIA; codificadas en los genes *ptsI*, *ptsH* y *crr*, respectivamente. La eliminación de estos componentes globales suprime el fenómeno de CCR ejercido por cualquier azúcar que es transportada por el sistema PTS. Otra aplicación que tiene la eliminación del sistema PTS, es el redireccionamiento del flujo de fosfoenolpiruvato hacia la glucólisis y otras vías metabólicas. Se ha reportado que esto conlleva a la disminución de la producción de acetato en cepas de *E. coli* PTS⁻. Por lo que existe un mejor aprovechamiento de

los esqueletos de carbono, como por ejemplo en la producción de aminoácidos aromáticos (Escalante *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2016). No obstante, la eliminación de los componentes del sistema PTS^{Glc} conlleva a la disminución de las velocidades de consumo de glucosa y de crecimiento. Con el objetivo de recuperar las velocidades de crecimiento y de consumo de glucosa se han aplicado estrategias de sobreexpresión del simporte GalP junto con la enzima Glk. Esto ha permitido recuperar de forma significativa el consumo de glucosa (Hernández *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016). La evolución adaptativa representa una opción para revertir el fenotipo de consumo de glucosa bajo, además de que se puede obtener información de los mecanismos fisiológicos y los genes implicados en el consumo de glucosa en cepas PTS⁻. Ello es posible mediante la aplicación de ingeniería reversa, la cual se apoya de herramientas como la secuenciación, cuantificación de niveles de expresión de ARNm y fluxómica. Esto ha permitido discernir que la pérdida del gen *galR* se asocia a la recuperación de los parámetros ya mencionados en cepas de *E. coli* PTS⁻ glucosa⁺ (Aguilar *et al.* en 2012). Otros trabajos reportaron que mutaciones en los aminoácidos de la proteína GalR, los cuales son esenciales para el reconocimiento de la secuencia del ADN asociada a la región operadora, afectan la actividad represora de GalR y por lo tanto conlleva a la expresión del simporte GalP (McCloskey *et al.*, 2018).

4.2. Cepa JU15

La cepa JU15 de *E. coli* fue diseñada mediante la aplicación de herramientas de ingeniería metabólica y evolución adaptativa. A partir de la cepa MG1655, la eliminación de los genes *pflB*, *adhE* y *frdA* permitió obtener una cepa productora de ácido D-láctico con un rendimiento de producto cercano al 90 %. En este sentido, la eliminación de la enzima piruvato formato liasa, codificada en el gen *pflB*, aumenta la disponibilidad de piruvato intracelular; por otra parte, la eliminación de las enzimas alcohol deshidrogenasa, codificada en el gen *adhE*, y fumarato reductasa, codificada en el gen *frdA*, favorecen que el piruvato acumulado sea el único aceptor de electrones en condiciones de fermentación, por lo que la producción de ácido D-láctico es favorecida. Posteriormente, con la finalidad de mejorar el consumo de xilosa, se eliminó el operón *xyIFGH* y se realizó un proceso de evolución adaptativa de laboratorio.

Resultado de este proceso se obtuvo la cepa JU15 cuya secuenciación del genoma reveló la pérdida de un fragmento de 23.7 kb, la eliminación de los genes *midarpA* y una sustitución de la serina 184 por una leucina en el gen *gatC*. La mutación en el transportador de galactitol, GatC S184L, es la causa del transporte eficiente de xilosa. La cepa JU15 es capaz de producir ácido D-láctico, a partir de pentosas y hexosas, con un elevado rendimiento y productividad, cuyo fondo genético es MG1655 $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frdA \Delta xyIFGH::Km^R \Delta midarpA \Delta 23.7kb \text{ gatC S184L}$ (Utrilla, 2010). Para poder obtener mutantes de la cepa JU15, se eliminó el casete de resistencia a kanamicina que sustituía el operón *xyIFGH* (Numeral 13.5), por lo que la nueva cepa de trabajo se describe como JU15*.

5. Justificación

El uso de xilosa o mezclas de glucosa-xilosa como fuentes de carbono, obtenidas a partir de residuos lignocelulósicos, tienen una limitante durante la producción fermentativa de ácidos orgánicos. Esto es debido al bajo consumo de xilosa y al fenómeno de represión catabólica por la glucosa en *E. coli*. Por lo que, se requiere diseñar nuevas estrategias enfocadas al consumo y procesamiento de xilosa, así como el desarrollo de cepas que puedan consumir de forma simultánea mezclas de glucosa-xilosa. La caracterización del consumo de azúcares en cepas que tienen eliminados genes que codifican transportadores o proteínas reguladoras, permitirá obtener información acerca de los mecanismos implicados en la internalización de estas fuentes de carbono. Con base en lo descrito en los antecedentes, la caracterización del efecto que tiene la eliminación de los genes *araH* y *galP* sobre consumo de xilosa en la cepa JU15* de *E. coli*, así como, la caracterización del efecto que tiene la eliminación de los genes *ptsG* y *galR* sobre el consumo de glucosa y la mezcla glucosa-xilosa. Representa una oportunidad para la comprensión del consumo de estos azúcares.

6. Hipótesis

La eliminación de los genes *araH* y *galP* incrementará las velocidades específicas de crecimiento y de consumo de xilosa en la cepa JU15* de *E. coli*. Por otra parte, la eliminación del componente PtsG, del sistema de transporte PTS, seguido de la eliminación del gen regulador *galR* permitirá el consumo simultáneo de glucosa y xilosa, así como un incremento en la velocidad de consumo de glucosa.

7. Objetivos

7.1. Objetivo General

Obtener cepas mutantes de *E. coli* JU15* que presenten un incremento en la velocidad de consumo de xilosa o un consumo simultáneo de glucosa-xilosa durante el proceso fermentativo para la producción de ácido D-láctico.

7.2. Objetivos Específicos

- ❖ Construir cepas de *E. coli* JU15* carentes de los transportadores inespecíficos de xilosa: JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$.
- ❖ Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de la fermentación de xilosa a ácido D-láctico con la finalidad de evaluar el consumo de esta fuente de carbono, en las cepas JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$.
- ❖ Construir cepas de *E. coli* JU15* carentes del componente *ptsG* del sistema de transporte PTS y *galR*: JU15* $\Delta ptsG$ y JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$.
- ❖ Evaluar el consumo de glucosa-xilosa y solamente glucosa, mediante la determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de la fermentación de glucosa y mezclas de estos azúcares para la producción de ácido D-láctico, en las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$ y JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$.

8. Metodología

8.1. Cepas, cebadores y plásmido utilizados

Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
JU15	MG1655 $\Delta pfIB \Delta adhA \Delta pfIB \Delta xyIFGH$ $\Delta reg 27.3 kb gatC S184L$	Utrilla <i>et al.</i> , 2012
JU15* $\Delta araH$	JU15* $\Delta araH::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta galP$	JU15* $\Delta galP::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta araH \Delta galP$	JU15* $\Delta araH::FRT \Delta galP::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta gatC S184L$	JU15* $\Delta gatC S184L::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta araH \Delta gatC S184L$	JU15* $\Delta araH::FRT \Delta gatC S184L::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta galP \Delta gatC S184L$	JU15* $\Delta galP::FRT \Delta gatC S184L::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC S184L$	JU15* $\Delta araH::FRT \Delta galP::FRT \Delta gatC S184L::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta ptsG$	JU15* $\Delta ptsG::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta ptsG$ variante	JU15* $\Delta ptsG::Km^R$ variante	Este trabajo
JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$	JU15* $\Delta ptsG::FRT \Delta galR::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$	JU15* $\Delta ptsG::FRT$ variante $\Delta galR::Km^R$	Este trabajo
JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada	JU15* $\Delta ptsG::Km^R$ evolucionada	Este trabajo

Tabla 3. Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Referencia
araH Fw	ATCACTTGCGGTTGCCAGTA	Este trabajo
araH Rv	TGCCGATCACACATTCGTT	
galP Fw	GATGCTGCCGGTCTGAAGTA	Este trabajo
galP Rv	CCGCAGTGAACACAGCGATA	
ptsG Fw	TGGATCGTTACTGGTGGAAAC	Este trabajo
ptsG Rv	CGACAACCTGGCAGCTGACATTT	
galR Fw	AACCCGAAGTTGACTTCACC	Este trabajo
galR Rv	GGGCGATGTCTTTACCCAGC	
gatC Fw	TCTACGATGGCGGCGGAAGA	José Utrilla, 2010
gatC Rv	CATCACGCCGCGAGCCAATA	
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Datsenko y Warner, 2000
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
k3	CTGACCGCTTCCTCGTGCTT	

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % teñidos con bromuro de etidio (tinción 1:10000) y se utilizó como referencia de peso molecular la escalera de 1 kb marca INVITROGEN. Los geles se revelaron con un equipo fotodocumentador marca BIO-RAD modelo GelDoc XR+.

Tabla 4. Plásmido utilizado en este trabajo.

Plásmido	Característica	Referencia
pCP20	Plásmido termosensible que codifica para la FLP recombinasa	Datsenko y Warner 2000

8.2. Construcción de las cepas

La construcción de las cepas derivadas de *E. coli* JU15* se llevó a cabo por el método de transducción con fagos. La colección KEIO (Baba *et al.*, 2006) se utilizó como cepa donadora (Tabla 5), mientras que el fago P1 fue empleado como vector para transferir el material genético de dicha colección a la cepa receptora.

Tabla 5. Cepas donadoras utilizadas en la transducción con fagos.

Cepa KEIO	Genotipo
ECK1897	MG1655 $\Delta araH::Km^R$
ECK2938	MG1655 $\Delta galP::Km^R$
ECK1087	MG1655 $\Delta ptsG::Km^R$
ECK2835	MG1655 $\Delta galR::Km^R$
ECK2085	MG1655 $\Delta gatC::Km^R$

Las cepas de la colección KEIO tienen sustituido el gen de interés por un gen que confiere resistencia a kanamicina (Km^R), el cual se encuentra flanqueado por sitios FRT (Flp recognition target); por este motivo, las colonias obtenidas por transducción fueron seleccionadas en placas de agar LB (el medio Luria Broth contiene: 5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de bacto triptona y 10 g/L de NaCl) con kanamicina a una concentración final de 30 mg/L (km^{30}).

Las colonias que crecieron sobre el agar LB con kanamicina fueron elegidas al azar y mediante PCR, a partir de una muestra de ADN cromosomal, se comprobó que el tamaño del producto obtenido correspondiera al fragmento del gen que fue sustituido por el casete de resistencia de kanamicina.

Para la producción de las mutantes dobles o triples, las cepas parentales fueron transformadas con el plásmido termosensible pCP20, con el objetivo de eliminar el gen de resistencia a kanamicina. La comprobación fenotípica de la pérdida del casete de resistencia se evaluó en placas de agar LB y LB con km^{30} . La comprobación genotípica se hizo por tamaño del producto de PCR. La eliminación del plásmido pCP20 se hizo mediante una serie de pases en placas de

agar LB y LB con carbenicilina 100 mg/L que fueron incubados a 37 °C y 42 °C. Las cepas mutantes JU15* $\Delta gen::FRT$, ya sin el casete de resistencia, se utilizaron como cepas receptoras para la construcción de las mutantes dobles y triples.

8.3. Medios de cultivo, condiciones y evaluación de las cepas mutantes

a. Medio de cultivo

El medio AM1 es un medio mineral compuesto por 2.63 g/L $(NH_4)_2HPO_4$, 0.87 g/L $NH_4H_2PO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 mM, solución de elementos traza 1.5 mL/L, KCl 2.0 mM y Betaína 1.0 mM. La solución de los elementos traza contiene por litro: 1.6g $FeCl_3$, 0.2g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.1g $CuCl_2$, 0.2g $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.2g Na_2MoO_4 , 0.05g H_3BO_3 y 0.33g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Martínez *et al.*, 2007).

b. Condiciones de cultivo en los minifermentadores

Todos los cultivos se realizaron en minifermentadores con un volumen de trabajo de 200 mL de medio mineral AM1 suplementado con citrato de sodio 0.1 g/L y con su respectiva fuente de carbono, glucosa, xilosa o mezcla glucosa-xilosa, según sea el caso. Las condiciones estándar fueron: 37 °C de temperatura, 150 rpm de agitación, sin aireación (no se midió oxígeno disuelto del cultivo) y con control de adición de KOH 2 N para mantener el pH a 7.0.

c. Preparación de stocks de criviales de las cepas

A partir de una placa de agar LB con colonias de la cepa de interés, se seleccionó una colonia y se inoculó en un tubo de cultivo de 16 x 150 con 4 mL de LB, se añadió kanamicina a una concentración final de 30 mg/L (sólo para las cepas con gen de resistencia a este antibiótico) y se incubó a 37 °C y 300 rpm de velocidad de agitación durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, el cultivo se encontraba saturado y se inoculó todo el contenido en un minifermentador con medio mineral AM1 suplementado con glucosa o xilosa, en una concentración de 20 g/L. Se adicionó kanamicina para tener una concentración final de 30 $\mu g/mL$ en el medio de cultivo, sólo para las cepas con gen de resistencia a este antibiótico. En un período de 14 horas, bajo las condiciones estándar ya descritas, los cultivos alcanzaron aproximadamente 1.0 D.O._{600nm}. Se centrifugaron 25 mL de medio a 6000 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente. Se desecharon 20 mL del sobrenadante y el botón celular se resuspendió en los 5 mL restantes.

De esta suspensión del paquete celular se tomó un volumen 0.8 mL, el cual se mezcló (mediante agitación vigorosa en vortex) con 0.8 mL de glicerol al 80 % en un vial y se dejó en hielo seco hasta congelación, los crioviales se resguardaron a -70°C .

d. Preparación de cultivo para el inóculo

Para la elaboración de los inóculos se adicionó todo el contenido de un criovial a un minifermentador con 200 mL de medio mineral AM1 suplementado con glucosa o xilosa, en una concentración de 20 g/L. Sólo para las cepas con casete de resistencia a kanamicina, el medio de cultivo fue suplementado con kanamicina para tener una concentración final de 30 $\mu\text{g/mL}$. Los inóculos iniciaron con alrededor de 0.01 D.O._{600nm} y se dejaron en incubación, en las condiciones estándar ya descritas, hasta que la biomasa producida alcanzó entre 0.5 a 1.5 D.O._{600nm} (depende de la mutante utilizada). Transcurrido este tiempo, los inóculos se centrifugaron a 6000 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y el botón de células fue resuspendido con 15 mL de medio mineral AM1 fresco. Este medio fue tomado del que ya se encontraba depositado en el minifermentador donde se llevaría a cabo el pase de células para la fermentación. Por lo que el volumen inicial de 200 mL no se modificó en los minifermentadores para las cinéticas.

e. Preparación de cultivo para la fermentación

Todos los cultivos para la producción de ácido D-láctico iniciaron a una concentración celular de aproximadamente 0.037 g_{DCW} /L (0.1 D.O._{600nm}) y medio mineral AM1 suplementado con 40 g/L de fuente de carbono (glucosa, xilosa) o una mezcla glucosa-xilosa (20 g/L de cada azúcar). No se adicionó antibiótico en ningún caso. En las fermentaciones de glucosa y de glucosa-xilosa se utilizaron inóculos con glucosa y en las fermentaciones de xilosa los inóculos se hicieron con xilosa. El tiempo de cinética fue de 48 h bajo condiciones estándar. Las primeras 14 h de fermentación se tomaron muestras cada 2 h y posteriormente solo se tomó muestra a las 24, 36 y 48 h. Al momento se determinó D.O._{600nm} de las muestras y alrededor de 1 mL de cada muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 1.5 minutos. El sobrenadante de la muestra centrifugada fue congelado para su posterior análisis.

8.4. Métodos analíticos

a. Concentración celular

La concentración celular de los cultivos fue cuantificada como densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, con un espectrofotómetro de marca Thermo Scientific (modelo Genesys 10S UV-VIS). La densidad óptica fue convertida en peso seco. Para este proyecto 1.0 D.O._{600nm} equivale a 0.37 g_{DCW}/L.

b. Cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos

La cuantificación de xilosa, glucosa, ácido láctico, ácido acético y ácido succínico se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución con una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad). Las condiciones de corrida fueron 50 °C de temperatura y un flujo de 0.5 mL/min con fase móvil 5 mM de ácido sulfúrico. La detección de los compuestos se hizo de manera simultánea con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). La determinación se realizó mediante la comparación de las áreas bajo la curva de los analitos y los estándares, éstos últimos a diferentes concentraciones. Para el análisis y procesamiento de los cromatogramas fue utilizado el software Empower 2. Los sobrenadantes, antes de ser analizados, fueron diluidos (1:5 y 1:10) en fase móvil y filtrados en membranas de 0.45 µm.

c. Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos

Todos los resultados obtenidos se corrigieron con un factor de dilución (Fd). Este valor corresponde al volumen de KOH 2 N añadido en cada tiempo de muestreo. Para la siguiente fórmula, el volumen inicial corresponde a 200 mL.

$$Fd = (\text{volumen inicial} + \text{volumen KOH 2N añadido}) / \text{volumen inicial}$$

El Fd de cada tiempo se multiplicó por cada resultado obtenido, correspondiente a ese mismo tiempo.

$$\text{Variable (x)} = \text{Variable (x)}_t (\text{g}_{\text{CDW}}/\text{L}) * Fd_t$$

Donde la Variable (x) puede ser la Biomasa, Xilosa, Glucosa o Ácido D-láctico u otro producto del metabolismo de las cepas de *E. coli* usadas.

Corregidos los valores, se procedió al cálculo de los parámetros. La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó durante la fase exponencial de crecimiento, como criterio se utilizó un coeficiente de correlación mayor a 0.98 en las pendientes.

- Velocidad específica de consumo de sustrato en la fase exponencial ($q_{s \text{ exp}}$)

$$q_{s \text{ exp}} = \mu / Y_{x/s \text{ exp}}$$

μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

$Y_{x/s \text{ exp}}$ = rendimiento de biomasa con respecto al sustrato durante la fase exponencial

- Velocidad específica de producción en la fase exponencial ($q_{p \text{ exp}}$)

$$q_{p \text{ exp}} = \mu * Y_{p/s \text{ exp}}$$

$Y_{p/s \text{ exp}}$ = rendimiento del producto con respecto al sustrato durante la fase exponencial

- Velocidad específica de consumo de sustrato en la fase estacionaria ($q_{s \text{ est}}$)

$$q_{s \text{ est}} = \text{g de sustrato consumido en fase estacionaria} / (t * X_{\text{prom}})$$

t = tiempo de la fase estacionaria (h)

X_{prom} = promedio de la biomasa en la fase estacionaria ($g_{DCW/L}$)

- Velocidad específica de producción en la fase estacionaria ($q_{p \text{ est}}$)

$$q_{p \text{ est}} = \text{g de producto obtenido en la fase estacionaria} / (t * X_{\text{prom}})$$

- Productividad volumétrica

Q_p = g de producto / volumen L * tiempo de fermentación (tiempo al cual se agotan los azúcares o se llega a la máxima concentración del producto) ($g / L * h$)

- Rendimiento global

$Y_{p/s}$ = g de producto obtenido / g de sustrato consumido

9. Resultados y discusión

9.1. Evaluación de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, en medio AM1 con xilosa

Para cada una de las cepas se preparó un inóculo con xilosa a una concentración de 20 g/L. La biomasa que se produjo en el inóculo se transfirió a un cultivo para la fermentación de 40 g/L de xilosa. En este último, se evaluó por triplicado el consumo de xilosa para la producción de ácido D-láctico. La biomasa que se transfirió a los tres cultivos de la fermentación se obtuvo a partir de un solo inóculo. Esta operación se realizó para las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$. Los resultados de los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la Tabla 6 y las Figuras 4 y 5.

Tabla 6. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, medio AM1 con 40g/L de xilosa.

Parámetro	Cepas			
	JU15*	JU15* $\Delta araH$	JU15* $\Delta galP$	JU15* $\Delta araH \Delta galP$
Velocidad específica de crecimiento: μ (h^{-1})	0.19±0.10	0.21±0.02	0.21±0.01	0.19±0.00
Rendimiento				
$Y_{p/s}$ (g D-láctico/g xilosa)	0.91±0.06	0.91±0.02	0.88±0.04	0.90±0.02
Velocidad específica de consumo de xilosa				
q_s (g xilosa /g DCW*h)	2.00±0.21	3.23±0.17	3.18±0.91	3.13±1.23
Velocidad específica de formación de producto				
q_p (g D-láctico/g DCW*h)	3.12±0.20	3.32±0.34	3.38±0.47	3.32±0.73
Consumo volumétrico				
Q_s (g xilosa /L*h), 48 h	0.77±0.00	0.79±0.00	0.75±0.01	0.74±0.02
Productividad volumétrica				
Q_p (g D-láctico/L*h), 48 h	0.72±0.04	0.74±0.01	0.70±0.03	0.72±0.02

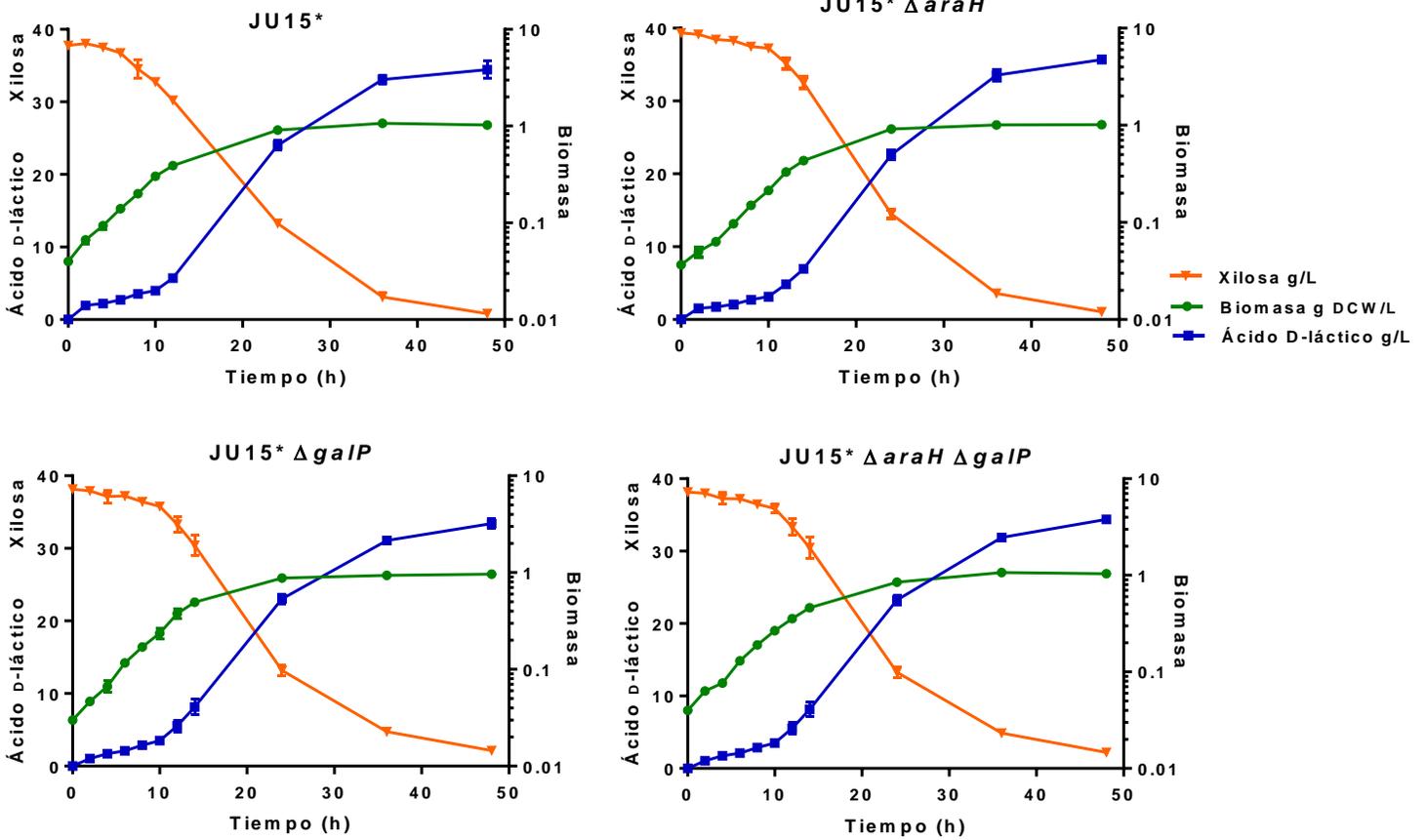


Figura 4. Cinética de crecimiento, consumo de xilosa y producción de ácido D-láctido de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, medio AM1 con 40 g/L de xilosa.

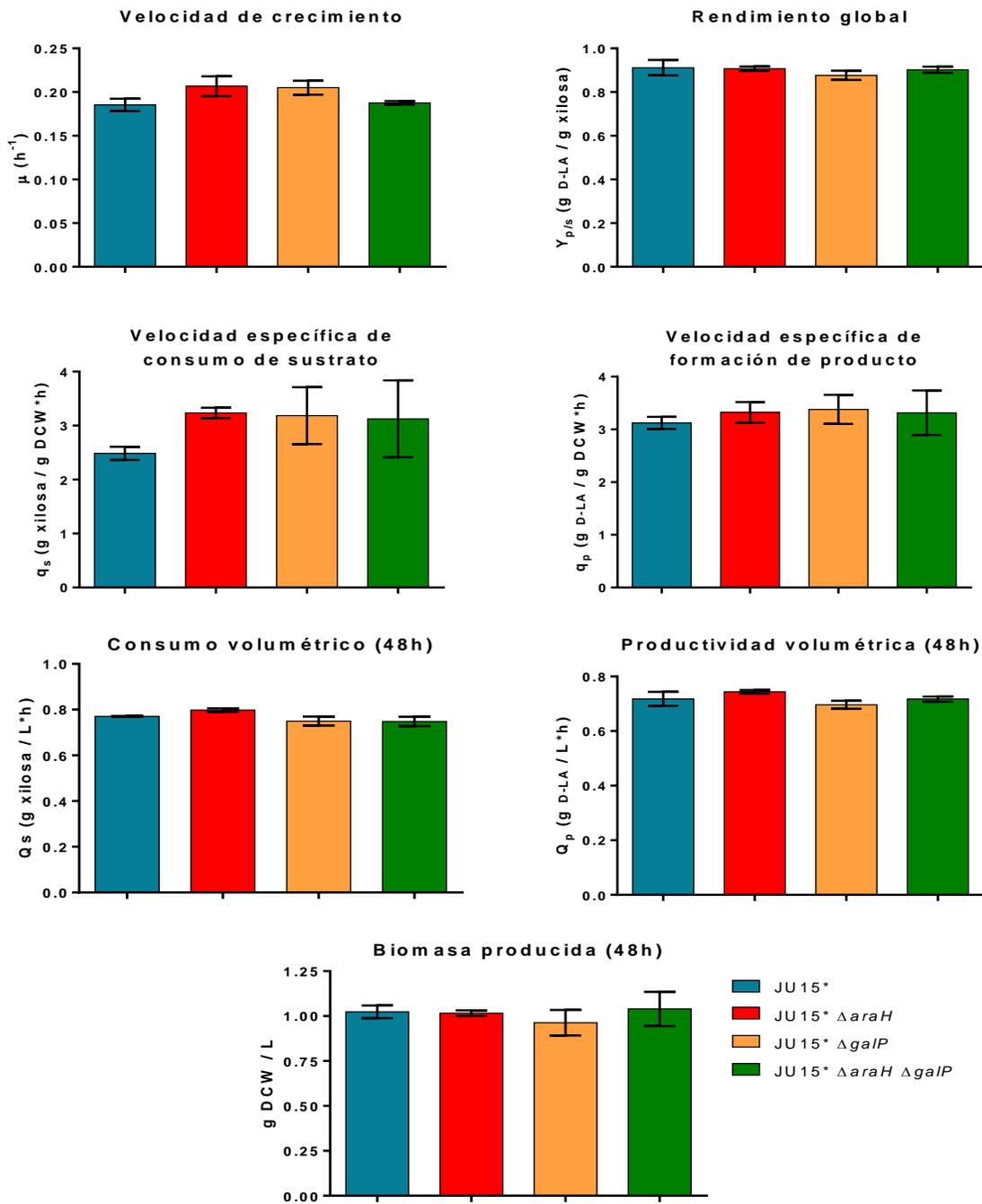


Figura 5. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, medio AM1 con 40g/L de xilosa.

Los valores de velocidad de crecimiento para las mutantes del gen *araH*, JU15* $\Delta araH$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, y de la cepa control JU15* se mantuvieron entre 0.19 y 0.21 h⁻¹. Respecto a la velocidad de consumo de xilosa entre las cepas mutantes del gen *araH* y la cepa JU15* no se observaron cambios significativos. Debido a que la cepa JU15 se obtuvo a partir de un proceso de evolución adaptativa en xilosa, un perfil de ARN mensajeros nos sugeriría si los niveles de expresión del operón *araFGH*, el cual codifica el transportador AraFGH de tipo ABC, se encuentran reprimidos. En caso de que este transportador no se encuentre expresado en las condiciones de experimentación, no habría ahorro de ATP, debido a que no hay internalización de xilosa a través de este sistema. Como consecuencia, no existe un incremento en la velocidad de crecimiento durante el proceso de fermentación, tal como ha sido reportado en otras cepas con la eliminación de transportadores de tipo ABC (Hasona *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2017; Khunnonkwao *et al.* 2018). Con relación a la eliminación del gen *galP*, en las cepas JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$ no se observaron cambios en las velocidades de crecimiento y de consumo de xilosa en comparación con la cepa JU15* (Tabla 6). En este sentido no se ha descrito un mecanismo que justifique el aumento de consumo de xilosa a partir de la eliminación del gen *galP*. No obstante, existe evidencia experimental en donde la eliminación de sistemas de transporte alternativo para un azúcar, en ocasiones beneficia su consumo (Fuentes, 2013). Suponemos que, en este tipo de fenotipos reportados la epistasis juega un papel importante (de Visser *et al.*, 2011), ya que los sistemas de transporte de azúcares comparten la misma red de metabólica. Los resultados que reportó Roncancio (Tabla 1) sugieren que posiblemente el gen *galP* o el transportador GalP tienen un papel regulatorio, todavía no reportado, sobre el metabolismo de xilosa. La eliminación de los genes *araH*, *galP* y la forma combinada, *araH-galP*, no tienen efectos sobre la velocidad de crecimiento y la velocidad de consumo de xilosa en la cepa JU15*.

Respecto a los demás parámetros calculados, el consumo volumétrico se mostró sin variación para todas las cepas evaluadas, entre 0.74 y 0.77 g_{xilosa}/L*h; a las 48 horas de cinética quedaba menos de 1 g/L de xilosa de los 40 g/L iniciales. Por tratarse de un proceso fermentativo, la conversión de sustrato fue baja para la biomasa y elevada para el ácido D-láctico. Para todas las cepas evaluadas se generó alrededor de 1 g_{DCW}/L durante las primeras

24 horas de cultivo y el rendimiento de ácido D-láctico fue alrededor de 90 % con títulos cercanos a los 36 g/L de ácido D-láctico y una productividad volumétrica cercana de 0.70 g ácido D-láctico /L*h. En este sentido, además de que los genes eliminados, *pflB*, *adhE* y *frdA*, propiciaron la producción de ácido D-láctico en la cepa JU15* (Numeral 4.2), también se debe considerar que la regeneración del poder reductor en la bacteria está acoplada a la producción de este ácido orgánico, es por ello su alto rendimiento y producción. Debido al tiempo de fermentación de 48 horas y la cantidad de ácido D-láctico que se obtuvo, la xilosa representa un azúcar alternativo a la glucosa, ya que la cepa JU15* lo biotransforma eficientemente. Por otra parte, debido a que el transportador GatC S184L juega un papel importante en la internalización de xilosa, ya que la eliminación del gen *gatC S184L* en la cepa JU15 disminuye 50 % su velocidad de crecimiento (Utrilla *et al.*, 2012). Se optó por eliminar el gen *gatC S184L* en la cepa JU15* y en cada una de las mutantes generadas con el objetivo de evaluar si la presencia de este transportador evita que se perciban cambios sobre las velocidades de crecimiento y de consumo de xilosa por efecto de la eliminación de los genes *araH* y *galP* y también para evaluar cómo contribuye el transportador GatC S184L en la internalización de xilosa en la cepa JU15*. El proceso de eliminación de este gen se describe en el Numeral 13.2 de los Anexos.

9.2. Evaluación de las cepas JU15* $\Delta gatC$ S184L, JU15* $\Delta araH \Delta gatC$ S184L, JU15* $\Delta galP \Delta gatC$ S184L y JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC$ S184L, en medio AM1 con xilosa

Para cada una de las cepas se preparó un inóculo con xilosa a una concentración de 20 g/L. La biomasa que se produjo en el inóculo se transfirió a un cultivo para la fermentación de aproximadamente 40 g/L de xilosa. En este último, se evaluó por triplicado el consumo de xilosa para la producción de ácido D-láctico. La biomasa que se transfirió a los tres cultivos de la fermentación se obtuvo a partir de un solo inóculo. Los resultados de los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en las Figuras 6 y 7 y en la Tabla 7.

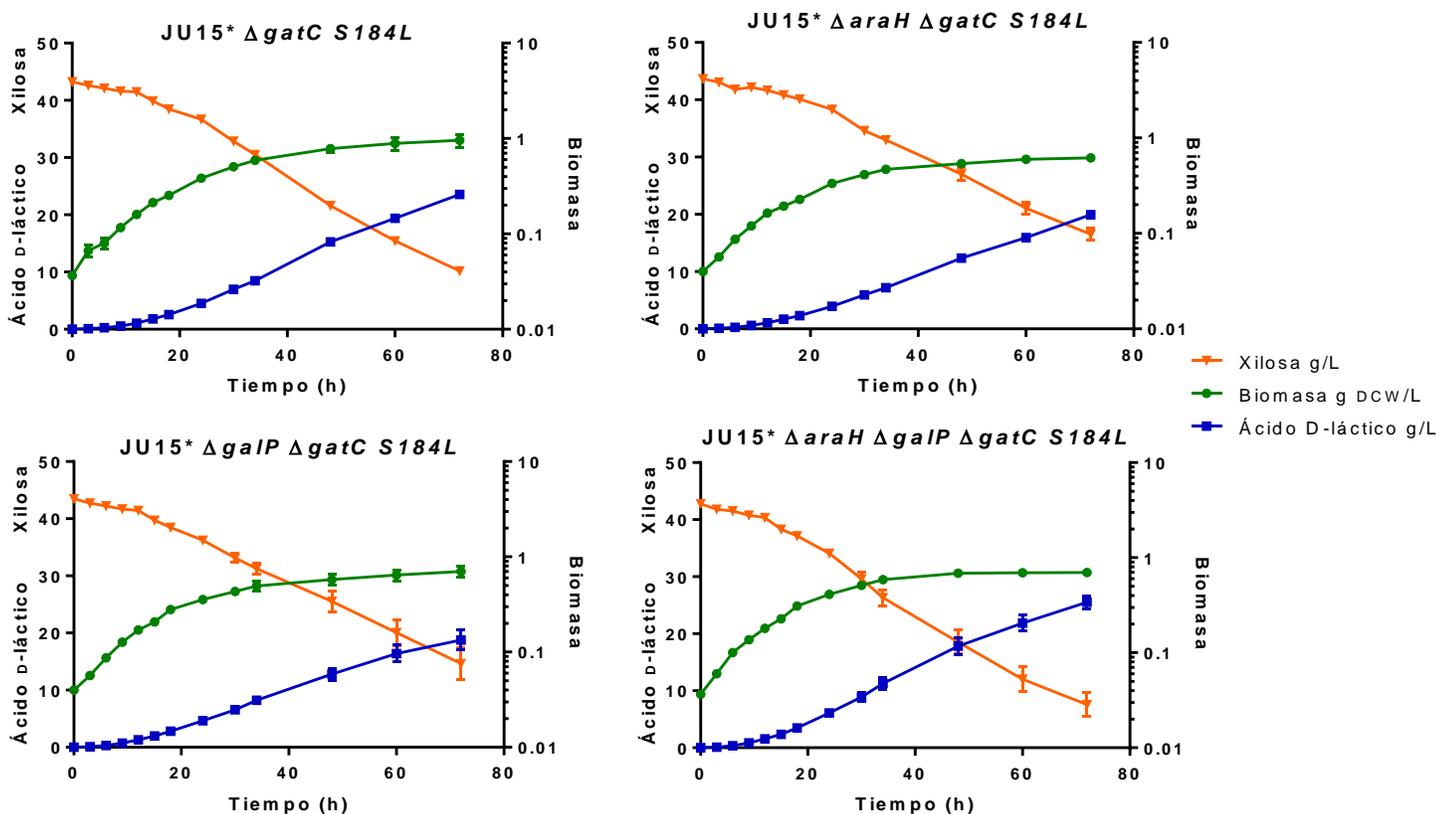


Figura 6. Cinética de crecimiento, consumo de xilosa y producción de ácido D-láctico de las cepas JU15* $\Delta gatC$ S184L, JU15* $\Delta araH \Delta gatC$ S184L, JU15* $\Delta galP \Delta gatC$ S184L y JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC$ S184L, medio AM1 con 43 g/L de xilosa.

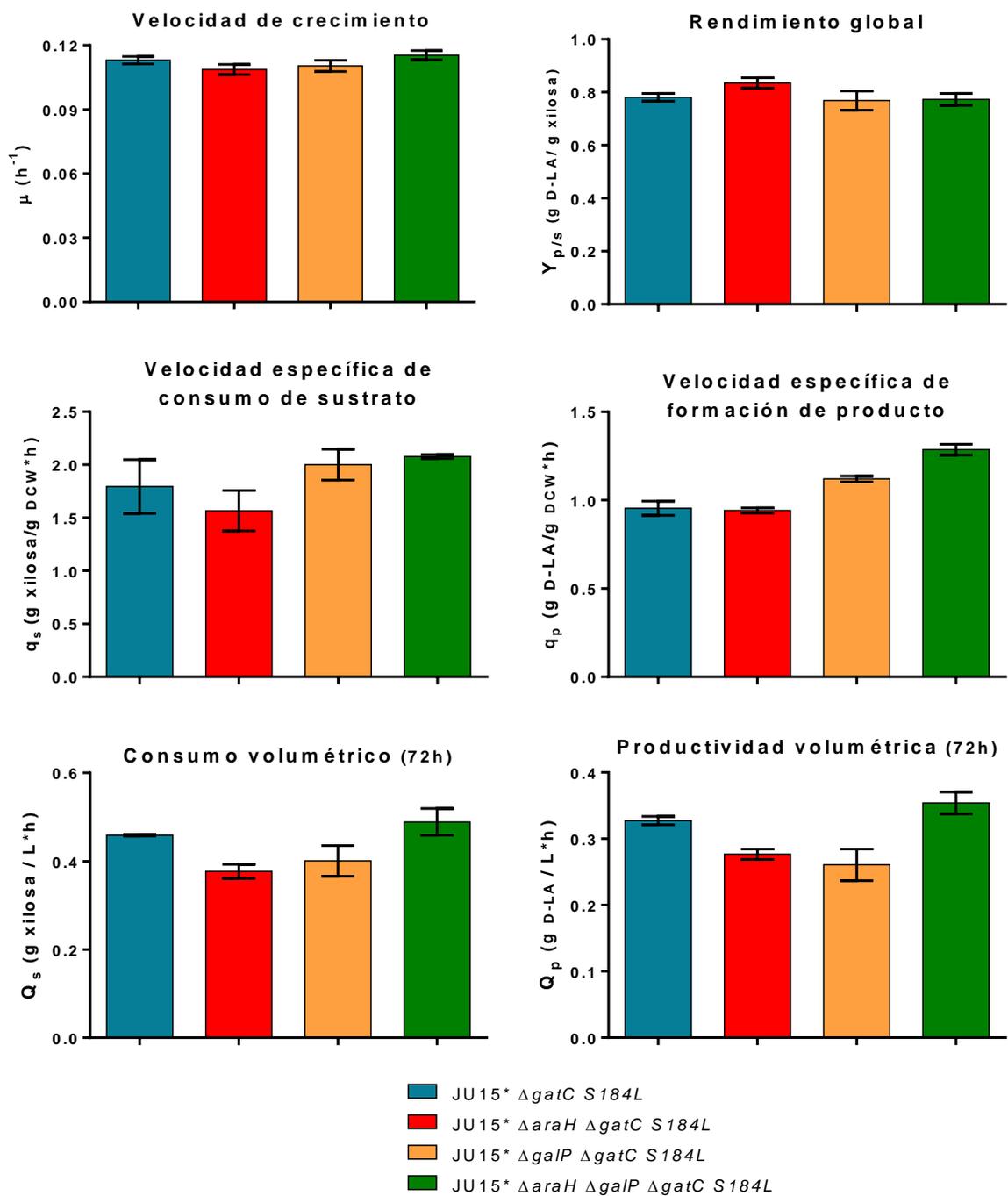


Figura 7. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15* $\Delta gatC$ S184L, JU15* $\Delta araH$ $\Delta gatC$ S184L, JU15* $\Delta galP$ $\Delta gatC$ S184L y JU15* $\Delta araH$ $\Delta galP$ $\Delta gatC$ S184L, medio AM1 con 43 g/L de xilosa.

Tabla 7. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas mutantes del gen *gatC S184L*, medio AM1 con 43 g/L de xilosa.

Parámetro	Cinética de las mutantes del gen <i>gatC S184L</i>			
	JU15* <i>ΔgatC S184L</i>	JU15* <i>ΔaraH</i> <i>ΔgatC S184L</i>	JU15* <i>ΔgalP</i> <i>ΔgatC S184L</i>	JU15* <i>ΔaraH ΔgalP</i> <i>ΔgatC S184L</i>
Velocidad específica de crecimiento: μ (h^{-1})	0.11±0.00	0.10±0.00	0.11±0.00	0.11±0.00
Rendimiento $Y_{p/s}$ ($\text{g}_{\text{D-láctico}}/\text{g}_{\text{xilosa}}$)	0.78±0.02	0.83±0.03	0.76±0.06	0.77±0.03
Velocidad específica de consumo de xilosa q_s ($\text{g}_{\text{xilosa}}/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$)	1.79±0.44	1.56±0.33	2.00±0.25	2.07±0.03
Velocidad específica de formación de producto, q_p ($\text{g}_{\text{D-láctico}}/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$)	0.95±0.06	0.94±0.02	1.12±0.02	1.28±0.05
Consumo volumétrico Q_s ($\text{g}_{\text{xilosa}}/\text{L}\cdot\text{h}$), 72 h	0.45±0.01	0.37±0.02	0.40±0.06	0.48±0.05
Productividad volumétrica Q_p ($\text{g}_{\text{D-láctico}}/\text{L}\cdot\text{h}$), 72 h	0.31±0.00	0.27±0.01	0.26±0.04	0.35±0.02

La evaluación del consumo de xilosa en las mutantes del gen *gatC S184L* se hizo mediante el cálculo de la velocidad específica de consumo de sustrato. Las cepas JU15* *ΔgalP ΔgatC S184L* y JU15* *ΔgalP ΔaraH ΔgatC S184L* tuvieron una velocidad de consumo de xilosa de 2.00 y 2.07 $\text{g}_{\text{xilosa}}/\text{g}_{\text{DWC}}\cdot\text{h}$, respectivamente. Lo cual representa un incremento en comparación con la cepa JU15* *ΔgatC S184L*, cuya velocidad fue de 1.79 $\text{g}_{\text{xilosa}}/\text{g}_{\text{DWC}}\cdot\text{h}$. Con la finalidad de concluir si este incremento se debe a la eliminación del gen *galP*, a los resultados obtenidos se les aplicó la prueba estadística ANOVA y se concluyó que no hay diferencias significativas entre las velocidades específicas de consumo de xilosa de las mutantes (ver Anexos). Esta conclusión se basó en que la F calculada es menor que la F de tablas ($F_c 1.72 < F_t 4.06$). Dado que no existen diferencias significativas en la velocidad específica de consumo de xilosa no se observó variación en la velocidad de crecimiento, para todas las cepas fue alrededor de 0.11 h^{-1} (Tabla 7). No se encontró evidencia que sustentara que el transportador GatC S184L encubría el efecto de incremento en la velocidad de

crecimiento y consumo de xilosa a partir de la eliminación de los genes *araH* y *galP* en la cepa JU15*.

Por otra parte, la eliminación del gen *gatC S184L* en las cepas JU15* Δ *araH*, JU15* Δ *galP* y JU15* Δ *galP* Δ *araH* disminuyó aproximadamente 33 % su velocidad específica de consumo de xilosa y 45 % su velocidad de crecimiento (Tabla 6 y 7). Respecto a la cepa JU15*, la eliminación del gen *gatC S184L* no mostró cambios en la velocidad específica de consumo de xilosa. Sin embargo, se observó que disminuyó 70 % la velocidad de formación de producto y 40 % la velocidad de crecimiento (Tabla 8). Esto sugiere que el valor de velocidad de consumo de xilosa para la cepa JU15* está subestimado y por lo tanto esta cepa tiene una mayor capacidad de consumo que la cepa JU15* Δ *gatC S184L*. De modo que, los resultados de las mutantes *gatC S184L* evaluadas (Tabla 7) indican que el transportador GatC S184L juega un papel importante en la internalización de xilosa en estas cepas.

Todas las mutantes del gen *gatC S184L* tuvieron una velocidad promedio de crecimiento de 0.11 h⁻¹ (Tabla 7). De acuerdo con esto, los transportadores XyleE y AraE podrían ser los sistemas que internalicen xilosa en estas cepas, lo que les permite tener crecimiento. Esto resalta la importancia de los transportadores que utilizan gradiente electroquímico, como es el caso de los simportes de protones XyleE y AraE, ya que no requieren consumir ATP para la internalización de fuentes de carbono. Con relación a las curvas de crecimiento, las mutantes *gatC S184L* no presentaron fase lag o período de adaptación. No obstante, su fase pre estacionaria tuvo una duración de 19 horas con una velocidad de 0.04 h⁻¹, mientras que el período de la fase de crecimiento exponencial fue de 15 horas con una velocidad de 0.11 h⁻¹. Este comportamiento en la curva de crecimiento responde a la baja capacidad de consumo de xilosa en las cepas.

La eliminación del gen *gatC S184L* propició la producción de ácido fórmico. Este compuesto no se cuantificó en las cepas con genotipo *gatC S184L*⁺, ya que la cepa parental JU15* tiene eliminado el gen *pflB*, el cual codifica para la enzima piruvato formato liasa, responsable de convertir el piruvato en formato y acetilCoA bajo condiciones anaerobias. En este sentido, se ha reportado actividad piruvato formato liasa en la enzima α -ceto butirato formato liasa, codificada en el gen *tdcE* (Jantama *et al.*, 2008). Debido a que las enzimas TdcE y PflB comparten 82 %

de identidad en sus secuencias (Hesslinger *et al.*, 1998) es probable que la enzima TdcE sea la responsable de producir ácido fórmico en las mutantes del gen *gatC S184L*. Se observó en las cepas que el ácido fórmico se produjo durante las últimas 12 horas de la fermentación y se obtuvieron títulos que oscilan entre 3 a 7 g/L. Esto representa en promedio 5 veces más ácido fórmico que la cantidad de ácido acético cuantificada, entre 0.5 y 1 g/L para este último metabolito (Figura 8). La producción de estos ácidos orgánicos disminuyó en valor promedio el rendimiento de ácido D-láctico de 90 %, en las cepas con gen el *gatC S184L*, al 78 %, en las mutantes de este gen (Tabla 6 y 7).

Tabla 8. Comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15* y JU15* $\Delta gatC S184L$, medio AM1 con xilosa.

Parámetro	Genotipo	
	JU15*	JU15* $\Delta gatC S184L$
Velocidad de crecimiento μ (h^{-1})	0.19±0.10	0.11±0.00
Rendimiento $Y_{p/s}$ (g D-láctico /g xilosa)	0.91±0.06	0.78±0.02
Velocidad específica de consumo de xilosa q_s (g xilosa /g DCW*h)	2.00±0.21	1.79±0.44
Velocidad específica de formación de producto q_p (g D-láctico /g DCW*h)	3.12±0.20	0.95±0.06
Consumo volumétrico Q_s (g xilosa /L*h), 48 h	0.77±0.00	0.45±0.01
Productividad volumétrica Q_p (g D-láctico /L*h), 48 h	0.72±0.04	0.31±0.00

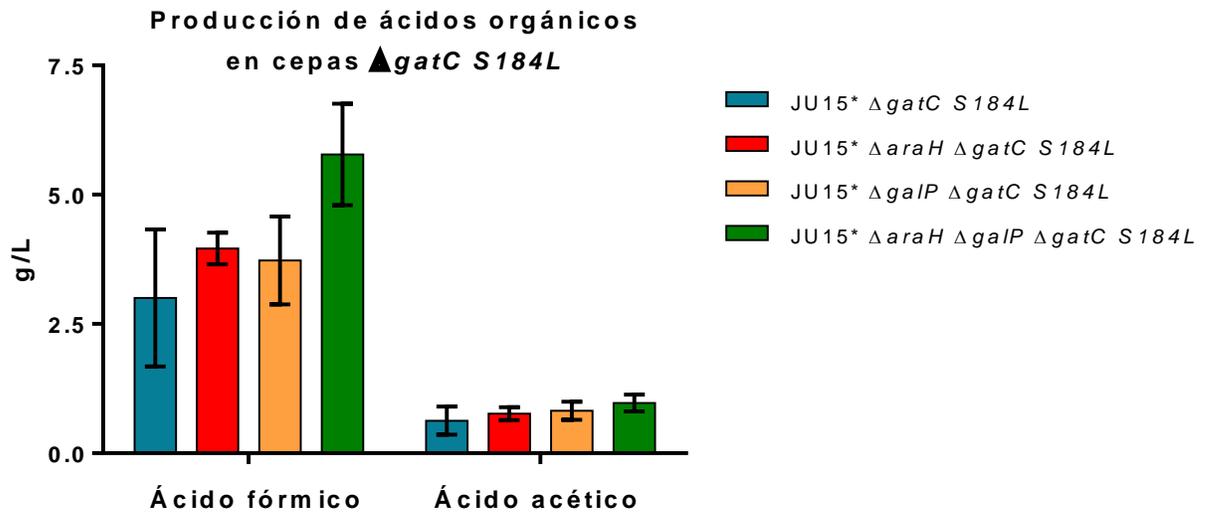


Figura 8. Producción de ácido fórmico y ácido acético de las mutantes *gatC S184L*, medio AM1 con 43 g/L de xilosa. Las cepas con el gen *gatC S184L* no tuvieron producción de ácido fórmico y ácido acético.

9.3. Evaluación de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, en medio AM1 con glucosa-xilosa

Para cada una de las cepas se preparó un inóculo con glucosa a una concentración de 20 g/L. La biomasa que se produjo en el inóculo se transfirió a un cultivo para la fermentación de 20 g/L de glucosa con 20g/L de xilosa. En este último, se evaluó por triplicado el consumo de glucosa-xilosa para la producción de ácido D-láctico. La biomasa que se transfirió a los tres cultivos de la fermentación se obtuvo a partir de un solo inóculo. Esta operación se realizó para las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$. Los resultados de los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la Tabla 9 y Figuras 9 y 10.

Tabla 9. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, medio AM1 con 20g/L de glucosa y 20g/L de xilosa.

Parámetro	Cepas evaluadas				
	JU15*	JU15* $\Delta ptsG$	JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$	JU15* $\Delta ptsG$ variante	JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ variante
Velocidad específica de crecimiento: μ (h^{-1})	0.24±0.01	0.17±0.03	0.20±0.01	0.22±0.01	0.20±0.01
Rendimiento $Y_{p/s}$ (g D-láctico/g gluc-xil)	0.88±0.07	0.94±0.00	0.70±0.03	0.91±0.03	0.83±0.01
Consumo volumétrico de glucosa Q_s (g glucosa/L*h) 24 h	0.84±0.02	0.30±0.05	0.50±0.01	0.85±0.02	0.49±0.03
Consumo volumétrico de xilosa Q_s (g xilosa/L*h) 48 h	0.19±0.02	0.39±0.00	0.40±0.00	0.40±0.01	0.40±0.00
Consumo volumétrico de glucosa-xilosa Q_s (g glucosa-xilosa/L*h) 48 h	0.61±0.01	0.71±0.00	0.81±0.00	0.82±0.02	0.84±0.00
Productividad volumétrica Q_p (g D-láctico/L*h) 48 h	0.54±0.03	0.67±0.01	0.57±0.03	0.75±0.00	0.70±0.01

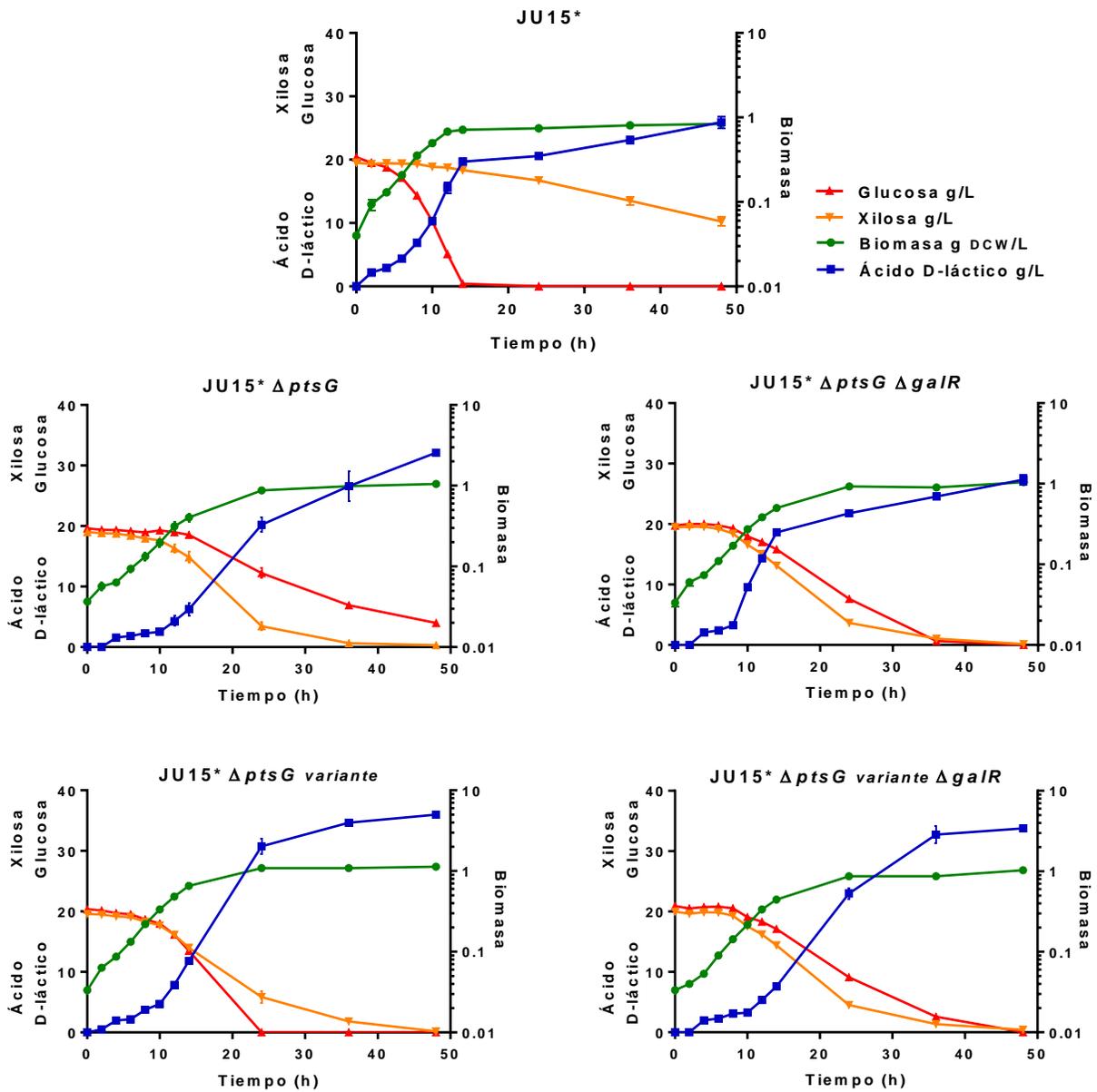


Figura 9. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa-xilosa y producción de ácido D-láctico de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ variante, medio AM1 con 20g/L glucosa y 20g/L xilosa.

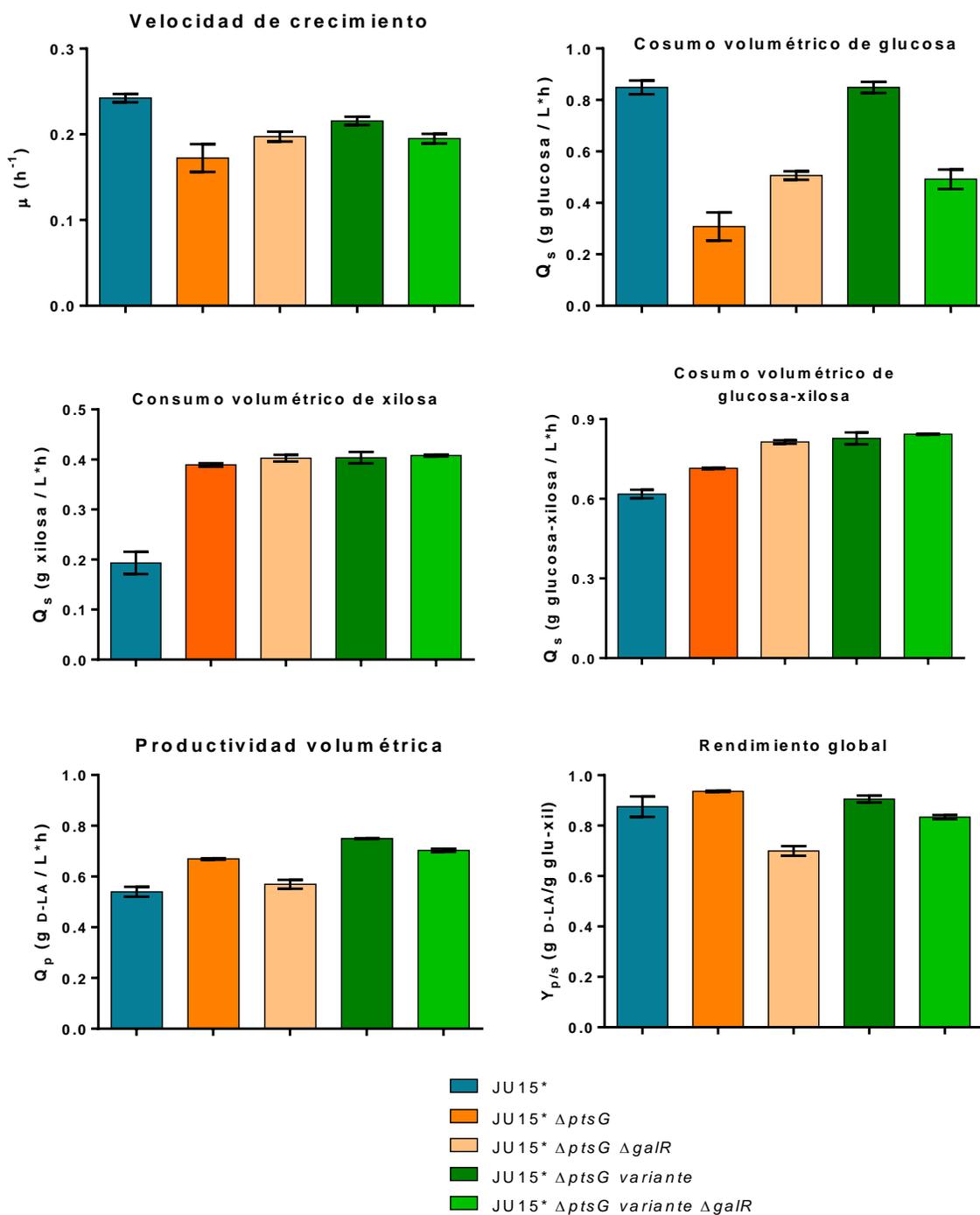


Figura 10. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, medio AM1 con 20g/L de glucosa y 20g/L de xilosa.

Los resultados de la Figura 9 confirman que la cepa JU15* presenta el fenómeno de represión catabólica (CCR), ya que hasta que termina de consumir la glucosa, alrededor de las 14 horas, da inicio el consumo de la xilosa. Para esta cepa, transcurridas 48 horas de cinética quedan por consumirse 10 g/L de xilosa, debido a que el fenómeno CCR retrasa su consumo. La eliminación del gen *ptsG*, en la cepa JU15*, logró inhibir la represión catabólica, ya que la glucosa y la xilosa se consumen de forma simultánea (Figura 9). Esto conllevó a que la cepa JU15* $\Delta ptsG$ consumiera la xilosa en un período aproximado de 35 horas, lo que se traduce en un incremento del 100 % sobre el consumo volumétrico de esta fuente de carbono. Este fenotipo se debe a que la eliminación del componente EIIBC del sistema PTS de glucosa, codificado en el gen *ptsG*, produce la acumulación de la enzima IIA en estado fosforilado. EIIA-P activa la enzima adenilato ciclasa para que sintetice AMPc. El incremento de los niveles de AMPc favorece la formación del complejo Crp-AMPc, el cual activa la transcripción del gen *crp* (Takahashi *et al.*, 1998). Este complejo regula la transcripción de los genes involucrados en el transporte y metabolismo de xilosa (Song and Park, 1997), por lo que finalmente la represión por catabolito se inhibe. No obstante, tal y como se ha reportado en otros trabajos (Yao *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2015), la eliminación del componente PtsG hace más lento el consumo de glucosa, en comparación con la cepa JU15*, debido a la pérdida del principal sistema de transporte de este azúcar. La velocidad específica de crecimiento de la mutante JU15* $\Delta ptsG$ es 30 % menor que la velocidad de la cepa JU15* ($0.17 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ contra $0.24 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, respectivamente), ya que, para esta última cepa, el consumo inmediato de glucosa impulsa la generación de biomasa durante las primeras 12 horas. Esto se refleja en que el consumo volumétrico de glucosa a las 24 horas es 1.8 veces mayor en la cepa JU15* que en la JU15* $\Delta ptsG$. Sin embargo, la productividad volumétrica para esta última cepa es 24 % mayor en comparación con la cepa parental JU15* (Tabla 9), debido a que las dos fuentes de carbono son consumidas al mismo tiempo para la producción de ácido D-láctico.

En el proceso de fermentación de la cepa JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, la glucosa se consumió en aproximadamente 35 horas. Esto representa una mejora significativa en comparación con el consumo de la cepa JU15* $\Delta ptsG$, donde a las 48 horas de fermentación había un remanente de 4 g/L de glucosa. El consumo volumétrico de glucosa incrementó 65% en la cepa JU15*

$\Delta ptsG \Delta galR$ con respecto a la cepa JU15* $\Delta ptsG$. Este incremento se reflejó en la velocidad de crecimiento, al ser 17.5 % mayor en la cepa JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$. Sin embargo, a pesar de que la eliminación del gen *galR* mejoró la capacidad de consumo de glucosa, no logró restablecer los valores de los parámetros cinéticos que se obtuvieron en la cepa JU15* (Tabla 9).

El incremento en la capacidad de consumo de glucosa que se observó al eliminar el gen *galR* en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ está asociado a la pérdida de regulación del operón de galactosa, como consecuencia de la eliminación de su regulador. Esto incrementa los niveles de expresión del simporte de protones GalP, lo que permite la internalización de glucosa a mayor velocidad en la célula. Se ha reportado que el transportador GalP tiene la capacidad de internalizar xilosa (Henderson, 1990). Sin embargo, su posible expresión en las mutantes JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, no tiene efecto sobre el consumo volumétrico de xilosa, ya que se mantuvo en 0.40 g_{xilosa} /L*h para todas las mutantes.

Durante la evaluación del consumo de glucosa-xilosa de la cepa JU15* $\Delta ptsG$ se obtuvo una variante, denominada JU15* $\Delta ptsG$ variante, la cual presentaba una mayor velocidad de crecimiento que la cepa JU15* $\Delta ptsG$ (Tabla 9). Se comprobó el genotipo $\Delta ptsG::km galR^+$ en la cepa variante (Numeral 13.1) y posteriormente se evaluó su capacidad de consumo de glucosa-xilosa. Al comparar la cinética de consumo (Figura 9) se observó que a las 24 horas de cultivo la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante ya había agotado la glucosa, mientras que la cepa JU15* $\Delta ptsG$ a las 48 horas de fermentación aún tenía 10 g/L de glucosa. En este sentido, la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante incrementó 29 % la velocidad de crecimiento, y 165 % el consumo volumétrico de glucosa. Además, al compararla con la cepa JU15* tiene un consumo volumétrico de glucosa-xilosa 30 % mayor y con respecto a la cepa JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ su consumo volumétrico de glucosa es 70% mayor.

Por otra parte, se esperaba que la eliminación del gen *galR* en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante incrementaría el consumo de glucosa. Sin embargo, su eliminación disminuyó 50% el consumo volumétrico de esta fuente de carbono, lo que prolongó al doble el período de consumo de este azúcar. El efecto contrario que tiene la eliminación del gen *galR* en las cepas JU15* $\Delta ptsG$ y

JU15* $\Delta ptsG$ variante sugiere que la internalización de glucosa no se lleva a cabo por los mismos transportadores.

Las cepas que reportaron mayor velocidad de crecimiento son aquellas que tienen un consumo preferente por glucosa y no por xilosa, estas son la JU15* y JU15* $\Delta ptsG$ variante. Esto es porque un mol de xilosa rinde 0.67 moles de ATP y uno mol de glucosa rinde 2 moles de ATP. Además, el transporte de xilosa y la producción de xilulosa 5-fosfato consume dos moléculas de ATP, mientras que el transporte de glucosa y la generación de glucosa 6-fosfato se requiere el equivalente de una molécula ATP (Jojima *et al.*, 2010). Aunado a esto, el balance de carbono es menor para xilosa, dado que esta molécula tiene un esqueleto de cinco carbonos, mientras que el esqueleto de glucosa se compone de seis carbonos. Si bien, las velocidades específicas de consumo de glucosa y de xilosa no es posible calcularlas. La comparación del consumo volumétrico de glucosa de la cepa JU15* (0.84 ± 0.02 g_{glucosa} /L*h) contra los valores de consumo volumétrico de xilosa de las cepas con genotipo $\Delta ptsG$ (0.40 ± 0.02 g_{xilosa} /L*h), ponen en perspectiva la diferencia que existe en la capacidad de internalización de las fuentes de carbono en la cepa JU15* de *E. coli*. En este caso, al tomar como referencia el consumo volumétrico y la cantidad de biomasa producida, podríamos inferir que el consumo de glucosa es el doble que el de xilosa.

Los resultados de los valores de consumo volumétrico de glucosa-xilosa reportados (Tabla 9), revelan la ventaja del genotipo $\Delta ptsG$. Ya que, a pesar de que la cepa JU15* presenta un consumo volumétrico de glucosa elevado, su consumo volumétrico de glucosa-xilosa es menor entre 15 y 30 % en comparación con las demás cepas. El consumo simultáneo de la glucosa y xilosa incrementa 24 % la productividad volumétrica de ácido D-láctico en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ y alrededor de 35 % en las cepas JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, con respecto a la cepa JU15*. En el caso de la cepa JU15* $\Delta ptsG$ $\Delta galR$ no se observaron incrementos en la productividad volumétrica, debido a un error de cuantificación del ácido D-láctico en el HPLC; sin embargo, tuvo un consumo volumétrico de glucosa-xilosa similar al de las cepas JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$.

9.4. Evaluación de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, en medio AM1 con glucosa

Para cada una de las cepas se preparó un inóculo con glucosa a una concentración de 20 g/L. La biomasa que se produjo en el inóculo se transfirió a un cultivo para la fermentación de 40 g/L de glucosa. En este último, se evaluó por duplicado el consumo de glucosa para la producción de ácido D-láctico. La biomasa que se transfirió a los dos cultivos de la fermentación se obtuvo a partir de un solo inóculo. Esta operación se realizó para las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$. Los resultados de los parámetros cinéticos y estequiométricos se resumen en la Tabla 10 y las Figuras 11 y 12.

Tabla 10. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa.

Parámetro	Cepas evaluadas				
	JU15*	JU15* $\Delta ptsG$	JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$	JU15* $\Delta ptsG$ variante	JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$
Velocidad específica de crecimiento: μ (h^{-1})	0.32±0.00	0.12±0.00	0.15±0.01	0.24±0.00	0.16±0.00
Rendimiento $Y_{p/s}$ (g D-láctico/g glucosa)	0.81±0.03	0.78±0.01	0.79±0.01	0.83±0.0	0.85±0.02
Velocidad de consumo de glucosa q_s (g glucosa /g DCW *h)	6.52±0.32	2.06±0.13	2.37±0.09	5.01±0.39	2.70±0.23
Velocidad de formación de producto q_p (g D-láctico /g DCW *h)	5.36±0.39	1.46±0.12	1.85±0.17	4.15±0.10	2.32±0.01
Consumo volumétrico Q_s (g glucosa /L *h) 24 h	1.75±0.00	0.46±0.02	0.70±0.03	1.57±0.02	0.62±0.04
Productividad volumétrica Q_p (g D-láctico/L *h) 24 h	1.42±0.04	0.36±0.02	0.56±0.02	1.35±0.03	0.56±0.01

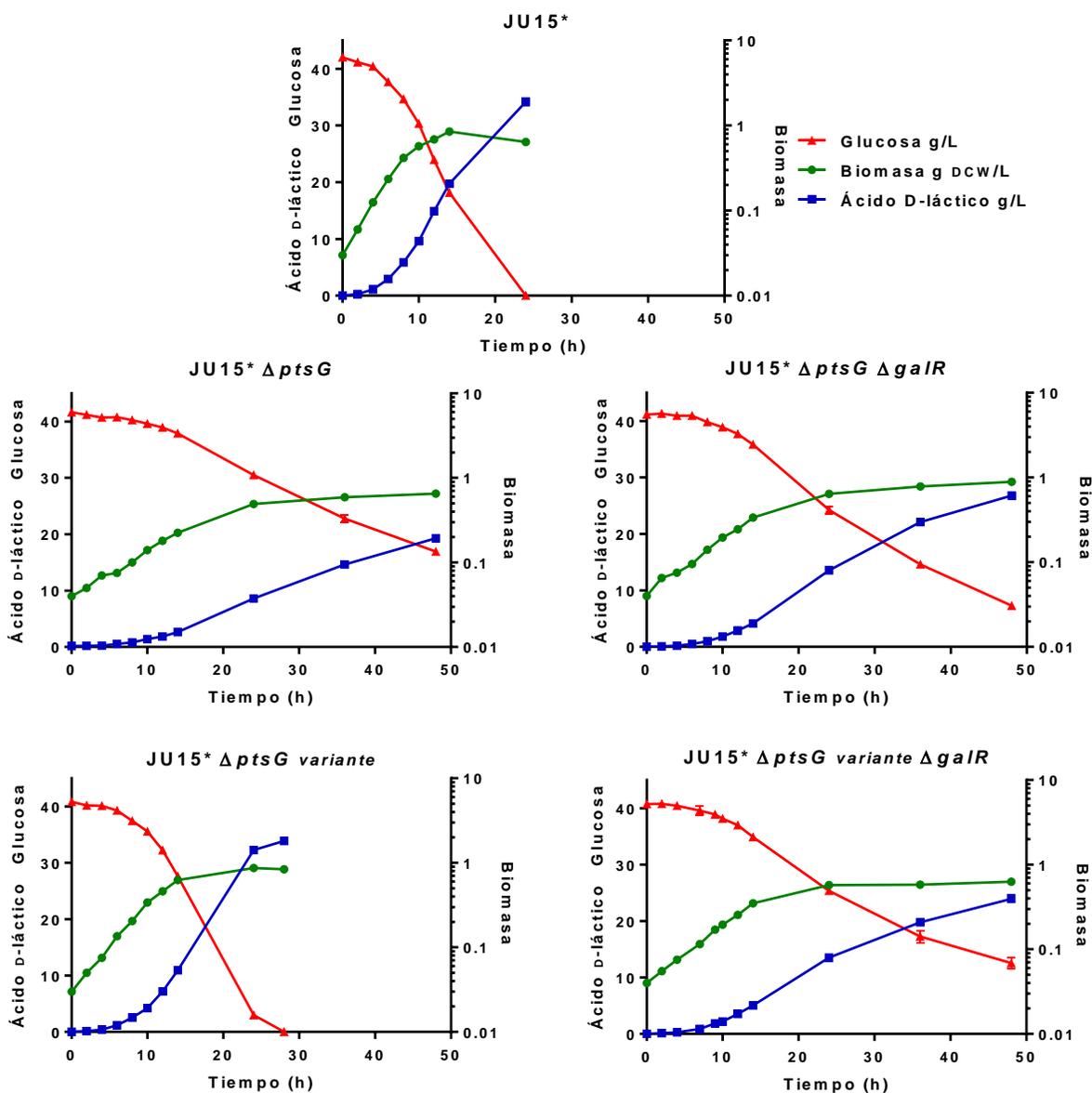


Figura 11. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido D-láctico de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, medio AM1 con 40 g/L glucosa. La cinética de la cepa JU15* muestra una disminución en la biomasa durante el último muestreo. Ello revela que existe muerte celular durante las últimas 10 horas del cultivo, debido a que la glucosa se terminó de consumir en este período de tiempo.

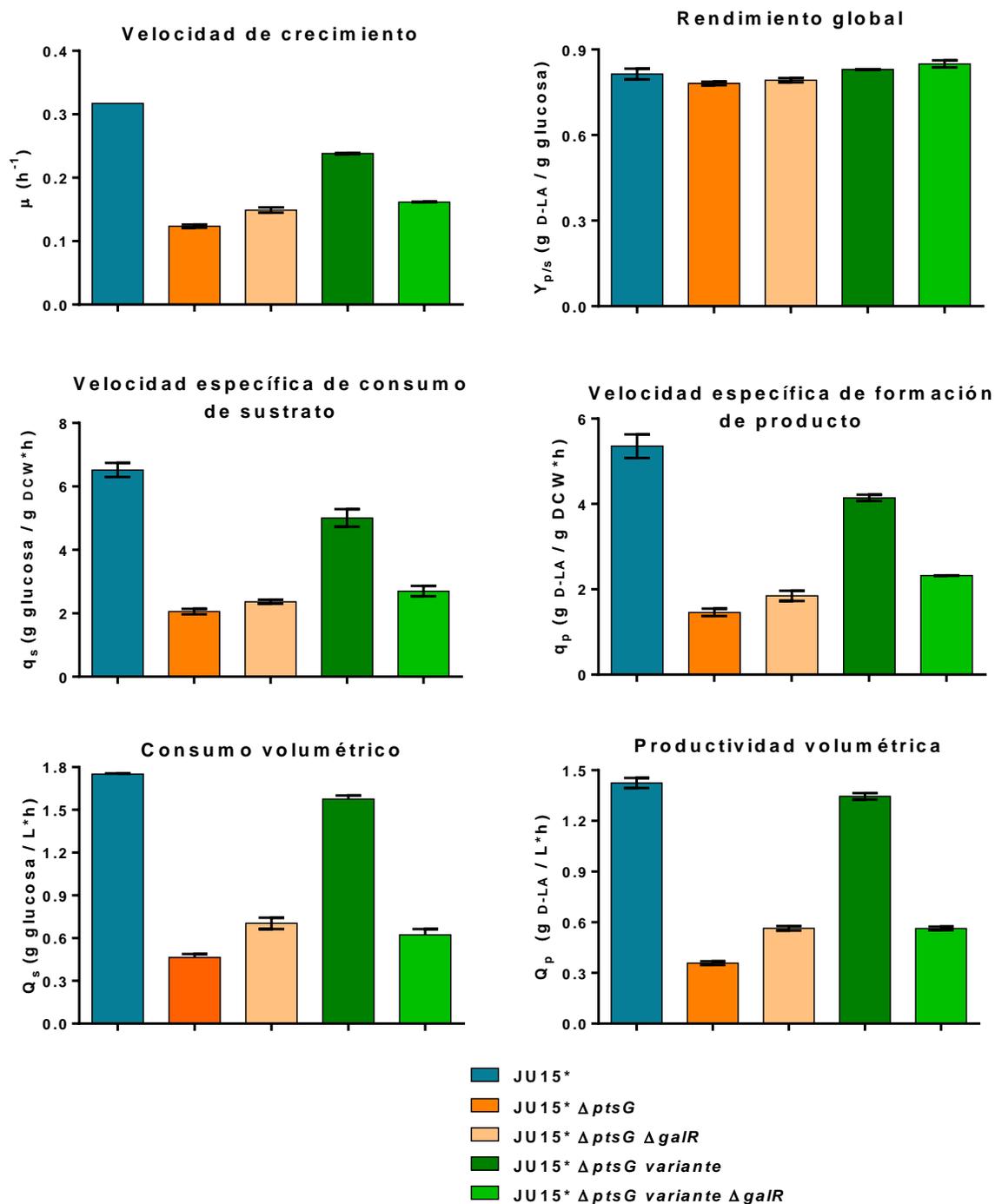


Figura 12. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa.

La eliminación del sistema PTS en la cepa JU15* disminuye en 62.5 % la velocidad de crecimiento y un 68 % la velocidad específica de consumo de glucosa (Tabla 10). Debido a que la pérdida del sistema PTS conlleva a que la fosforilación de la glucosa sea dependiente de ATP y no de PEP. La baja disponibilidad de equivalentes energéticos disminuye el crecimiento de la cepa (Fuentes *et al.* 2013). A pesar de que se eliminó la principal vía de internalización de glucosa, la cepa JU15* $\Delta ptsG$ mantiene la capacidad de consumir esta fuente de carbono a una velocidad de 2 g de glucosa por gramo de biomasa por hora, lo que le permite crecer a una velocidad de 0.12 h⁻¹. Existe una variedad de transportadores que posiblemente utiliza esta cepa para internalizar glucosa. Estudios mediante análisis fluxómico han reportado que el consumo de glucosa en cepas PTS⁻ se lleva a cabo principalmente por el simporte de protones de galactosa GalP (McCloskey *et al.*, 2018). El transportador de tipo ABC de galactosa es otro sistema que también podría internalizar glucosa, ya que se ha encontrado un aumento en sus niveles de expresión (Hua *et al.*, 2004), como consecuencia de la baja concentración intracelular de glucosa (Gosset 2005). Además de los transportadores de galactosa, sistemas PTS, como la permeasa de manosa EIID^{Man}, la subunidad transportadora específica de fructosa EIIBC^{Fru} y la subunidad transportadora específica β -glucosidasa EIIC, también son capaces de internalizar glucosa (Luo *et al.*, 2014).

Es probable que el estrés en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ debido al bajo consumo de glucosa, junto con la presión de selección por la presencia de glucosa en los cultivos, propiciaron la obtención de una cepa denominada JU15* $\Delta ptsG$ variante. Esta cepa reportó una velocidad de consumo 1.5 veces mayor que la de la cepa JU15* $\Delta ptsG$ (5.01±0.39 contra 2.06±0.13) y una velocidad de crecimiento del doble (0.24±0.0 contra 0.12±0.0). Esto muestra la capacidad que tienen las cepas PTS⁻ de *E. coli* en revertir el fenotipo de baja capacidad de consumo de glucosa, fenómeno que ya ha sido reportado (Sauer 2001; Yan and Fong 2018). La eliminación o mutaciones del gen *galR* (Aguilar *et al.*, 2012), así como mutaciones sobre la secuencia operadora que reconoce el regulador GalR (McCloskey *et al.*, 2018), son claves en la recuperación del consumo de glucosa en las cepas PTS⁻. Respecto al transportador de galactosa de tipo ABC, no se ha reportado que juegue un papel central sobre la recuperación del consumo de glucosa en cepas PTS⁻. Posiblemente porque es un transporte que consume

ATP para la internalización de azúcares, lo que representaría un gasto energético para la célula. En este trabajo, la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante alcanzó aproximadamente el 75% de los valores de las velocidades de crecimiento y de consumo de glucosa obtenidos en la cepa JU15*.

La eliminación del gen *galR* en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ conllevó a un aumento de los parámetros cinéticos en los siguientes valores: 25% la velocidad de crecimiento, 15% la velocidad de consumo de glucosa y 40% el consumo volumétrico de glucosa (Tabla 10). Dichos resultados revelan que la estrategia realizada sí corresponde a la hipótesis planteada; sin embargo, la eliminación del regulador GalR no permite recuperar los niveles de los parámetros obtenidos en la cepa JU15*. Este fenómeno podría estar asociado a dos factores. El primer factor tiene que ver con la represión por parte de otros elementos de regulación. Cabe señalar que además de GalR existe otra proteína involucrada en el regulón *gal*, se trata de GalS. Se ha reportado que GalR y GalS comparten un 53% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Weickert y Adhya, 1992), lo que les permite entrecruzar la regulación. Es por esta razón que ambas proteínas reguladoras son capaces de reconocer los mismos operadores, pero con diferentes afinidades. Aunque en el caso del gen *galP*, se tiene reportado que GalR es el mayor represor (Geanacopoulos y Adhya, 1997). El segundo factor se relaciona con la fosforilación de la glucosa por la enzima glucoquinasa. Durante el consumo de este azúcar, el componente EIIC^{Glc}, del sistema PTS, es quien se encarga de transportarla hacia el citoplasma y fosforilarla, de manera simultánea. El grupo fosfato que está enlazado a la glucosa evita que abandone la célula, además de mantenerla en un estado activado para poder ser metabolizada. Sin embargo, en fenotipos PTS⁻ la internalización de glucosa se realiza a través de transportadores que no son capaces de fosforilarla. por lo que se requiere de la enzima glucoquinasa. En este sentido, una estrategia que se ha utilizado para incrementar de forma significativa la velocidad de consumo de glucosa en cepas PTS⁻ de *E. coli*, es la sobreexpresión del gen *glk* (Hernández *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016). Además, se ha observado que la expresión de la glucoquinasa juega un papel importante en cepas PTS⁻ que incrementaron el consumo de glucosa como resultado de procesos de evolución adaptativa (Groot *et al.*, 2017). No obstante, existe el caso en el que bajo condiciones anaerobias la sobreexpresión de *glk* en una cepa PTS⁻

de *E. coli* no aumentó las velocidades de consumo de glucosa y de crecimiento (Wang *et al.*, 2006). Por otra parte, la cepa JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ variante reportó una disminución de 40 % en la velocidad específica de consumo de glucosa y 35 % en la velocidad de crecimiento, en comparación con los valores obtenidos en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante. En este caso, la eliminación del gen *galR* en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante tuvo un efecto contrario al observado en la cepa JU15* $\Delta ptsG$. Esto sugiere que, en el fondo genético de la cepa variante, la proteína GalR permite expresión significativa de genes relacionados al metabolismo de glucosa. Si bien es conocido que GalR es el represor de los genes implicados en el metabolismo de galactosa, existe el reporte de que también puede fungir como activador. En este sentido, el análisis de un perfil transcripcional global de una cepa de *E. coli* mutante del gen *galR*, reveló una disminución de la expresión de genes como *gatABC*, *manY* y *ptsH* (Qian *et al.*, 2016), los cuales, de forma respectiva, codifican componentes de sistema PTS de galactitol, sistema PTS de manosa y la proteína HPr de sistema PTS. En el caso de la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante el fenotipo de consumo de glucosa podría estar relacionado a algún sistema PTS cuya expresión disminuyó al eliminar el gen *galR*.

9.5. Evolución adaptativa de la cepa JU15* $\Delta ptsG$

Debido a que a cepa JU15* $\Delta ptsG$ *variante* consumió los 40 g/L de glucosa en un lapso de 28 horas, mientras que la cepa JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ a las 48 horas de la fermentación todavía tenía 7.31 g/L de glucosa en el medio de cultivo. Se optó por hacer la evolución adaptativa en laboratorio de la cepa JU15* $\Delta ptsG$, con la finalidad de incrementar la velocidad de consumo de glucosa y la velocidad de crecimiento. Para ello, se utilizó medio AM1 suplementado con 40 g/L de glucosa y kanamicina a una concentración final de 30 $\mu\text{g/mL}$, en las condiciones descritas en el Numeral 8.3. Se adicionó un criovial de la cepa JU15* $\Delta ptsG::Km^R$ a un minifermentador y a partir de este cultivo se hicieron pases consecutivos durante la fase exponencial hasta observar un incremento en la velocidad de crecimiento y de consumo de base, similares a los reportados para la cepa parental JU15*. En un período de 309 horas se realizaron 20 pases (Figura 13) y se seleccionaron los pases 14 y 16 para aislar y evaluar colonias, 4 colonias del pase 14 y 3 colonias del pase 16. Se optó por evaluar estos pases ya que en pases posteriores no se observó incrementos significativos en la velocidad de crecimiento. De las 7 colonias evaluadas se obtuvo una del pase 16, la cual presentó los mejores parámetros cinéticos y estequiométricos con respecto a todas las demás. Para el fenotipo reportado se requirieron alrededor de 100 generaciones, las cuales equivalen a los 16 pases en minifermentador. En la Tabla 11 y la Figura 14 se presenta la comparación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ *variante* y la cepa obtenida por evolución adaptativa en laboratorio, correspondiente al pase 16.

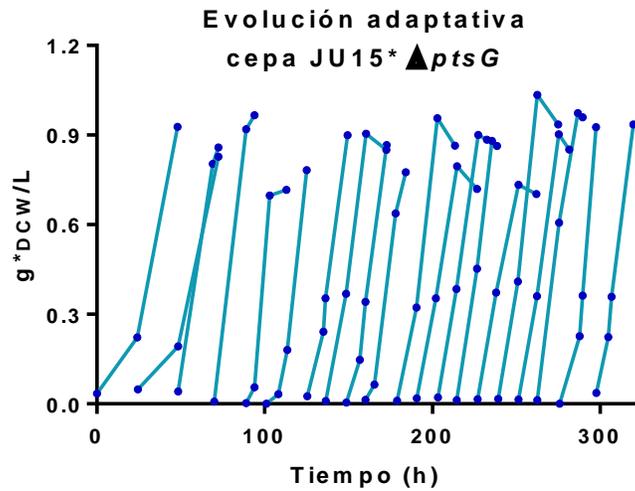


Figura 13. Evolución adaptativa de la cepa JU15* $\Delta ptsG$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa. Se realizaron 20 pases durante 300 horas.

Tabla 11. Resultados promedio de los parámetros cinéticos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada, medio AM1 con 40g/L glucosa.

Parámetro	Cepas evaluadas				
	JU15*	JU15* $\Delta ptsG$	JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$	JU15* $\Delta ptsG$ variante	JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada
Velocidad específica de crecimiento: μ (h^{-1})	0.32±0.00	0.12±0.00	0.15±0.01	0.24±0.00	0.28±0.00
Velocidad específica de consumo q_s (g glucosa /g DCW*h)	6.52±0.32	2.06±0.13	2.37±0.09	5.01±0.39	5.45±0.20
Consumo volumétrico Q_s (g glucosa /L*h) 24 h	1.75±0.00	0.46±0.02	0.70±0.03	1.57±0.02	1.70±0.03
Rendimiento $Y_{p/s}$ (g D-láctico/g glucosa)	0.81±0.03	0.78±0.01	0.79±0.01	0.83±0.00	0.85±0.00

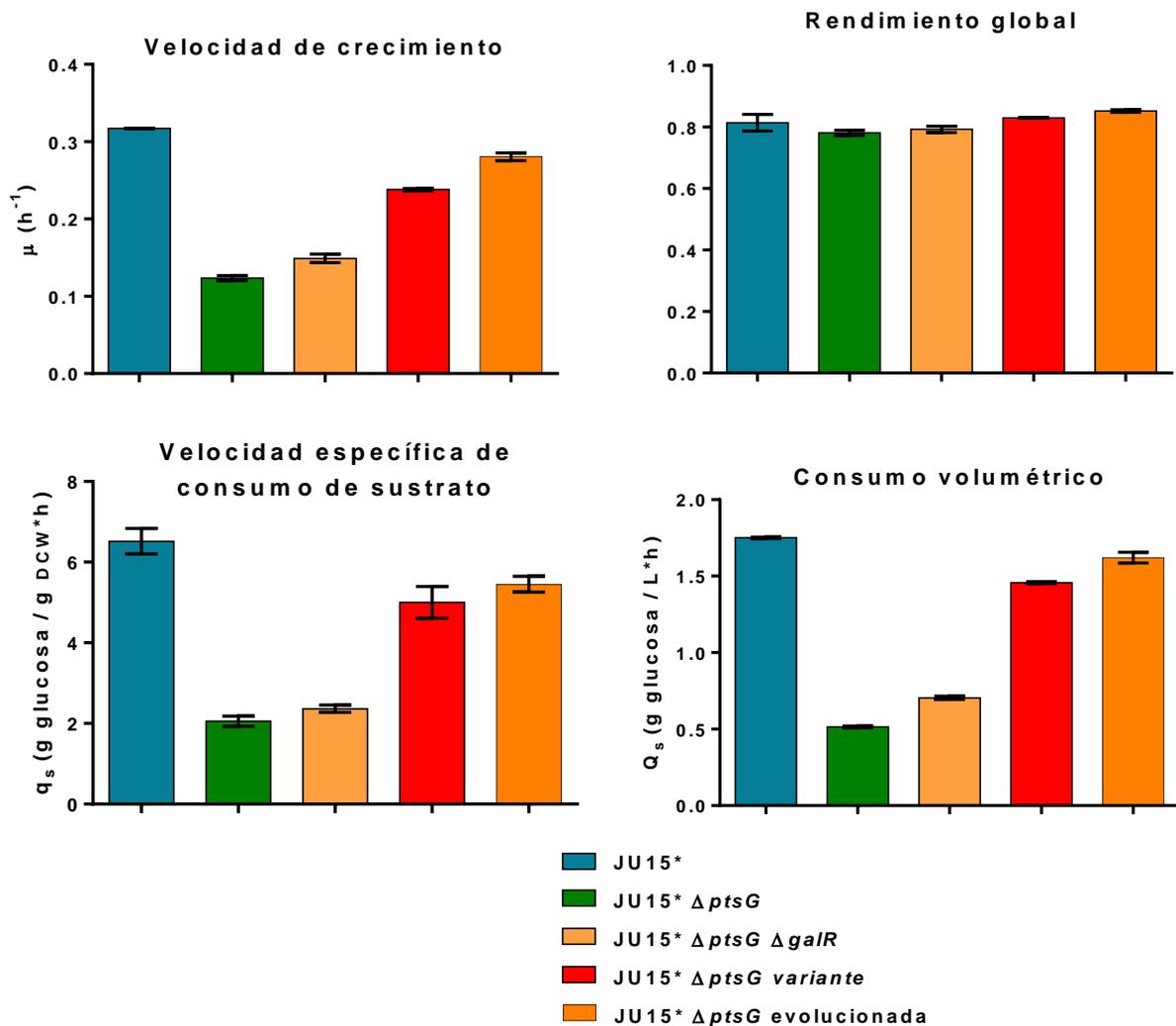


Figura 14. Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$, medio AM1 con 40 g/L de glucosa.

El proceso de evolución adaptativa en laboratorio incrementó 1.3 veces la velocidad de crecimiento de la cepa JU15* $\Delta ptsG$ (de 0.12 a 0.28 h^{-1}). Este incremento es 15 % superior a la velocidad de crecimiento obtenida en la cepa variante. La cepa JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada alcanzó 80 % del valor de la velocidad específica de consumo y el 90 % del valor de la velocidad de crecimiento reportados para la cepa JU15*. El período de fermentación se

prolongó 3 horas en la cepa evolucionada con respecto a la cepa JU15*, debido a que el consumo volumétrico es menor (1.62 contra 1.75 g/L*h). No obstante, el consumo volumétrico de la cepa evolucionada es el triple del obtenido en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ (1.62 contra 0.51 g/L*h). Los parámetros cinéticos de velocidad de crecimiento y velocidad de consumo de glucosa en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada son el doble de los que se obtuvieron con la estrategia de eliminación de los genes *ptsG* y *galR* (Tabla 11). Este resultado destaca la evolución adaptativa en laboratorio como una herramienta para la optimización de consumo de fuentes de carbono en cepas de *E. coli*. Hay que remarcar la capacidad de transporte de glucosa que tienen las cepas obtenidas. En este sentido, durante la fase exponencial se observa que un gramo de biomasa de las cepas JU15* $\Delta ptsG$ variante y la JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada, consumen por hora 5.01 y 5.45 gramos de glucosa, respectivamente. A diferencia de la cepa JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$, cuyo consumo sólo es de 2.37 gramos de glucosa por cada gramo de biomasa producida. Los rendimientos de ácido D-láctico en promedio se mantuvieron alrededor del 80 % para todas las cepas evaluadas. Debido a la diferencia entre el número de generaciones requeridas para obtener las cepas JU15* $\Delta ptsG$ variante y la JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada, 10 generaciones y 100 generaciones, respectivamente; resulta importante secuenciar estas cepas para determinar si lo reportado es consecuencia de mutaciones o de adaptación fisiológica.

Es posible que el bajo consumo de glucosa en cepas PTS⁻ genere estrés celular y este a su vez incremente la actividad de mecanismos mutagénicos. En este contexto, se ha reportado que cepas triples mutantes de los genes *ptsH ptsI* y *crr* inducen la respuesta SOS, mediada por las proteínas RecA y LexA, durante procesos de evolución adaptativa (McCloskey *et al.*; 2018). La respuesta SOS permite la expresión de genes de reparación de ADN, como son *dinB* y *ruvABC*, los cuales incrementan la probabilidad de introducir mutaciones sobre el genoma (McKenzie *et al.*, 2001). Además de la respuesta SOS, también se debe mencionar las activaciones de la respuesta de estrés general, mediada por el factor sigma RpoS, y la respuesta de estrés estricta, mediada por los metabolitos tetrafosfato y pentafosfato de guanósina (ppGpp y pppGpp) (Kreuzer, 2013). Durante la respuesta de estrés general se sobreexpresa la proteína RpoS, la cual regula alrededor de 200 genes. Dentro de estos, se

encuentra el gen *dinB*, cuya expresión produce la ADN polimerasa IV, la cual sustituye a la ADN polimerasa III durante el proceso de replicación (Weber *et al.*, 2005). La ADN polimerasa IV aumenta la frecuencia de mutación (Wagner y Nohmi, 2000). Respecto a la respuesta de estrés estricta, los metabolitos ppGpp y pppGpp se unen a la ARN polimerasa y afectan su capacidad de reconocimiento hacia promotores. Esto permite la expresión de diversos genes por la unión de RpoS a sus sitios promotores. Ya se ha comprobado que cepas mutantes del gen *crr*, el cual codifica para la enzima IIA del sistema PTS, incrementan los niveles de expresión de RpoS y la síntesis de ppGpp durante la fase de crecimiento (Flores *et al.*, 2008). Si bien los trabajos citados involucran mutantes de los genes *ptsH ptsI* y *crr*, es la baja capacidad de consumo de glucosa lo que desencadena las respuestas mencionadas. Prueba de ello es que los niveles de la proteína RpoS incrementan a medida que disminuye la tasa de dilución en cultivos continuos (Yao *et al.*, 2011). Es probable que la diversidad de sistemas de transporte alternativo que existen para la glucosa junto con los mecanismos mutagénicos que se desencadenan por respuesta de estrés en cepas con bajo consumo de glucosa, son los factores que propiciaron la obtención de las cepas JU15* Δ *ptsG variante* y JU15* Δ *ptsG* evolucionada.

10. Conclusiones

La eliminación de los genes *araH*, *galP* y la forma combinada *araH galP* no incrementaron las velocidades específicas de crecimiento y de consumo de xilosa en la cepa JU15* de *E. coli*. Por otra parte, la eliminación del componente PtsG, del sistema de transporte PTS, propició el consumo simultáneo de glucosa y xilosa. La eliminación del gen regulador *galR* en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ incrementó 25 % la velocidad de crecimiento y 15 % la velocidad de consumo de glucosa.

Los transportadores AraFGH y GalP no representan una vía importante para la internalización de xilosa en cepas JU15* y JU15* $\Delta gatC S184L$.

Con base en la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados por Roncancio en 2017, el efecto que tiene la eliminación de los genes *galP* y *araH* sobre el consumo de xilosa podría ser dependiente del fondo genético de la cepa utilizada.

El transportador GatC S184L juega un papel importante en el consumo de xilosa en las cepas derivadas de la cepa JU15*. Su eliminación disminuyó la velocidad de crecimiento aproximadamente 45 % y la velocidad de consumo de xilosa en 33 %. Además, de favorecer de manera directa o indirecta la producción de ácido fórmico.

La eliminación del gen *ptsG* en la cepa JU15* afectó la capacidad de consumo de glucosa, esto se reflejó en la disminución de las velocidades de crecimiento y de consumo de glucosa 62% y 68%, respectivamente. No obstante, el fenotipo de consumo simultáneo de glucosa-xilosa incrementó 24 % la productividad volumétrica para la cepa JU15* $\Delta ptsG$ al compararla con la cepa parental JU15*.

Es probable que el estrés por el consumo de glucosa bajo en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ junto con la presión de selección por la presencia de glucosa en los cultivos propiciaron la obtención de una cepa variante, JU15* $\Delta ptsG$ variante. La cual alcanzó 75% de los valores reportados en la cepa JU15* respecto a las velocidades de crecimiento y de consumo de glucosa.

Es probable que el producto del gen *galR* regule, de forma directa o indirecta, la expresión de genes relacionados al metabolismo de glucosa en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante. Ya que la

eliminación de este gen disminuye las velocidades de crecimiento y de consumo de glucosa en 35 % y 40 %, respectivamente.

La evolución adaptativa representa una mejor alternativa para revertir la baja capacidad de consumo de glucosa en cepas mutantes del sistema PTS. Con esta estrategia se obtuvo una cepa que muestra un incremento al doble de las velocidades de consumo de glucosa y de crecimiento, en comparación con las cepas en las que se eliminó el gen *galR*.

11. Perspectivas

Evaluar el efecto que tiene la eliminación de los genes *galP* y *araH* en otras cepas de *E. coli*.

Evaluar el efecto que tiene la eliminación del gen *tdcE* sobre la producción de ácido fórmico en la cepa JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC S184L$.

Evaluar si la eliminación de los genes *araC* y *fruR*, relacionados a la regulación del metabolismo de azúcares de cinco carbonos, junto con la sobreexpresión del regulador XylR, relacionado a la expresión de genes del metabolismo de xilosa, representa una estrategia para incrementar el consumo de xilosa en cepas de *E. coli*.

Evaluar el consumo de xilosa y también de los azúcares presentes en los hidrolizados de rastrojo de maíz con la cepa JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada.

Secuenciar las cepas JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta ptsG$ evolucionada para determinar cuál es el genotipo que permite que estas cepas tengan un elevado consumo de glucosa a pesar de carecer del sistema PTS.

Determinar los mecanismos por los que GalR funge como activador y represor, en el consumo de glucosa, en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante.

12. Referencias

1. Aguilar C, Escalante A, Flores N, de Anda R, Riveros M, Gosset G, Morett E, Bolívar F (2012) Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an *Escherichia coli* strain lacking the major glucose transport system. *BMC Genomics* 13:385-401.
2. Alhem C, Huisman W, Neslund G, Dahm A (1982) Purification and properties of a periplasmic D-xylose-binding protein from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Biological Chemistry* 257:2926-2931.
3. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko K, Tomita M, Wanner B, Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2:2006-2008.
4. Bai W, Tai Y, Wang J, Wang J, Jambunathan P, Fox K, Zhang K (2016) Engineering nonphosphorylative metabolism to synthesize mesaconate from lignocellulosic sugars in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 38:285-292.
5. Datsenko K, Wanner B (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America* 12:6640-6645.
6. Death A, Notley L, Ferenci Thomas (1993) Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *Journal of Microbiology* 175:1475-1483.
7. Death A, Ferenci T (1994) Between feast and famine: Endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *Journal of Bacteriology* 176:5101-5107.
8. Desai T, Rao C (2009) Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*. *American Society of Microbiology* 76:1524-1532.
9. Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 11:87-93.
10. Eiteman M, Lee S, Altman E. (2008) A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *Journal of Biological Engineering* 2:3-10.
11. Escalante A, Martínez A, Rivera M, Gosset G. (2009) Solute transport processes in the cell. *The Metabolic Pathway Engineering Handbook*. Ed. C.D. Smolke. CRC Press. Boca Raton, FL., EUA.
12. Escalante A, Calderón R, Valdivia A, de Anda R, Hernández G, Ramírez O, Gosset G, Bolívar F (2010) Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbiology Cell Factories* 9:21-32.
13. Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F (2005) Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabolic Engineering* 7:70-87.
14. Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez-Viveros J, Merino E, Franco B, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F (2008) New insights into the role of sigma factor RpoS as revealed in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14:176-192.
15. Fuentes G (2013) Generación y caracterización de cepas de *Escherichia coli* modificadas en la capacidad de transporte de glucosa. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM.

16. Fuentes G, Lara R, Martínez M, Ramírez T, Martínez A, Bolívar F, Gosset G (2013) Modification of glucose import capacity in *Escherichia coli*: physiologic consequences and utility for improving ADN vaccine production. *Microbial Cell Factories* 12:42-52.
17. Geanacopoulos M, Adhya S (1997) Functional characterization of roles of GalR and GalS as regulators of the *gal* regulon. *Journal of Bacteriology* 179:228-234.
18. González J, Long C, Antoniewicz M. (2017) Comprehensive analysis of glucose and xylose metabolism in *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions by ¹³C metabolic flux analysis. *Metabolic engineering* 39:9-18.
19. Görke B Stülken J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* 6:613-624.
20. Gosset G. (2005) Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Microbial cell factories* 4:14-24.
21. Groot J, Cepass-Mclean S, Robbins-Pianka A, Knight R, Gill R (2017) Multiplex growth rate phenotyping of synthetic mutants in selection to engineer glucose and xylose co-utilization in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 114:885-893.
22. Guan L, Kaback R (2004) Glucose/Sugar transport in bacteria. *Encyclopedia of Biological Chemistry* 2: 204-207.
23. Harris N, Findlay H, Sanders M, Kedziński M, Santos A, Booth P (2017) Comparative stability of Major Facilitator superfamily transport proteins. *European Biophysics Journal* 46:655-663.
24. Hasona A, Kim Y, Healy F, Ingram L, Shanmugam K. (2004) Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose. *Journal of Bacteriology* 186:7593-7600.
25. Henderson P (1990) Proton-linked sugar transport systems in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes of membrane* 22:525-569.
26. Hernández V, Martínez A, Hernández G, Bolívar F, Valle F, Gosset G (2003) Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* mutante PTS restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnology and Bioengineering* 83:687-694.
27. Hesslinger C, Fairhurst S, Sawers G (1998) Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonina to propionate. *Molecular Microbiology* 27:477-492.
28. Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microbial Technology* 26:87-107.
29. Hogema B, Arents J, Bader R, Eijkemans K, Yoshida H, Takashi H, Aiba H, Postma P (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{Glc}. *Molecular Microbiology* 30:487-498.
30. Hua Q, Yang C, Oshima T, Mori H, Shimizu K (2004) Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 4:2354-2366.
31. Jagtap S and Rao C (2018) Microbial conversion of xylose into useful bioproducts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:9015-9036.
32. Jantama K, Zhang X, Moore J, Shanmuganm K, Svonoros S, Ingram L (2008) Eliminating side products and increasing succinate yields in engineering strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnology and Bioengineering* 101:81-893.

33. John P, Nampoothiri M, Pandey A (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process development and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:524-34.
34. Jojima T, Omumasaba C, Inui M, Yukawa H (2010) Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:471-480.
35. Juturu V, Chuan Wu J (2016) Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology* 36:967-977.
36. Khankal R, Chin J, Cirino P (2008) Role of xylose transporters in xylitol production from engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 13:246-252.
37. Khunnonkwao P, Jantama S, Kanchanatawee, Jantama K (2018) Re-engineering *Escherichia coli* KJ122 to enhanced the utilization of xylose and xylose/glucose mixture for efficient succinate production in mineral salt medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:127-141.
38. Kim S, Choi B, Ryu Y, Jung S, Park J, Kim G, Lee S (2015) Simultaneous utilization of glucose and xylose via novel mechanisms in engineering *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 30:141-148.
39. Kim D, Woo H (2018) Deciphering bacterial xylose metabolism and metabolic engineering of industrial microorganism for use as efficient microbial cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 9471-9480.
40. Kreuser K (2013) ADN damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5:1-23.
41. Lu J, Tang J, Liu Y, Zhu X, Zhang T, Zhang X (2012) Combinatorial modulation of *galP* and *glk* gene expression for improved alternative glucose utilization. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 93:2455-2462.
42. Lu H *et al.* (2016) Enhancement of D-lactic acid production from a mixed glucose and xylose substrate by the *Escherichia coli* strain JH15 devoid of glucose effect. *BMC Biotechnology* 16:19-28.
43. Lunin V, Li Y, Schrag J, Iannuzzi P, Cygler M, Matte A (2004) Crystal structures of *Escherichia coli* ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose. *Journal of Bacteriology* 186:6915-6927.
44. Luo Y, Zhang T, Fan D, Mu T, Xue W, Hui J (2014) Enhancing human-like collagen accumulation by deleting the major glucose *ptsG* in recombinant *Escherichia coli* BL21. *Biotechnology Application Biochemistry* 61:237-247.
45. Luo Y, Zhang T, Wu H (2014) The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* 32:905-919.
46. Maiden M, Davis E, Baldwin S, Moore D, Henderson P (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* 325:641-643.
47. Martínez A, Grabar T, Shanmugam K, Yomano L, York S, Ingram L (2007) Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters* 29:397-404.
48. McCloskey D, Xu S, Sandberg T, Brunk E, Hefner Y, Szubin R, Feist A, Palsson B (2018) Adaptive laboratory evolution resolves energy depletion to maintain high aromatic metabolite phenotypes in *Escherichia coli* strains lacking the phosphotransferase system. *Metabolic Engineering* 48:233-242.
49. McDonald T, Walmsley A, Henderson P (1997) Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H⁺ symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *Journal of biological chemistry* 272:15189-15199.

50. McKenzie G, Lee P, Lombardo M, Hastings P, Rosenberg S (2001) SOS mutator ADN polymerase IV functions in adaptative mutation and not adaptative amplification. *Molecular Cell* 7:571-579.
51. Miller C, Fosmer A, Rush B, McMullin T, Beacom D, Suominen P (2011) Industrial production of lactic acid. Reference module in life sciences, from comprehensive biotechnology 3:179-188.
52. Moussatova A, Kandt C, O'Mara M, Tieleman D (2008) ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:1757-1771.
53. Nikaido H and Rosenberg E (1983) Porin channels in *Escherichia coli*: Studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *Journal of Bacteriology* 153:241-252.
54. Nikaido H (1996) Outer membrane. Neidhardt FC. Washington DC: American Society for Microbiology; 1996:1325-1343.
55. Qian Z, Trostel A, Lewis D, Lee S, He X, Stringer A, Wade J, Schenider T, Durfee T, Adhya S (2016) Genome-wide transcriptional regulation and chromosome structural arrangement by GalR in *Escherichia coli*. *Frontiers in Molecular Biosciences* 3:74-84.
56. Roncancio A (2017) Evolución dirigida de la proteína de membrana transportadora GatC y su aplicación en *Escherichia coli* lactogénica. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
57. Sacerdote M and Szostak J (2005) Semipermeable lipid bilayers exhibit diastereoselectivity favouring ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:6004-6008.
58. Sauer U (2001) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag. Berlin. 73:129-169.
59. Sofia H, Burland V, Daniels D, Plunket III G, Blattner F (1994) Analysis of *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nucleic Acids Research* 22:2576-2586.
60. Song S and Park C (1997) Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *Journal of Bacteriology* 179:7025-7032.
61. Stulke J, Hillen W (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2:195-201.
62. Sumiya M, Davis E, Packman L, McDonald T, Henderson P (1995) Molecular genetic of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene xylF, in *Escherichia coli*. *Receptors Channels* 3:117-128.
63. Takahashi H, Inada T, Postma P, Aiba H (1998) CRP down-regulates adenylate cyclase activity by reducing the level of phosphorylated IIA (Glc), the glucose-specific phosphotransferase protein, in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 3:317-326.
64. Utrilla J (2010) Ingeniería metabólica en *Escherichia coli* para la conversión eficiente de xilosa a D-lactato. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología-UNAM.
65. Utrilla J, Licona C, Marcellin E, Gosset G, Nielsen L, Martínez A (2012) Engineering and adaptative evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic engineering* 14:469-476.
66. Utrilla J, Vargas-Tah A, Trujillo B, Gosset G y Martínez A (2016) Production of D-lactate from sugarcane bagasse and corn stover hydrolysates using metabolic engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresource Technology* 220:208-214.
67. de Visser J, Cooper T, Elena S (2011) The causes of epistasis. *Proceedings of the Royal Society* 278: 3617-3624.
68. Wagner J, Nohmi T (2000) *Escherichia coli* ADN polymerase IV mutator activity: genetic requirements and mutational specificity. *Journal of Bacteriology* 182:4587-4595.

69. Wang Q, Wu C, Chen T, Chen X, Zhao X (2006) Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli ptsG* mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobic conditions. *Biotechnology Letters* 28:89-93.
70. Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch V, Hengge R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology* 187:1591-1603.
71. Wei T, Cheng B, Liu J (2016) Genome engineering *Escherichia coli* for L-DOPA overproduction from glucose. *Nature Scientific Reports* 6:30080.
72. Weickert M, Adhya S (1992) Isopressor of the *gal* regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 226:69-83.
73. Yan N (2015) Structural Biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annual Reviews Biophysics* 44:257-283.
74. Yan Q, Fong S (2018) Increasing carbon source uptake rates to improve chemical productivity in metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 53:254-263.
75. Yao R, Hirose Y, Sarkar D, Nakahigashi K, Ye Q, Shimizu K (2011) Catabolic regulation analysis of *Escherichia coli* and its *crp*, *mlc*, *mgsA*, *pgi* and *ptsG* mutants. *Microbial Cell Factories* 10:67-77.
76. Ye L, Zhou X, Hudari M, Li Z, Wu J (2013) Highly efficient production of L- lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology* 132:38-44.
77. Yu C, Cao Y, Zou H, Xian M (2011) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:573-583.
78. Zhou L, Cui W, Liu Z, Zhou Z (2016) Metabolic engineering strategies for D-lactate over production in *Escherichia coli*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 91:576-584.
79. Zhu X, Zhao D, Qiu H, Fan F, Man F, Man S, Bi C, Zhang X (2017) The CRISPR/Cas9-facilitated multiplex pathway optimization (CFPO) technique and its application to improve the *Escherichia coli* xylose utilization pathway. *Metabolic Engineering* 43:37-45.

13. Anexos

13.1. Construcción de las cepas JU15* Δ araH, JU15* Δ galP, JU15* Δ araH Δ galP, JU15* Δ ptsG, JU15* Δ ptsG Δ galR y JU15* Δ ptsG variante Δ galR

A partir de la colección KEIO, se aislaron colonias en una caja con agar LB km³⁰ y se les realizó extracción de ADN cromosomal con la técnica de ebullición. Posteriormente, se comprobó el genotipo de casete de resistencia a kanamicina por tamaño de producto de PCR, con los cebadores descritos en la Tabla 3. Se utilizó como control la cepa JU15* y se confirmó que esta cepa tenía los genes que se iban a eliminar por transducción. Para la evaluación del gen *ptsG* se utilizó el cebador de confirmación de kanamicina, k2, ya que el gen y el casete (que sustituye el gen) tienen tamaño similar, *ptsG* 2384pb y Δ *ptsG::km^R* 2451pb. En la evaluación de la mutante KEIO ECK2938 no se utilizó el cebador galP Fw, ya que esta mutante no tiene la región de alineamiento del cebador, debido a que el casete de kanamicina sustituye esta secuencia que flanquea al gen *galP*. En todos los productos se observaron los tamaños esperados.

Tabla 12. Comprobación de las cepas KEIO y los genes a eliminar de la cepa JU15*.

Se describen los cebadores y muestras de ADN que se utilizaron por cada carril. Los resultados de amplificación de productos por PCR se muestran en las Figura 15 y 16.

Carril	Cebador	Muestra de ADN	Tamaño (pb)
1	ptsG Fw-ptsG Rv	JU15*	2384
2	ptsG Fw-ptsG Rv	ECK1087	2471
3	k2-ptsG Rv	ECK1087	1295
4	galR Fw-galR Rv	JU15*	1520
5	galR Fw-galR Rv	ECK2835	1988
6	araH Fw-araH Rv	JU15*	1709
7	araH Fw-araH Rv	ECK1897	2239
8	k2- araH Rv	ECK1897	1123
9	galP Fw-galP Rv	JU15*	2392
10	galP Fw-galP Rv	ECK2938	2517
11	k2-galP Rv	ECK2938	1300

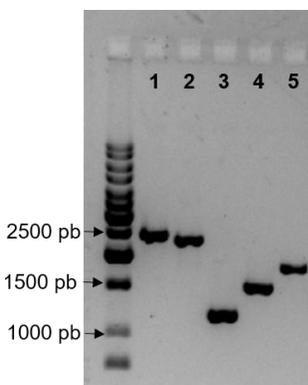


Figura 15. Comprobación de los genotipos *ptsG*, $\Delta ptsG::km^R$, *galR* y $\Delta galR::km^R$ en las cepas KEIO y la cepa JU15*.

Carril 1 confirmación de gen *ptsG* en cepa JU15* (2384 pb); carriles 2 y 3, confirmación de genotipo $\Delta ptsG::km^R$ en la cepa ECK1087, carril 2 (2471 pb) y carril 3 (1295 pb); carril 4, confirmación gen *galR* en cepa JU15* (1520 pb) y carril 5, genotipo $\Delta galR::km^R$ en la cepa ECK2835 (1988 pb).

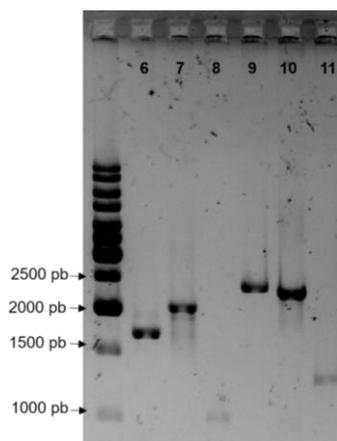


Figura 16. Comprobación de los genotipos *araH*, $\Delta araH::km^R$, *galP* y $\Delta galP::km^R$ en las cepas KEIO y la cepa JU15*.

Carril 6, confirmación de gen *araH* en JU15* (1709 pb); carriles 7 y 8, genotipo $\Delta araH::km^R$ en la cepa ECK1897, carril 7 (2239 pb) carril 8 (1123 pb); carril 9, gen *galP* en JU15* (2392 pb); carriles 10 y 11, genotipo $\Delta galP::km^R$ en la cepa ECK2938, carril 10 (2517 pb) y carril 11 (1300 pb).

Mediante la técnica de transducción por fagos se obtuvieron las cepas JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta galP$, y JU15* $\Delta araH$. En todos los casos, se seleccionaron al azar alrededor de 5 colonias y se comprobó el genotipo por tamaño de producto de PCR. Los cebadores y las muestras de ADN utilizadas se describen en la Tabla 13. En las Figuras 17 y 18 se observan los geles con los tamaños de banda obtenidos. En todos los productos se obtuvieron los tamaños de banda esperados.

Tabla 13. Comprobación de la eliminación de los genes *ptsG*, *galP* y *araH* en la cepa JU15*.

Carril	Cebador	muestra de ADN	Tamaño (pb)
1	ptsG Fw-ptsG Rv	JU15* $\Delta ptsG::km^R$	2384
2	k2-ptsG Rv	JU15* $\Delta ptsG::km^R$	1356
3	araH Fw-araH Rv	JU15* $\Delta araH::km^R$	2239
4	galP Fw-galP Rv	JU15* $\Delta galP::km^R$	2517
5	k2-galP Rv	JU15* $\Delta galP::km^R$	1300

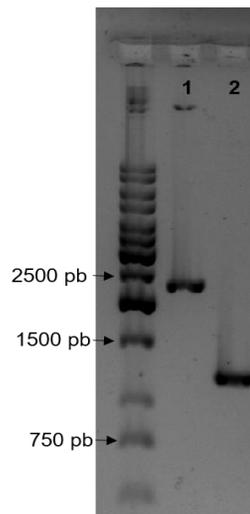


Figura 17. Comprobación del genotipo de la mutante JU15* $\Delta ptsG::km^R$.

Carril 1, casete de kanamicina en sustitución del gen *ptsG*, cebadores externos (2384 pb) y carril 2, cebador externo con cebador interno de kanamicina (1356 pb).

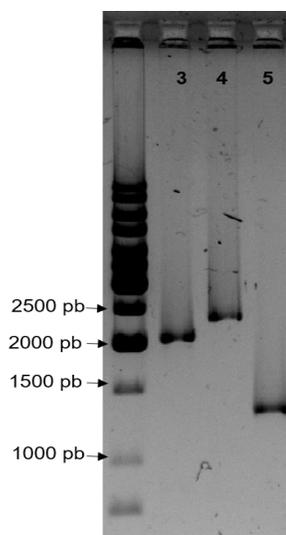


Figura 18. Comprobación de los genotipos de las mutantes JU15* $\Delta araH::km^R$ y JU15* $\Delta galP::km^R$.

Carril 3, casete de kanamicina en sustitución del gen *araH* en la cepa JU15*, cebadores externos (2239 pb); carril 4, casete de kanamicina en sustitución del gen *galP* en la cepa JU15*, cebadores externos (2517 pb) y carril 5, cebador externo con cebador interno de kanamicina (1300 pb), cepa JU15* $\Delta galP::km^R$.

Cuando se evaluó el consumo de glucosa-xilosa en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ se observó que uno de los triplicados tenía un crecimiento superior al resto, por lo que se decidió aislar una muestra para descartar contaminación del cultivo. Mediante tamaño de producto de PCR se evaluó el genotipo $\Delta ptsG::km^R galR^+$ en dicha muestra (Tabla 14). Los resultados muestran que la bacteria tiene sustituido el gen *ptsG* por el gen de resistencia a kanamicina, además de que el gen *galR* se encuentra en cromosoma (Figura 19). Se evaluó el consumo de glucosa-xilosa de esta variante, JU15* $\Delta ptsG$ variante. Posteriormente se le eliminó el gen regulador de galactosa, *galR*, para evaluar el efecto sobre el fenotipo de consumo de glucosa.

Tabla 14. Comprobación de genotipo $\Delta ptsG::km^R$ y $galR^+$ en la variante obtenida. Los resultados de la PCR se muestran en la Figura 8.

Carril	Cebador	Muestra ADN	Tamaño (pb)
1	ptsG Fw-ptsG Rv	JU15* $\Delta ptsG::km^R$ variante	2451
2	k2-ptsG Rv		1395
3	galR Fw-galR Rv		1520

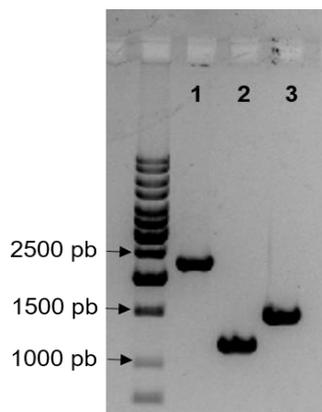


Figura 19. Comprobación de los genotipos $\Delta ptsG::km^R$ y $galP^+$ en la cepa JU15* $\Delta ptsG$ variante.

Carriles 1 y 2, confirmación del casete de kanamicina en sustitución del gen $ptsG$. Carril 1 cebadores ptsG Fw-ptsG Rv (2451 pb) y carril 2 cebadores k2-ptsG Rv (1395 pb). Carril 3, confirmación del gen $galR$, cebadores galR Fw- galR Rv (1520 pb).

Para la construcción de las cepas dobles mutantes, se transformó a las cepas JU15* $\Delta araH::km^R$, JU15* $\Delta ptsG::km^R$ y JU15* $\Delta ptsG::km^R$ variante con el plásmido pCP20 con el objetivo de eliminar el gen de resistencia a kanamicina, cuya escisión de este gen deja un sitio FRT sobre el genoma. La comprobación se hizo por tamaño de producto de PCR y en todos los productos se observaron los tamaños esperados. En la Tabla 15 se describen los cebadores y las muestras de ADN utilizadas. En las Figuras 20 y 21 se observan los geles con los tamaños de banda obtenidos. En todos los productos se obtuvieron los tamaños de banda esperados.

Tabla 15. Comprobación de la eliminación del casete de resistencia en las cepas JU15* $\Delta ptsG$, JU15* $\Delta ptsG$ variante y JU15* $\Delta araH$.

También se describe el cebador y muestra de ADN utilizada para confirmar el gen *galP* en la cepa JU15* $\Delta ptsG$.

Carril	Cebador	muestra de ADN	Tamaño (pb)
1	ptsG Fw-ptsG Rv	JU15* $\Delta ptsG::FRT$	1080
2	galR Fw-galR Rv	JU15* $\Delta ptsG::FRT$	1520
3	ptsG Fw-ptsG Rv	JU15* $\Delta ptsG::FRT$ variante	1080
4	araH Fw-araH Rv	JU15* $\Delta araH::FRT$	848

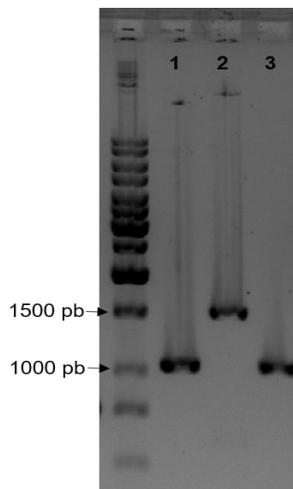


Figura 20. Comprobaciones del genotipo *FRT* y del gen *galR* en la cepa JU15* $\Delta ptsG::FRT$.

Carril 1, tamaño de banda de *FRT* en cepa JU15* $\Delta ptsG::FRT$, cebadores ptsG Fw-ptsG Rv (1080 pb); carril 2, genotipo *galR* en cepa JU15* $\Delta ptsG::FRT$, cebadores galR Fw-galR Rv (1520 pb) y carril 3, tamaño de banda de *FRT* en cepa JU15* $\Delta ptsG::FRT$ variante, cebadores ptsG Fw-ptsG Rv (1080 pb).

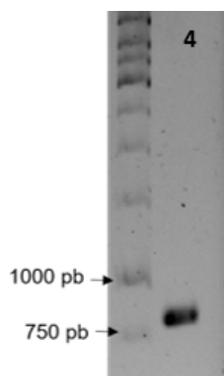


Figura 21. Comprobación del tamaño de banda de *FRT* en la cepa *JU15* ΔaraH::FRT*. Carril 4, cebadores *araH Fw-araH Rv* (848 pb).

Una vez comprobada la eliminación del casete de resistencia de kanamicina a las cepas. Se obtuvieron las cepas *JU15* ΔptsG ΔgalR*, *JU15* ΔptsG variante ΔgalR* y *JU15* ΔaraH ΔgalP*, mediante el método de transducción con fagos. En la Tabla 16 se describen los cebadores y las muestras de ADN utilizadas para la comprobación genotípica. En las Figuras 22 y 23 se observan los geles con los tamaños de banda obtenidos por PCR. En todos los productos se obtuvieron los tamaños de banda esperados.

Tabla 16. Comprobación de las mutantes *JU15* ΔptsG ΔgalR*, *JU15* ΔptsG variante ΔgalR* y *JU15* ΔaraH ΔgalP*.

Carril	Cebador	muestra de ADN	Tamaño (pb)
1	ptsG Fw-ptsG Rv	<i>JU15* ΔptsG::FRT</i> <i>ΔgalR::km^R</i>	1080
2	galR Fw-galR Rv	<i>JU15* ΔptsG::FRT</i> <i>ΔgalR::km^R</i>	1988
3	ptsG Fw-ptsG Rv	<i>JU15* ΔptsG::FRT variante</i> <i>ΔgalR::km^R</i>	1080
4	galR Fw-galR Rv	<i>JU15* ΔptsG::FRT variante</i> <i>ΔgalR::km^R</i>	1988
5	galP Fw-galP Rv	<i>JU15* ΔaraH::FRT</i> <i>ΔgalP::km^R</i>	2517
6	K2-galP Rv	<i>JU15* ΔaraH::FRT</i> <i>ΔgalP::km^R</i>	1300

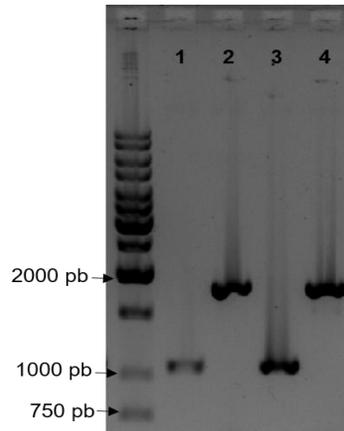


Figura 22. Comprobación del genotipo $\Delta ptsG::FRT \Delta galR::km^R$.

Confirmación de genotipo $\Delta ptsG::FRT$ con cebadores ptsG Fw-ptsG Rv (1080 pb), carril 1 muestra JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ y carril 3 muestra JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$. Confirmación de genotipo $\Delta galR::km^R$ con cebadores galR Fw-galR Rv (1988 pb), carril 2 muestra JU15* $\Delta ptsG \Delta galR$ y carril 4 muestra JU15* $\Delta ptsG$ variante $\Delta galR$.

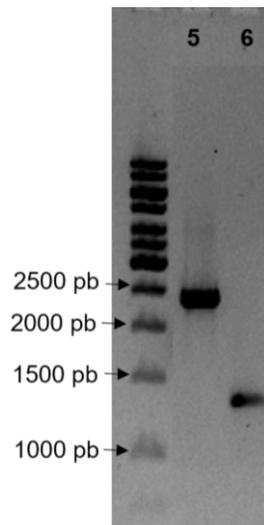


Figura 23. Comprobación del genotipo $\Delta galP::km$ en la cepa JU15* $\Delta araH::FRT \Delta galP::km$.

Carril 5 cebadores galP-Fw-galP Rv (2517pb), carril 6 cebadores k2-galP Rv (1300pb).

13.2. Eliminación del gen *gatC S184L* de las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$

La eliminación del gen *gatC S184L* se llevó a cabo por el método de transducción con el fago P-1 descrito en el Numeral 8.2. La cepa ECK2085 con fondo genético MG1655 $\Delta gatC::Km^R$ se empleó como cepa donadora y como cepa receptora se utilizaron las cepas JU15*, JU15* $\Delta araH$, JU15* $\Delta galP$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP$, a las cuales previamente se les eliminó el casete de resistencia a kanamicina con el plásmido pCP20. A las colonias candidatas que se obtuvieron por la técnica de transducción con fago se hizo extracción de ADN cromosomal con la técnica de ebullición. Se realizó la comprobación genotípica por tamaño de producto de PCR, con los cebadores *gatC Fw*, *gatC Rv* y *k2* (Tabla 3). Las cepas evaluadas se describen en la Tabla 17 y los resultados de la PCR se muestran en la Figura 24.

Tabla 17. Comprobación de los genotipos $\Delta gatC::km$ en la cepa KEIO, *gatC S184L* en JU15* y $\Delta gatC S184L::km$ en las mutantes construidas.

Carril	Cebador	Muestra de ADN	Tamaño (pb)
1	<i>gatC Fw-gatC Rv</i>	KEIO $\Delta gatC::km$	2154
2	<i>k2-gatC Rv</i>	KEIO $\Delta gatC::km$	1338
3	<i>gatC Fw-gatC Rv</i>	JU15*	1992
4	<i>k2-gatC Rv</i>	JU15*	No amplifica
5	<i>gatC Fw-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta gatC S184L::km$	2154
6	<i>k2-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta gatC S184L::km$	1338
7	<i>gatC Fw-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta araH \Delta gatC S184L::km$	2154
8	<i>k2-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta araH \Delta gatC S184L::km$	1338
9	<i>gatC Fw-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta galP \Delta gatC S184L::km$	2154
10	<i>k2-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta galP \Delta gatC S184L::km$	1338
11	<i>gatC Fw-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC S184L::km$	2154
12	<i>k2-gatC Rv</i>	JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC S184L::km$	1338

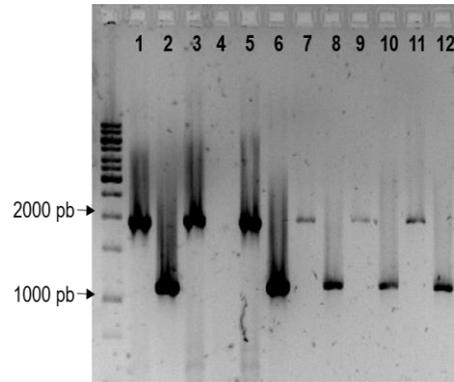


Figura 24. Comprobación del genotipo $\Delta gatC::km^R$ en KEIO, $gatC S184L$ en JU15* y $\Delta gatC S184L::km$ en mutantes construidas.

Carril 1 y 2 confirmación del genotipo $\Delta gatC::km$ en la cepa KEIO; carril 3 confirmación del gen $gatC S184L$ en la cepa JU15*; carril 4 comprobación de ausencia de casete de resistencia a kanamicina en la cepa JU15* (no debe amplificar banda con el cebador interno k2); carril 5 al 12 confirmación del genotipo $\Delta gatC S184L::km$ en las 4 mutantes obtenidas.

13.3. Análisis estadístico de las mutantes *gatC*

Análisis estadístico ANOVA de la velocidad específica de consumo de xilosa en las cepas JU15* $\Delta gatC$, JU15* $\Delta araH \Delta gatC$, JU15* $\Delta galP \Delta gatC$ y JU15* $\Delta araH \Delta galP \Delta gatC$

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F calculada	F de tablas 0.05; 3; 8	p-valor
Tratamientos	3	0.4751	0.15836	1.72646	4.06618	0.23859
Error	8	0.7338	0.09172			
Total	11	1.2089				

Como $1.72 < 4.06$, se acepta la hipótesis nula; no hay efecto de los genes eliminados sobre la velocidad específica de consumo de xilosa de las cepas evaluadas.

13.4. Evaluación de cepas MG1655 y MG1655 $\Delta galP$ en medio AM1 con xilosa 40g/L

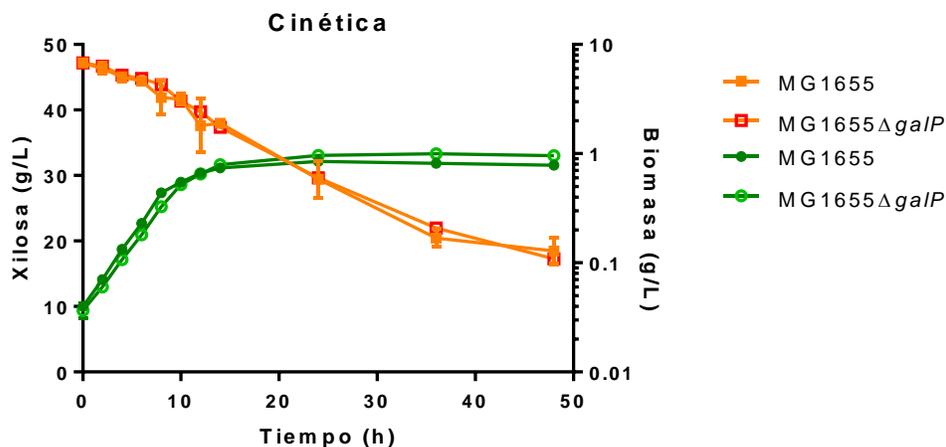


Figura 25. Cinética de crecimiento y consumo de xilosa de las cepas MG1655 y MG1655 $\Delta galP$, medio AM1 con 40 g/L de xilosa.

Tabla 18. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas MG1655 y MG1655 $\Delta galP$, medio AM1 con 40g/L de xilosa.

Parámetro	Genotipo	
	MG1655	MG1655 $\Delta galP$
Velocidad de crecimiento μ (h^{-1})	0.28 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00
Velocidad específica de consumo de xilosa q_s ($g_{xilosa} / g_{DCW} \cdot h$)	3.56 \pm 0.16	3.47 \pm 0.23
Consumo volumétrico Q_s ($g_{xilosa} / L \cdot h$), 14 h	0.65 \pm 0.03	0.70 \pm 0.04
Consumo volumétrico Q_s ($g_{xilosa} / L \cdot h$), 48 h	0.59 \pm 0.03	0.62 \pm 0.00

13.5. Procedimiento de eliminación de casete de kanamicina de la cepa JU15

Como una primera etapa del proyecto se eliminó el casete de resistencia a kanamicina que sustituía el operón *xyIFGH* en la cepa JU15, JU15 $\Delta xyIFGH::Km^R$. Debido a que uno de los sitios FRT del gen de resistencia tenía una mutación, no fue posible utilizar el plásmido pCP20 para escindir el gen. Por lo que la estrategia que se siguió fue la obtención de la cepa MG1655 $\Delta xyIFGH::Cm^R$ la cual serviría como fondo genético para hacer fagos, los cuales mediante transducción sustituirían el casete de resistencia a kanamicina, en la cepa JU15 $\Delta xyIFGH::Km^R$, por el de cloranfenicol. Con el método de Datsenko (Datsenko y Warner, 2010) se sustituyó el operón *xyIFGH* de la cepa MG1655 de *E. coli* por un gen de resistencia a cloranfenicol. Para ello se utilizaron cebadores (Utrilla, 2010) que alinean con la región externa del operón *xyIFGH* y con una secuencia que flanquea el gen de resistencia a cloranfenicol del plásmido pKD3. Mediante PCR se obtuvo un fragmento que contiene la secuencia del gen de resistencia a cloranfenicol flanqueada por secuencias que alinean con la región externa del operón *xyIFGH*. Posteriormente, este fragmento se introdujo por electroporación en la cepa MG1655, la cual previamente había sido transformada con el plásmido pKD46. Se evaluó por PCR el tamaño del casete de resistencia a cloranfenicol y a la cepa confirmatoria se le hicieron pases a 42°C para eliminar el plásmido pKD46. Mediante transducción se atacó a la cepa JU15 $\Delta xyIFGH::Km^R$ con fagos que tenían el fondo genético de la cepa MG1655 $\Delta xyIFGH::Cm^R$ y mediante PCR se evaluaron colonias candidatas al casete de resistencia a cloranfenicol. La cepa obtenida, JU15 $\Delta xyIFGH::Cm^R$, fue transformada con el plásmido pCP20 para eliminar el casete de resistencia. Se hizo PCR para confirmar el tamaño que deja la escisión del casete. Mediante este flujo de trabajo se obtuvo la cepa JU15 $\Delta xyIFGH::FRT$, denominada para fines prácticos como JU15*. La cual se utilizó para la obtención de las cepas de este trabajo.