



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTALISIS**

**INGENIERÍA DE BIOPROCESOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PIRÚVICO A  
PARTIR DE GLUCOSA, XILOSA Y UN HIDROLIZADO DE RASTROJO DE MAÍZ CON  
*Escherichia coli***

**Presenta:**

**MAURICIO LÓPEZ PORTILLO MASSON**

Tutor:

**ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente	Dr. Agustín López Munguía Canales
Secretaria	Dra. Cinthia Ernestina Núñez López
Vocal	Dr. Juan Carlos Sigala Alanís
Vocal	Dra. Luz de María Breton Deval
Vocal	Dr. José Alberto Hernández Eligio

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 de este 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.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres por el amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocuparon por mi avance y desarrollo de esta tesis.

Gracias por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día creer en mí, gracias por cada consejo y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Biol. Mario Alberto Bermúdez Caro por su importante apoyo técnico en la preparación de los experimentos realizados en este trabajo.

A la Dra. Estefanía Sierra Ibarra quien con su apoyo y consejo ayudó tanto en la parte experimental como en la redacción del presente trabajo.

Al personal de la Facultad de ciencias agropecuarias, UAEM en especial al secretario académico ing. Jesús Eduardo Licea Reséndiz por la donación del rastrojo de maíz.

A la Dra. Katy Juárez López y la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera por formar parte de mi comité tutorial y por sus importantes contribuciones a este trabajo a lo largo de los cuatro semestres.

Al jurado que participó en la revisión del presente manuscrito, sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por sus consejos y sugerencias, por ayúdame a crecer como persona y profesionalmente.

Al personal de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto y a los estudiantes y personal académico del Laboratorio de Ingeniería de Vías metabólicas por hacer este trabajo posible.

A la M. en C. Georgina Hernández Chávez por su apoyo en los análisis de muestra con HPLC.

A la Dra. Alejandra Vargas Tah por la construcción de la cepa AV13.

Al CONACyT por el apoyo económico que hizo posible el presente trabajo.

## Índice general

Índice general .....	6
Índice de figuras .....	8
Índice de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
Resumen .....	10
Abstract.....	12
1. Antecedentes.....	13
1.1 La importancia del ácido pirúvico.....	13
1.2 Organismos de interés en la producción de piruvato.....	14
1.3 Metabolismo en <i>E. coli</i> para el desarrollo de una cepa productora de piruvato.....	16
1.4 Condiciones de cultivo para la producción de piruvato.....	17
1.5 El potencial uso de residuos lignocelulósicos.....	21
1.6 Represión catabólica por carbono.....	22
1.7 La vía del metilglioxal .....	26
1.8 <i>E. coli</i> es capaz de utilizar piruvato como fuente de carbono .....	27
1.9 Antecedentes en el grupo de trabajo.....	28
...1.10 Construcción de la cepa AV13.....	32
2. Justificación .....	34
3. Hipótesis .....	34
4. Objetivo general .....	35
5. Objetivos particulares .....	35
6. Metodología.....	36
6.1 Microorganismos .....	36
6.2 Medio de cultivo.....	36
6.3 Preparación del inóculo .....	37
6.4 Condiciones de operación.....	38
6.5 Cultivos continuos .....	38
6.6 Balance de Carbono.....	41
6.7 Cultivo lote alimentado .....	41
6.8 Determinación de la concentración celular .....	42

6.9 Estudio de la velocidad de transferencia de oxígeno.....	42
6.10 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $k_{LA}$ .....	43
6.11 Determinación de compuestos.....	44
6.12 Ensayo de Bial para dererminación de pentosas.....	44
6.13 Hidrolizados .....	45
6.14 Parámetros celulares.....	46
7. Resultados y discusión .....	48
7.1 Es posible controlar la producción de piruvato en cultivos con limitación de oxígeno con la cepa AV13.....	48
7.2 La cepa AV13 consume eficientemente glucosa, xilosa y la mezcla de ambos azúcares .....	51
7.3 La implementación de un cultivo alimentado permite obtener concentraciones más altas de piruvato con respecto a los cultivos lote.....	59
7.4 El uso de cultivos continuos no representa una mejora a los parámetros observados en cultivo lote.....	62
7.5 Rendimientos .....	69
7.6 Productividad volumétrica.....	71
7.7 El flujo de carbono en la cepa AV13 se dirige mayoritariamente a la síntesis de piruvato en cultivos lote pero no en continuos .....	74
7.8 La cepa AV13 produce piruvato a partir de hidrolizados de rastrojo de maíz .....	78
7.9 El piruvato es el compuesto mayoritario en las fermentaciones realizadas .....	81
8. Resumen de resultados.....	83
9. Conclusiones.....	85
10. Perspectivas .....	86
11. Referencias .....	88

## Índice de figuras

Esquema 1.....	24
Figura 1A metabólicas que participan directamente en el metabolismo de piruvato en <i>E. coli</i> .....	31
Figura 2. Glucosa residual y producción de piruvato a distintos valores de $k_{LA}$ .....	49
Figura 3. Velocidad de crecimiento en función del $k_{LA}$ .....	50
Figura 4. Producción y consumo de piruvato de la cepa AV13 a un $k_{LA}$ correspondiente a $145\text{ h}^{-1}$ .....	51
Figura 5. Cinéticas de producción con xilosa y mezcla a un $k_{LA}$ de $145\text{ h}^{-1}$ .....	52
Figura 6. Concentración máxima de piruvato en cultivo lote.....	55
Figura 7. Productividad volumétrica obtenida para cada condición de $k_{LA}$ ensayada.....	56
Figura 8. Rendimientos correspondientes a las cinéticas realizadas en cultivos lote.....	57
Figura 9. Fermentación realizada en cultivo tipo lote alimentado con una sola adición de hidratos de carbono.....	60
Figura 10. Resumen de resultados de experimentos en cultivo continuo 10 B Peso seco obtenido a cada tasa de dilución.....	63,64
Figura 11- Velocidad específica de consumo de sustrato en cultivo continuo.....	66
Figura 12. Velocidad específica de producción de piruvato en cultivo continuo.....	68
Figura 13. Productividad volumétrica en cultivo continuo . .....	68
Figura 14. Concentración máxima de piruvato en cultivo continuo.....	69
Figura 15 A) Balance de carbono correspondiente a las fermentaciones en cultivo lote con glucosa B) Cultivo lote con xilosa y mezcla, C) lote alimentado y D) Cultivo continuo.....	75,76
Figura 16. Prueba de concepto en hidrolizados de rastrojo de maíz.....	79
Figura 17. Otros componentes en el medio.....	81

## Índice de tablas

Tabla 1. Enzimas involucradas en el metabolismo de piruvato en <i>E. coli</i> .....	19
Tabla 2. Tasas de dilución, flujo y tiempo de residencia en cultivos continuos.....	39
Tabla 3. Equivalencia entre rpm, $k_{LA}$ y OTR en cultivo lote.....	48
Tabla 4. Velocidad de crecimiento en cada $k_{LA}$ probado.....	53
Tabla 5. Rendimientos en cultivo continuo.....	70
Tabla 6. Productividad volumétrica en cultivo continuo.....	71
Tabla 7. Otros parámetros (OTR, CER, RQ) .....	72

## Abreviaturas

Símbolo	Definición	Unidades
<i>ack</i>	Gen que codifica para acetato cinasa	
<i>adhE</i>	Gen que codifica para aldehído-alcohol deshidrogenasa	
<i>btsT</i>	Gen que codifica para un simportador de protón/piruvato	
<b>CER</b>	velocidad de evolución de CO <sub>2</sub>	mmol CO <sub>2</sub> / (m <sup>3</sup> s)
<i>cstA</i>	Gen que codifica para un transportador de péptidos relacionado con metabolismo de piruvato	
<b>D</b>	Tasa de dilución	h <sup>-1</sup>
<b>DCW</b>	Peso seco (por sus siglas en inglés: Dry Cellular Weigth)	g <sub>DCW</sub> /L
<b>DO</b> (600 nm)	Densidad óptica 600nm	-
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	-
<i>frdA</i>	Gen que codifica para la subunidad A de fumarato reductasa	
<b>G (Glc)</b>	Glucosa	g/L
<i>gatC</i>	Gen que codifica para el transportador transmembranal de galactitol	
<b>GX</b>	Mezcla de Glucosa y Xilosa	g/L
<b>kan (km)</b>	Kanamicina	-
<b>k<sub>L</sub>a</b>	Coefficiente volumétrico global de transferencia de oxígeno	h <sup>-1</sup>
<i>ldhA</i>	Gen que codifica para lactato deshidrogenasa A	
<i>mgsA</i>	Gen que codifica para metilglioal sintasa A	
<b>OTR</b>	Velocidad de transferencia de oxígeno	mmol oxígeno/ (m <sup>3</sup> s)
<b>OUR</b>	Velocidad de consumo de oxígeno	mmol oxígeno/ (m <sup>3</sup> s)
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa compuesto por los genes <i>pdhR-aceE-aceF-lpd</i>	
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato	
<i>pepC</i>	Gen que codifica para fosfoenolpiruvato carboxilasa	
<i>pflB</i>	Gen que codifica para piruvato formato liasa	
<i>poxB</i>	Gen que codifica para piruvato oxidasa	
<i>pta</i>	Gen que codifica para fosfato acetiltransferasa	
<i>pyk</i>	Gen que codifica para piruvato cinasa	
<b>pyr</b>	Piruvato	g/L
<b>q<sub>p</sub></b>	Velocidad específica de producción	g <sub>p</sub> /g <sub>DCW</sub> .h
<b>Q<sub>p</sub></b>	Productividad volumétrica	g <sub>p</sub> /L.h
<b>q<sub>s</sub></b>	Velocidad específica de consumo de sustrato	g <sub>s</sub> /g <sub>DCW</sub> .h
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto	1/min

<b>TCA</b>	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	
<b>vvm</b>	Volumen de aire sobre volumen de medio por minuto	vvm
<b>x</b>	Biomasa	g <sub>DCW</sub> /L
<b>X (Xyl)</b>	Xilosa	g/L
<b><i>xylFGH</i></b>	Operón que codifica para el transportador de xilosa (dependiente de ATP) ABC	
<b>Y<sub>p/s</sub></b>	Rendimiento producto /sustrato	g <sub>p</sub> /g <sub>s</sub>
<b>Y<sub>p/x</sub></b>	Rendimiento producto /biomasa	g <sub>p</sub> /g <sub>x</sub>
<b>Y<sub>x/s</sub></b>	Rendimiento biomasa /sustrato	g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub>
<b><i>yhjX</i></b>	Gen que codifica para una proteína membranal inducible por piruvato	
<b>μ</b>	Velocidad específica de crecimiento	h <sup>-1</sup>
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture	
<b>PPP</b>	Vía de la pentosa fosfato	

**Palabras clave: piruvato, glucosa, xilosa, limitación de oxígeno, velocidad de transferencia de oxígeno, hidrolizado de rastrojo de maíz**

## Resumen

En el presente trabajo se evaluó a la cepa AV13: MG1665 (*ΔpflB*, *ΔadhE*, *ΔfrdA*, *ΔldhA*, *ΔxylFGH*, *Δreg 27.3 kb*, *gatC S184L*, *ΔmidarpA*, *ΔmgsA*, *ΔpoxB*, *Δack-pta*) en la producción de piruvato y se encontró que el uso de coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno entre 96 y 190 h<sup>-1</sup> resulta en una condición de limitación de oxígeno que favorece la concentración de piruvato y la productividad volumétrica de formación de dicho ácido.

Se concluyó que un k<sub>La</sub> de 145 h<sup>-1</sup> es un criterio de escalamiento adecuado para la producción de piruvato en reactores de 1 y 3 litros, alcanzando rendimientos de piruvato/glucosa, piruvato/xilosa y piruvato/glucosa-xilosa, cercanos al máximo teórico y las concentraciones de producto más altas reportadas hasta el momento en cultivo lote.

Asimismo, resultados en cultivos lote, continuo y lote alimentado validan dicho  $k_{La}$  y permiten maximizar el rendimiento producto/sustrato, la productividad volumétrica de piruvato y la concentración máxima alcanzada de dicho producto dependiendo de la estrategia de cultivo que se siga. Se encontró que el fondo genético de la cepa le permite consumir simultáneamente glucosa y xilosa produciendo piruvato a concentraciones similares en todos los casos por lo que se sugiere que la cepa no presenta represión catabólica bajo las condiciones utilizadas en cultivos lote. También se encontró que dicha cepa es capaz de consumir piruvato como fuente de carbono una vez que se agotó la fuente principal de carbohidrato (glucosa y/o xilosa en cultivo lote). Dicho efecto se observó igualmente en cultivos continuos, pero en esta ocasión el piruvato se consumió a la par de la xilosa lo cual es un efecto poco esperado. Los datos obtenidos se utilizaron con el fin de aumentar la concentración máxima de producto en cultivo lote alimentado, lo cual resultó ser mucho mayor que la concentración de piruvato más alta reportada en cualquier tipo de cultivo hasta el momento para la producción de piruvato.

Finalmente se presenta una prueba de concepto en cultivo lote utilizando hidrolizado de rastrojo de maíz para la producción de piruvato bajo las condiciones de cultivo seleccionadas, que demuestra la factibilidad de dicho proceso a partir de desechos agroindustriales.

**Keywords: pyruvate, glucose, xylose, oxygen limitation, oxygen transfer rate, maize stover hydrolyzate**

## **Abstract**

In the present work we evaluated the strain AV13: MG1665 ( $\Delta pflB$ ,  $\Delta adhE$ ,  $\Delta frdA$ ,  $\Delta dhA$ ,  $\Delta xylFGH$ ,  $\Delta reg$  27.3 kb,  $gatC$  S184L,  $\Delta midarpA$ ,  $\Delta mgsA$ ,  $\Delta poxB$ ,  $\Delta ack-pta$ ) in the production of pyruvate and it was found that the use of volumetric coefficients of oxygen transfer between 96 and 190 h<sup>-1</sup> results in an oxygen limiting condition that favors the concentration of pyruvate and the volumetric productivity of formation of said acid.

It was concluded that a  $k_{La}$  of 145 h<sup>-1</sup> is an appropriate scaling criterion for the production of pyruvate in reactors of 1 and 3 liters, reaching yields of pyruvate / glucose, pyruvate / xylose and pyruvate / glucose-xylose, close to the theoretical maximum and the highest product concentrations reported so far in batch culture.

Likewise, results in batch, continuous and batch cultures validate said  $k_{La}$  and allow to maximize the product / substrate yield, volumetric productivity of pyruvate and the maximum concentration reached of said product depending on the cultivation strategy that is followed. It was found that the genetic background of the strain allows it to simultaneously consume glucose and xylose producing pyruvate at similar concentrations in all cases, so it is suggested that the strain does not present catabolic repression under the conditions used in batch cultures. It was also found that said strain is capable of consuming pyruvate as a carbon source once the main source of carbohydrate (glucose and / or xylose in batch culture) was exhausted. This effect was also observed in continuous crops, but this time pyruvate was consumed at the same time as xylose, which is an unexpected effect. The data obtained were used in order to increase the maximum concentration of product in batch fed culture, which turned out to be much higher than the highest pyruvate concentration reported in any type of crop so far for the production of pyruvate.

Finally, a proof of concept is presented in batch culture using maize stubble hydrolyzate for the production of pyruvate under the selected culture conditions, which demonstrates the feasibility of this process from agroindustrial waste.

# 1. Antecedentes

## 1.1 La importancia del ácido pirúvico

El piruvato es una molécula compuesta por tres carbonos y es tal vez una de las moléculas más importantes para la vida debido a que se encuentra involucrada en una gran cantidad de rutas metabólicas. El piruvato es una molécula con un alto valor energético, además de ser altamente reactiva debido a que presenta dos grupos funcionales, un grupo carboxilo y uno cetónico ( $\text{CH}_3 \text{ CO COOH}$ ). El piruvato es un intermediario central en muchas de las rutas metabólicas de microorganismos, así como de organismos superiores y es el producto final de la glucólisis en el metabolismo de la glucosa y otros azúcares. La producción de piruvato se lleva a cabo tanto en condiciones aeróbicas como condiciones anaeróbicas. En condiciones metabólicas normales el piruvato es inmediatamente utilizado en otras rutas metabólicas por lo cual es poco común encontrar altas cantidades de piruvato, tanto intracelularmente como en el medio externo.

Por otro lado, la demanda comercial de ácido pirúvico ha aumentado enormemente en las últimas décadas debido a sus diversas aplicaciones. Por ejemplo: es utilizado como sustrato para la síntesis de muchos fármacos, agroquímicos y como precursor de otras moléculas.

Se han realizado extensas investigaciones sobre el piruvato desde hace más de 30 años. Dichos estudios reportan que el piruvato promueve la pérdida de peso y acelera el metabolismo de tejido adiposo en el humano (Stanko, 1989). Algunos ensayos clínicos también indican que el piruvato en mezcla con otros nutrientes, en forma de suplemento alimenticio, puede mejorar el desempeño durante sesiones de ejercicio aeróbico (Stanko, 1989). Se ha descubierto que en las células del cuerpo humano, el piruvato presenta la capacidad de fungir como antioxidante, inhibiendo la producción de radicales libres dañinos para el organismo (Deboer, 1993, Cicalese, 1996, Cicalese, 1997). Es por esta misma razón que se ha propuesto que el piruvato podría ser usado en terapias para combatir ciertos tumores, tal y como se ha evaluado en tratamientos de tumores en animales (Stanko, 1994).

Comercialmente el piruvato se utiliza también como un bloque de construcción en la síntesis de fármacos como L-triptófano y L-dihidroxifenilalanina (Nakazawa *et al.* 1972), por vías exógenas sintéticas se puede formar acetona por un proceso que involucra la descarboxilación del  $\alpha$ -acetolactato (aromatizante en industria vinícola), 2-3-butanodiol (precursor de plástico como poliuretano y aditivo en pesticidas) y alcohol isobutílico (aditivo en tintas y como saborizante).

Industrialmente el piruvato se produce por la deshidratación y descarboxilación del ácido tartárico o por métodos de pirólisis. También se produce en algunos casos a partir de la deshidrogenación oxidativa del lactato (Hayashi *et al.* 1993). El ácido pirúvico se produce a escala industrial por el método clásico que incluye la deshidratación y la descarboxilación del ácido tartárico a 220 °C en presencia de  $\text{KHSO}_4$ . Hoy en día para la producción industrial de piruvato se usan métodos que consumen altas cantidades de energía y son incompatibles con el medio ambiente debido a que utilizan grandes cantidades de solventes, por lo cual es deseable encontrar procesos sostenibles de síntesis de piruvato (Howard and Fraser., 1932).

## **1.2 Organismos de interés en la producción de piruvato**

Debido a la importancia de la molécula de piruvato, se ha estudiado la forma de poder producirla en grandes cantidades por métodos biológicos, incluyendo su obtención de forma biotecnológica en distintos organismos, tanto procariontes como eucariontes. Dentro de los organismos estudiados se encuentran bacterias, hongos y levaduras. Se ha encontrado una alta producción de este compuesto en organismos pertenecientes a distintos géneros, tales como: *Saccharomyces*, *Toluprosis*, *Pichia*, *Candida* y *Trichosporon* (Yonehara *et al.*, 1994).

Debido a que los hongos suelen crecer en medios complejos y en muchos casos requieren de nutrientes y vitaminas para crecer, estos medios de cultivo pueden llegar a tener un precio elevado si se les pretende considerar para la producción de dicho compuesto a nivel

industrial. Es por esta razón que se ha explorado también la capacidad de diversas bacterias en la producción de piruvato. Entre estas se encuentran bacterias como *Corynebacterium* (Yokota *et al.*, 1984), *Acinetobacter* (Izumi *et al.*, 1982), *Enterobacter aerogenes* (Yokota *et al.*, 1989), y *Escherichia coli* (Yokota *et al.*, 1994). Los organismos más estudiados en este tema son *Torulopsis glabrata* por su capacidad de acumular altas concentraciones de piruvato probablemente debido a su rápido metabolismo (Xu *et al.*, 2016) y *Escherichia coli* debido al gran conocimiento y facilidad de manipulación genética que se tiene del mismo.

Las vías metabólicas microbianas no son naturalmente óptimas para la generación de un químico deseado, ya que han evolucionado específicamente para el beneficio del organismo, para su reproducción y sobrevivencia. La ingeniería metabólica permite la alteración objetiva y racional del metabolismo e implica la redirección de actividades celulares para generar un nuevo producto o generar un producto conocido a una tasa o rendimiento mayor.

Para la producción de piruvato se han seguido principalmente tres estrategias: 1) La eliminación de vías que redirigen al piruvato a otros destinos metabólicos como lactato, acetato, formato, etc.; 2) Reducir el flujo de carbono y electrones en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y el sistema de transporte de electrones (se puede perder hasta un 50% de carbono en forma de CO<sub>2</sub> durante el crecimiento oxidativo); y 3) Mejorar el consumo de glucosa y/o alterar el crecimiento del organismo.

De igual forma, para aumentar y hacer eficiente la producción biotecnológica de piruvato se han utilizado los siguientes enfoques: 1) Fermentación directa con una fuente de carbono de bajo costo; 2) La utilización de enzimas solubles o inmovilizadas sin la necesidad de un organismo; y 3) Catalizadores celulares que alteran la energía de activación de las actividades enzimáticas, (Matsumoto *et al.* 2017). En otras palabras, hay más de un camino para producir piruvato de forma biotecnológica.

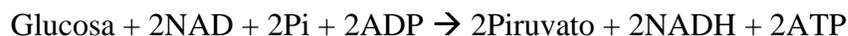
### 1.3 Metabolismo de *E. coli* en cepas productoras de piruvato

*E. coli* es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo. Fue aislada por vez primera en 1885 por un bacteriólogo alemán llamado Theodore Escherich de donde posteriormente tomaría su nombre. Esta bacteria es anaerobia facultativa, con flagelos peritricos, incapaz de formar esporas y capaz de fermentar glucosa, lactosa, arabinosa y xilosa entre otras fuentes de carbono. La utilización de *E. coli* como organismo para estudios de microbiología fue clave para el desarrollo de la biología molecular, biotecnología, ingeniería genética, etc. Esta bacteria presenta muchas ventajas contra otras bacterias: se encuentra bien caracterizada, su genoma ha sido secuenciado, tiene un corto tiempo de duplicación, es capaz de crecer en medios de cultivo poco costosos (como lo son los medios minerales suplementados con diferentes fuentes de carbono), y actualmente existen varias técnicas de manipulación genética para esta bacteria.

*E. coli* metaboliza la glucosa a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) hasta llegar a fosfoenolpiruvato (PEP), una molécula que puede ser redirigida a muchas otras vías. El PEP es metabolizado principalmente a piruvato u oxaloacetato. Para la síntesis de oxaloacetato, *E. coli* utiliza la enzima alostérica PEP carboxilasa (PepC) (Klingenberg, 1987). Aunque esencial para la supervivencia de esta bacteria y para el crecimiento y duplicación de esta, esta ruta también reduce el flujo de carbono a piruvato, lo cual es indeseable en cepas que se desea sirvan como productoras de este ácido orgánico. El piruvato puede ser formado a partir de PEP a través de la enzima llamada piruvato cinasa (Pyk).

La ecuación 1 que describe la reacción de la glucosa para formar piruvato es la siguiente:

**Ec 1:**



El rendimiento teórico del piruvato es de 0.966 g/g de glucosa, por lo que teóricamente muy poca materia se pierde durante el proceso de transformación de glucosa a piruvato, lo cual indica que se puede obtener un alto rendimiento de este ácido a partir de azúcares que son metabolizados vía la glucólisis. En dicha ecuación se observa que en la producción de piruvato no se acumulan otros productos orgánicos. Además, la ecuación 1 sugiere que la formación de piruvato se encuentra afectada por la tasa de formación de ADP y NAD.

#### **1.4 Condiciones de cultivo para la producción de piruvato**

En algunos hongos se ha observado que la formación de piruvato a partir de glucosa se relaciona con la presencia de tiamina (vitamina B1) (Li *et al.*, 2001). El exceso o una baja cantidad de esta vitamina afectan las condiciones óptimas de la enzima piruvato deshidrogenasa (Pdh) y por lo tanto la producción de piruvato. Esto se debe a que la tiamina modula la función de la enzima Pdh, ya que es cofactor de esta misma (Moskowitz *et al.*, 2018). De igual forma, la acumulación de piruvato puede observarse en hongos auxótrofos utilizados en la producción de ácido lipóico (otro cofactor de la Pdh) (Tomar *et al.*, 2003).

Debido a que una gran cantidad de piruvato se puede acumular si la enzima Pdh es eliminada, si su función se ve entorpecida o si su actividad es reducida, este puede significar un camino a explorar en bacterias para la producción de piruvato. Sin embargo, debido a la importancia de dicho complejo enzimático no es conveniente eliminar alguno de sus componentes, ya que se sabe que esto ocasiona que *E. coli* disminuya su capacidad de crecer y reproducirse en medios complejos específicamente en ausencia de acetato (Abdel-Hamid *et al.*, 2001).

Dicho efecto se podría ver aún más grave si se cultiva en medio mineral ya que la cepa no tiene nutrientes complejos que puedan compensar la pérdida de los genes mencionados anteriormente.

El metabolismo de la fuente de carbono posterior al PEP, oxaloacetato y el piruvato, depende también de ciertas condiciones ambientales. Por ejemplo, si el ambiente es aeróbico o anaeróbico. Bajo condiciones aerobias, el piruvato es destinado al ciclo del

ácido tricarbóxico (TCA) (Murarka, *et al.* 2010). En el curso de un ciclo, se llevan a cabo cuatro reacciones de oxidación-reducción para producir potencial reductor en la forma de tres moléculas de NADH y una molécula de FADH<sub>2</sub>. Un enlace de fosfato de alta energía es también formado como resultado de la fosforilación (Berrios-Rivera *et al.*, 2002). Bajo condiciones anaerobias, el piruvato se convierte en lactato por fermentación con la enzima lactato deshidrogenasa (Ldh) con el fin de regenerar NAD<sup>+</sup> (Mat-Jan *et al.* 1989).

El piruvato puede ser convertido en formato y acetil-CoA a través de la piruvato formiato liasa (Pfl) en una reacción anaeróbica. Niveles basales de Pfl se encuentran en la célula bajo condiciones aeróbicas, pero se encuentra inactiva, y al cambiar a condiciones anaeróbicas la activación de la Pfl es regulada por la enzima activadora de piruvato formiato-liasa (Pfl-AE), (Crain, & Broderick, 2013).

La descarboxilación del piruvato se logra mediante una secuencia de eventos catalizada por un grupo de tres enzimas que conforman el complejo piruvato deshidrogenasa (Pdh). Las tres enzimas son: piruvato descarboxilasa (E1), dihidrolipoil transacetilasa (E2), y dihidrolipoil deshidrogenasa (E3). Además, se requieren tres coenzimas: tiamina, tiaminpirofosfato (TPP), ácido lipóico, además de NAD<sup>+</sup>.

La enzima piruvato deshidrogenasa de *E. coli* tiene control alostérico. La expresión de los genes que codifican para las subunidades de Pdh son reguladas por oxígeno y no se transcriben en ausencia de oxígeno (Mat-Jan *et al.* 1989), asimismo la actividad del complejo es inhibida por desbalances en algunas de las siguientes relaciones: ATP/ADP, NADH/NAD<sup>+</sup> y acetil-CoA/CoA. Esto significa que la actividad del Pdh puede ser modulada dependiendo de los niveles de oxígeno presentes en el cultivo. La descarboxilación oxidativa del piruvato produce acetil CoA, que comúnmente reacciona con oxaloacetato para entrar en el ciclo del ácido tricarbóxico o en su defecto se dirige a uno de dos procesos que le permiten generar ATP y acetato a través de las enzimas fosfoacetilasa y acetato cinasa. Lo anterior significa que el metabolismo del piruvato requiere una gran cantidad de enzimas, muchas de las cuales se encuentran bien

caracterizadas por lo que la ingeniería de vías metabólicas es un camino viable para la producción de piruvato (Akita *et al.*, 2016).

El objetivo principal en este proyecto fue el desarrollo de un proceso de producción de piruvato a partir de glucosa y/o xilosa con alto rendimiento molar (aproximadamente 2 mol de piruvato/1 mol glucosa y 5 mol de piruvato/3 mol xilosa) usando una cepa recombinante de *E. coli*, la cual se nombró AV13.

En esta cepa se encuentra completamente bloqueada la capacidad para convertir el piruvato en acetil-CoA por la vía anaerobia. En contraste la vía para producir acetil-CoA de forma aerobia se encuentra intacta, sin embargo, se pretende modular la actividad del complejo Pdh causando desbalances en la relación de NAD/NADH<sup>+</sup> con el fin de prevenir la conversión de piruvato hacia acetil-CoA.

El metabolismo de *E. coli* ha sido modificado con el fin de estudiar la producción de piruvato. La **Tabla 1** muestra, algunas enzimas involucradas en el metabolismo de piruvato en *E. coli* que han sido modificadas por otros grupos.

**Tabla 1.** Lista de las enzimas involucradas en el metabolismo de piruvato en *E. coli*. Aquellas enzimas involucradas en la construcción de la cepa utilizada en el presente trabajo se encuentran marcadas con un punto rojo.

Enzimas asociadas con el metabolismo de piruvato en <i>E. coli</i>				
	Nombre Aceptado de la Enzima	Reacción catalizada		Gen <i>E. coli</i>
1	Piruvato cinasa	PEP+ADP	→ piruvato+ATP	<i>pykA, pykF</i>
2	PEP sintasa	piruvato+ATP+H <sub>2</sub> O	→ PEP+AMP+Pi	<i>ppsA</i>
3	PEP carboxilasa	PEP+HCO <sup>3-</sup>	→ oxalacetato+Pi	<i>ppc</i>
4	PEP carbocinasa	PEP+CO <sub>2</sub> +ADP	→ oxalacetato+ATP	<i>pck</i>
5	D-lactato deshidrogenasa	piruvato+NADH+H <sup>+</sup>	→ D-lactato+NAD <sup>-</sup>	<i>ldha</i> ●
6	piruvato oxidasa	piruvato+ubiquinona	→ acetato+CO <sub>2</sub> + ubiquinol	<i>poxB</i> ●
7	piruvato formato liasa	piruvato+CoA	→ acetilCoA+formato	<i>pflB</i> ●
8	piruvato deshidrogenasa (E1)			<i>aceE</i>
9	piruvato deshidrogenasa (E2)	piruvato+CoA+NAD <sup>-</sup>	→ acetilCoA+NADH+H <sup>+</sup> +CO <sub>2</sub>	<i>aceF</i>
10	piruvato deshidrogenasa (E3)			<i>lpd</i>
11	malato deshidrogenasa (NAD <sup>+</sup> )	L-malato+NAD <sup>-</sup>	→ piruvato+CO <sub>2</sub> +NADH	<i>maeA</i>
12	malato deshidrogenasa (NADP <sup>+</sup> )	L-malato+NADP <sup>-</sup>	→ piruvato+CO <sub>2</sub> +NADPH	<i>maeB</i>
13	fosfato acetiltransferasa	acetilCoA+Pi	→ acetil-P+CoA	<i>pta</i> ●
14	acetato cinasa	acetil-P+ADP	→ acetato+ATP	<i>ackA</i> ●
15	acetil coA sintetaza	acetato+ATP+CoA	→ acetilCoA+AMP+Ppi	<i>acs</i> ●
16	acetaldehido deshidrogenasa (acetilante)	acetil CoA+NADH+H <sup>+</sup>	→ acetaldehido+NAD <sup>-</sup> +CoA	<i>adhE</i> ●
17	alcohol deshidrogenasa (NAD)	acetaldehido+NADH+H <sup>+</sup>	→ etanol+NAD <sup>+</sup>	<i>adhE</i> ●
18	acetil coA carboxilasa	acetil CoA+HCO <sup>3-</sup> +ATP	→ malonil CoA+ ADP +Pi	<i>accABCD</i>
19	2-oxoglutarato deshidrogenasa (E1)			<i>sucA</i>
20	dihidrolipoamida succiniltransferasa (E2)	2-oxoglutarato+CoA+NAD <sup>-</sup>	→ succinil CoA+ NADH+ H <sup>+</sup> +CO <sub>2</sub>	<i>sucB</i>
21	dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3)			<i>lpd</i>
22	fumarato reductasa	fumarato+ quinona	→ succinato+ quinol	<i>frdABCD</i> ●
23	metilglixal sintasa	Glicerona fosfato	→ metilglixal +fosfato	<i>mgsA</i> ●

## 1.5 El potencial uso de residuos lignocelulósicos

Los residuos lignocelulósicos se componen principalmente de: celulosa, hemicelulosa y lignina, estos confieren una estructura definida y propiedades recalcitrantes y por su gran cantidad de carbono pueden utilizarse como medio para la producción de otros compuestos (Zaldivar & Ingram, 1999).

Los materiales lignocelulósicos incluyen madera, hierba, desechos provenientes de silvicultura y residuos agrícolas. Uno de los componentes principales de dichos residuos es la hemicelulosa que está formada de polisacáridos ramificados de pentosas mayoritariamente D-xilosa y una fracción menor de L-arabinosa. También contiene hexosas, D-manosa, D-glucosa y D-galactosa, además de otros compuestos como ácidos urónicos (Isikgor & Becer, 2015).

Dichos componentes, por su naturaleza estructural en plantas suelen ser altamente tolerantes a la hidrólisis por lo que degradar estos compuestos es una ardua, tarea tanto para microorganismos como en procesos fisicoquímicos. Con el fin de degradar la celulosa y la hemicelulosa que componen a los desechos lignocelulósicos se han propuesto una gran serie de procesos de hidrólisis enzimática, dichos procesos se realizan comúnmente utilizando mezclas de enzimas celulolíticas o cocteles enzimáticos de celulasas (Álvarez, *et al*, 2016).

La mezcla se compone principalmente de endo- $\beta$ -1,4-glucanglucanhidrolasas, exo- $\beta$ -1,4-glucancellobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas y hoy en día se pueden adquirir de forma comercial. Las celulasas descomponen la celulosa para formar celobiosa, que posteriormente se escinde a glucosa por acción de la  $\beta$ -glucosidasa, por lo que es importante que dichas mezclas presenten más de una enzima con actividad celulasa (Álvarez, *et al*, 2016).

Asimismo, la celulosa se hidroliza a glucosa a alta temperatura y presión por lo que la degradación enzimática se complementa con procesos termoquímicos (Wang *et al.*, 2011).

Para poder reutilizar estos materiales como medio de cultivo para bacterias es necesario modificar las condiciones físico químicas propias de estos materiales, como lo es la hidrólisis enzimática y/o un pretratamiento químico y térmico, con el fin de obtener jarabes con una cantidad elevada de azúcares fermentables (Kadam, Chin & Brown, 2008).

Es posible sintetizar biológicamente piruvato a partir de azúcares derivadas de residuos agroindustriales, ya que estos contienen un alto nivel de glucosa, el carbohidrato preferido por *E. coli*, pero también presentan otro carbohidrato, xilosa la cual muchos organismos metabolizan lentamente o bien, son incapaces de utilizarlo (Krahulec *et al.* 2010). Debido a esto es importante que el organismo a utilizar en los bioprocesos sea capaz de metabolizar ambos azúcares. *E. coli* es un candidato apto para este proceso ya que es capaz de consumir hexosas y pentosas, aunque no simultáneamente en condiciones normales, asimismo puede crecer eficientemente en presencia o ausencia de oxígeno, así como en medios de cultivo minerales con nutrientes mínimos.

## **1.6 Represión catabólica por carbono**

En el ambiente natural donde habitan las bacterias es difícil encontrar una sola fuente de carbono, probablemente por esta razón la mayoría de las bacterias poseen la capacidad de utilizar distintos sustratos como fuente de carbono, aunque generalmente lo hacen de una forma jerarquizada (Monod 1949). Debido a que la ruta de degradación de dichos compuestos no es igual ni tampoco la cantidad de energía obtenida de cada fuente de carbono, las bacterias suelen preferir de forma selectiva los sustratos que les proporcionan más energía cuando se presenta una mezcla de distintas fuentes de carbono. Un ejemplo de dicho consumo selectivo es el que se observa con *E. coli* en presencia de glucosa y lactosa.

La represión catabólica por carbono (CCR por sus siglas en inglés) se manifiesta como una curva diáuxica o bifásica de crecimiento, en la que se observa una fase de transición cuando se termina la glucosa y comienza a consumir lactosa. Dicho fenómeno fue observado por primera vez por Jacques Monod en 1942 y representa la preferencia de la bacteria por un carbohidrato, en este caso glucosa, en presencia de otro carbohidrato en el medio (Monod, 1942).

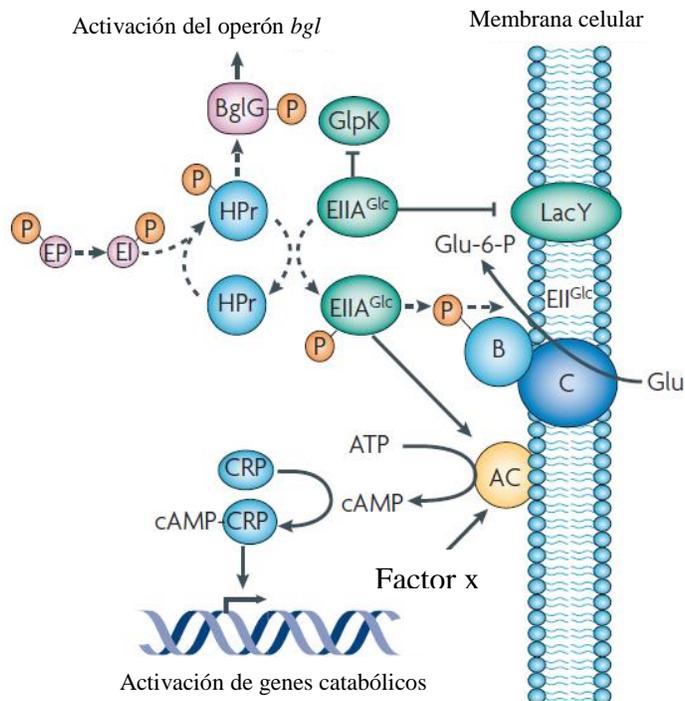
Experimentos posteriores indicaron que la represión catabólica de lactosa en presencia de glucosa no es la única que existe y que la glucosa es la fuente de carbono preferida por la mayoría de los organismos. Hoy en día se conoce a la represión catabólica como un fenómeno regulatorio, mediante el cual la expresión y actividad de enzimas correspondientes para la degradación de la fuente de carbono secundaria se reducen en presencia de la fuente de carbono preferida (Bruckner & Titgemeyer, 2002).

Biológicamente la represión catabólica es importante para la competencia en ambientes naturales, ya que la selección de la fuente de carbono preferida es uno de los principales factores determinante en la tasa de crecimiento y por lo tanto del éxito competitivo con otras especies de microorganismos (New *et al.* 2014). La represión catabólica se observa en la mayoría de las bacterias heterótrofas de vida libre, lo cual muestra indicios de la importancia que tiene para la supervivencia de las bacterias. En muchos organismos, la represión de genes catabólicos sucede por las actividades combinadas de mecanismos reguladores a nivel global y específico. En *E. coli* la represión catabólica involucra mecanismos globales y otros específicos para operones tales como la exclusión de inductores que consiste en la desfosforilación de la enzima IIAGlc que provoca la inhibición de la captación de varias fuentes de carbono no PTS (Hogema *et al.*, 1998). En *E. coli* los genes que permiten el uso de las fuentes secundarias de carbono no se expresan cuando la glucosa u otra fuente de carbono preferida se encuentra disponible.

Los principales actores en la vía global de la represión catabólica en *E. coli* son: el activador de la transcripción CRP, la proteína receptora del AMP cíclico (cAMP); también denominada proteína activadora de catabolito (CAP por sus siglas en inglés), el segundo mensajero AMPc, la adenilato ciclasa y el componente IIA del sistema PTS específico de

glucosa (EIIA<sub>Glc</sub>); también llamado componente de resistencia a la represión del catabolito (Crr) o EIIA<sub>Crr</sub> (Görke & Stülke, 2008).

La regulación de CCR (Carbon Catabolite Represion) está dada por la modulación del estado de fosforilación de EIIA<sub>Glc</sub>. En presencia de glucosa u otros sustratos de PTS, el fosfato del EIIA<sub>Glc</sub> es dirigido hacia los azúcares. La disponibilidad del donante de fosfato del PTS, el fosfoenolpiruvato (PEP), también es importante ya que, si la relación de concentración entre el PEP y piruvato es alta, el EIIA<sub>Glc</sub> es predominantemente fosforilado. Por el contrario, si hay altas cantidades de piruvato, pero bajas cantidades de PEP en la célula, entonces EIIA<sub>Glc</sub> está predominantemente desfosforilada (Görke & Stülke, 2008). Asimismo, el EIIA<sub>Glc</sub> se desfosforila cuando las células de *E. coli* crecen rápidamente con fuentes de carbono que pueden ser fácilmente metabolizado, como la glucosa (Bettenbrock *et al.*, 2007). El EIIA<sub>Glc</sub> fosforilado ejerce su función reguladora activando a la adenilato ciclasa asociada a membrana **Esquema 1**



**Esquema 1.** Esquema ilustrativo del sistema de represión por carbono en *E. coli* (Esquema tomado de Görke & Stülke, 2008. Modificado).

En el **Esquema 1** se muestra la CCR en *E. Coli*. El dominio EIIA de la EIIA<sub>Glc</sub> que es la unidad central de procesamiento en CCR en *E. coli*. Cuando se fosforila, EIIA<sub>Glc</sub> se une y activa la adenilato la ciclasa (AC), que conduce a la síntesis del AMP cíclico (cAMP). También se requiere un ‘factor x’ desconocido para la activación de la AC. Altas concentraciones de cAMP desencadenan la formación de complejos cAMP – CRP, que se unen y activan los promotores de los genes catabólicos. En su estado no fosforilado, la EIIA<sub>Glc</sub> no puede activar a la AC. En este caso el EIIA<sub>Glc</sub> se une e inactiva las enzimas metabólicas y transportadores de fuentes secundarias de carbono, tales como GlpK, LacY y otras proteínas (no mostradas). Este mecanismo es llamado exclusión inductora porque previene la formación intracelular del inductor de los respectivos sistemas catabólicos.

El estado de fosforilación de EIIA<sub>Glc</sub> es determinado en conjunto con la PTS (la presencia de cualquier azúcar PTS resulta en la desfosforilación de EIIA<sub>Glc</sub>) y la relación entre el fosfoenolpiruvato intracelular (PEP) y la del piruvato, que disminuye durante flujos altos a través de la glucólisis. La proteína de histidina (HPr) también contribuye a la CCR mediante la fosforilación de BglG, una proteína antiterminadora transcripcional que controla la expresión de los genes de utilización de  $\beta$ -glucósido. Por lo tanto, en presencia de azúcares PTS preferidos, el operón *bgl* es no expresado. Las flechas discontinuas en el **esquema 1** muestran la transferencia de fosfato. Glu-6-P, glucosa-6-fosfato. (Görke & Stülke, 2008)

Una vez que el cAMP ha sido sintetizado por la adenilato ciclasa cAMP se une a CRP, su molécula receptora, y el complejo cAMP-CPR activa los promotores de muchos genes catabólicos y operones. Estos promotores son generalmente débiles y deben ser activados para permitir la unión de la RNA polimerasa o la formación del complejo abierto de transcripción.

Los sistemas reguladores complejos que priorizan el metabolismo secuencial de *E. coli* en presencia de distintas fuentes de carbono pueden impedir la utilización rápida y completa de mezclas de azúcares durante la fermentación. El más conocido en *E. coli* es la represión catabólica en el que la glucosa impide la expresión de transportadores específicos de azúcar y enzimas involucradas en el metabolismo de otros azúcares. En otras bacterias, existen

distintos sistemas reguladores menos estudiados como el Cra (Hardiman *et al.* 2007) DgsA (Decker *et al.* 1998; Kimata *et al.* 1998) y CsrA (Babitzke and Romeo 2007) que no serán tratados en este estudio.

## 1.7 La vía del metilglioxal

El metilglioxal es un compuesto que surge como un subproducto de la glucólisis; este compuesto participa en un sistema de glicosilación no enzimática (ahora llamada glicación). El metilglioxal forma parte de un sistema regulatorio que dirige el flujo del carbono desde la dihidroxiacetona fosfato hasta el L-lactato. El metilglioxal es el producto de la primera reacción de dicha cascada y se ha postulado que funciona como un inhibidor general del metabolismo del azúcar cuando se presenta un desequilibrio metabólico (Totemeyer *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2001). El mecanismo de toxicidad del metilglioxal es poco conocido, sin embargo se sabe que presenta fuertes efectos citotóxicos dentro de los que se encuentran los productos finales de glicación avanzada (AGE por sus siglas en inglés) en proteínas que consiste en la modificación postraduccional permanente de los grupos amino por la acción de azúcares reductores. También participa en la glicación de nucleótidos que dañan fuertemente al DNA (Thornalley, 2008).

Se ha demostrado que la eliminación del gen *mgsA* (metilglioxal sintasa) aumenta el rendimiento de las cepas de *E. coli* diseñadas para la producción de ácido D-láctico a partir de glucosa (Grabar *et al.* 2006). También existe evidencia de que la metilglioxal sintasa aumenta el efecto de la represión catabólica por glucosa. En otros estudios, la eliminación del gen *mgsA* permitió el cometabolismo de la una mezcla de glucosa y xilosa en contraste con la cepa parental. Debido a dicho fenómeno la eliminación del gen presenta una alternativa interesante para permitir el consumo simultáneo de hexosas y pentosas reduciendo los efectos de la represión catabólica (Yomano, *et al.* 2009).

## 1.8 *E. coli* es capaz de utilizar piruvato como fuente de carbono

El piruvato no solo es un metabolito de gran importancia para la vida como intermediario en la producción de muchos metabolitos, también puede servir como única fuente de carbono para *E. coli* (Kodaki *et al.*, 1981). A pesar de que se han identificado transportadores específicos de piruvato en otras especies bacterianas, el transporte de piruvato no se comprende del todo bien en *E. coli*. Los sistemas de transporte de piruvato en *E. coli* fueron descritos por primera vez por (Kornberg & Smith, 1967) mediante el aislamiento de una cepa mutada en el gen de fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*) y que fue incapaz de crecer en piruvato como única fuente de carbono. La mutación correspondiente fue encontrada en el locus de un gen designado *usp* (captación específica de piruvato). Trabajos posteriores identificaron un transportador de piruvato en *E. coli* utilizando Tn-seq (high-throughput transposon sequencing) y un análogo tóxico de piruvato (3FP) con el fin de enriquecer mutantes carentes de dichos transportadores (Hwang *et al.*, 2018). Asimismo, se encontró que el sistema de transportadores de piruvato comprende dos componentes principales: CstA y YbdD, que son identificados como transportadores de péptidos relacionados con inanición de carbono en conjunto con el simportador inducible de piruvato BtsT, previamente descrito en *E. coli* (Kristoficova *et al.*, 2017). Hwang *et al.*, 2018 demostraron que CstA y YbdD forman parte del sistema constitutivo del transportador de piruvato en *E. coli*, que es consistente con el locus genómico tentativo sugerido previamente y la relación funcional con el sistema de detección de piruvato extracelular.

El sistema conformado por los productos de los genes *cstA*, *btsT* y *ybdD* se relaciona con el transporte de piruvato y proporciona información genética para comprender el complejo proceso del metabolismo del piruvato en *E. coli*. Una vez que el piruvato es internalizado al citosol de *E. coli*, este ácido orgánico es metabolizado a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos, de la gluconeogénesis y las demás vías centrales del metabolismo del carbono, de tal forma que esta bacteria puede crecer en medios minerales usando como única fuente de carbono al piruvato.

## 1.9 Antecedentes en el grupo de trabajo

En el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM, se ha modificado a *E. coli*, cepa MG1655, para favorecer el metabolismo hacia ciertos compuestos de interés comercial. Una estrategia que ha sido explorada últimamente es optar por una condición de limitación de oxígeno (Fernández-Sandoval, *et al.* 2016). En dicho proceso de limitación de transferencia de oxígeno se promueve un aumento en la tasa de crecimiento celular, la tasa de consumo de azúcar, balance redox, y producción de energía para el transporte de azúcar. Como ejemplo: en los experimentos de Fernández-Sandoval, *et al.* 2016 se evaluaron cepas productoras de etanol en condiciones aerobias, anaerobias y limitación de oxígeno.

Se encontró que la condición aerobia obtuvo la menor producción de etanol seguido de la condición anaerobia (0 vvm) y la mejor condición encontrada fue una condición de limitación de la transferencia de oxígeno. Lo anterior sugiere que los cultivos con limitación de transferencia de oxígeno representan una estrategia viable para fermentaciones en las que se pretenda aumentar ciertos parámetros como la productividad volumétrica. En dichas condiciones *E. coli* produce una mezcla de productos orgánicos como succinato, lactato, etanol, ácido acético, CO<sub>2</sub> e hidrógeno. Dado lo anterior, la cepa que se utilizó en este proyecto presenta suprimida la mayoría de las rutas metabólicas de fermentación ácido-mixta.

La cepa fue construida a partir de *E. coli* MS01 (Fernández Sandoval, 2012), derivada de *E. coli* MG1655 y *E. coli* JU15 (Utrilla *et al.* 2016). MS01 es una cepa afermentativa, la cual carece: (i) el gen que codifica para la piruvato formato liasa (*pflB*), que es la encargada de la síntesis de ácido fórmico a partir de acetyl-CoA; (ii) del gen *frdA* (fumarato reductasa) lo cual evita la formación de succinato; (iii) de lactato deshidrogenasa (*ldhA*), para evitar la producción de ácido láctico y (iv) de alcohol deshidrogenasa (*adhE*) para eliminar la generación de etanol.

Con el fin de mejorar el consumo de xilosa en *E. coli* se eliminó también el operón *xylFGH*, que es el principal sistema de transporte para xilosa que utiliza esta bacteria (Utrilla *et al.* 2016); sin embargo, el sistema requiere ATP lo que significa que al requerir energía se tendría un rendimiento menor.

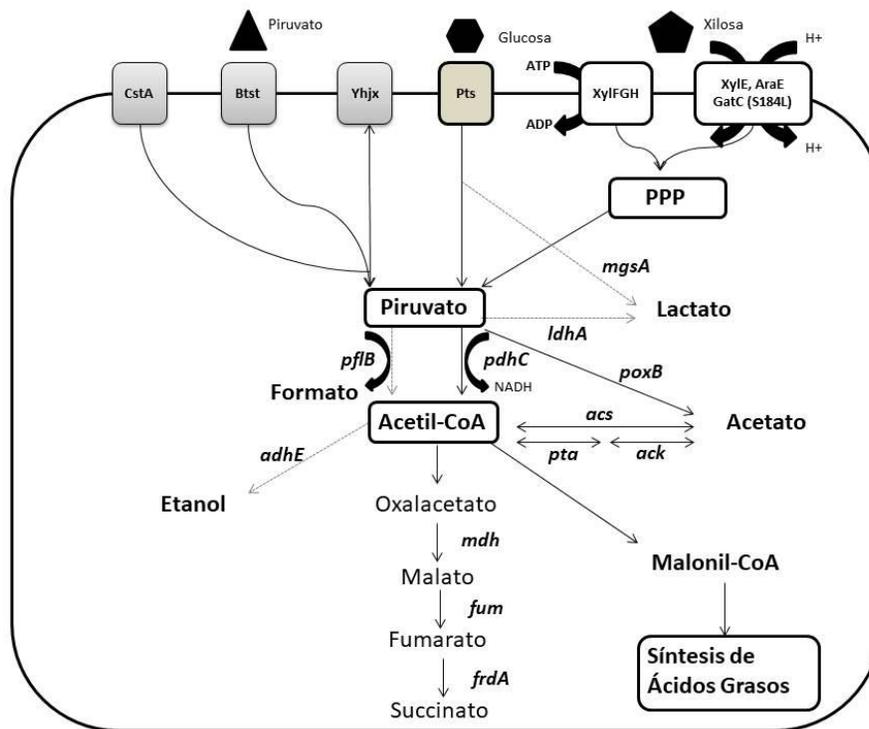
La eliminación del operón *xylFGH* y su posterior evolución adaptativa provocaron que la cepa utilice simportadores alternos de xilosa codificado por los genes (*araE* y *xylE*) lo cual incrementa el rendimiento de ATP a partir de xilosa en condiciones no aireadas (Hasona *et al.* 2004). Adicionalmente, la cepa fue sometida a evolución adaptativa en medio mineral con xilosa como única fuente de carbono y en la cepa resultante se identificó un cambio genético; el polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism por sus siglas en inglés) ocurrido en el gen *gatC*, reportado como transportador de galactitol, que sufrió un cambio en un aminoácido en la proteína original (S184L), lo cual reveló que GatC es un transportador promiscuo para otros azúcares como lo es la xilosa (Utrilla *et al.* 2016).

Finalmente, en el grupo de Investigación del Dr. Alfredo Martínez, la cepa MS01 fue modificada por la Dra. Vargas-Tah, eliminando los genes que codifican para el gen *poxB* (piruvato oxidasa), *mgsA* (metilglioxal sintasa) y los genes *ack-pta* (acetato cinasa, fosfotransacetilasa) para evitar la formación de acetato. Esta cepa fue designada como AV13 (colección del laboratorio). Resultados preliminares internos han mostrado que la cepa AV13 es capaz de producir ácido pirúvico a partir de glucosa y xilosa (Ronay Molina E; comunicación personal).

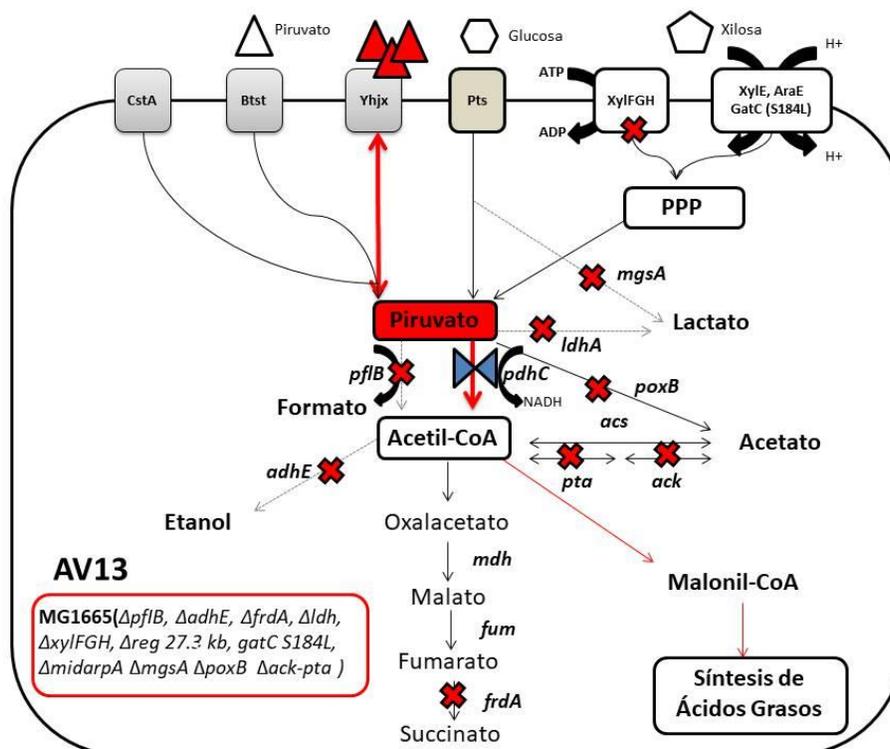
Se postula que el metabolismo de la cepa AV13 cambia bajo condiciones de limitación de oxígeno, ya que debido a las bajas concentraciones de oxígeno en el medio, las células se encuentran en un medio ambiente que representa una transición entre aeróbico y anaeróbico en la que el piruvato no puede ser metabolizado hacia otros productos, ya que no se recicla el poder reductor debido a la carencia de ciertos genes claves para la producción de otros metabolitos (Causey *et al.* 2004). En resumen, en condiciones de baja velocidad de transferencia de oxígeno, la cepa de *E. coli* AV13 no es capaz de regenerar poder reductor para generar productos de fermentación, como se haría en condiciones anaerobias. Tampoco se produce una gran cantidad de biomasa resultado de la redirección del piruvato

a acetil-CoA como lo haría una condición aerobia, por lo que la condición de limitación de transferencia de oxígeno representa una estrategia interesante para obtener niveles altos de piruvato. En la **Figura 1** se muestra un esquema ilustrativo de los genes interrumpidos en la cepa AV13.

**A**



**B**



**Figura 1.** A) Esquema de las vías metabólicas que participan directamente en el metabolismo de piruvato en *E. coli*. B). Esquema de las eliminaciones en el cromosoma de *E. coli* MG1655 para la producción de piruvato en la cepa AV13. Marcado con una equis roja se muestran las eliminaciones en cada uno de los genes. Con líneas continuas se esquematiza el metabolismo aerobio de piruvato a Acetil-CoA CO<sub>2</sub> y NADH, y en líneas punteadas el metabolismo anaerobio de piruvato a Acetil-CoA y formato. Se muestran también los transportadores de piruvato: CstA, YhjX y BtsT

Aunado a lo anterior, el uso de hidrolizados de rastrojo de maíz y otros compuestos lignocelulósicos han sido ensayados por el grupo del Dr. Alfredo Martínez en los últimos años. Como ejemplo: Al evaluar el rendimiento de la cepa homoláctica denominada AV03(JU15  $\Delta$ *poxB*,  $\Delta$ *ackA-pta*,  $\Delta$ *mgsA*) productora de D-lactato, en mezclas de azúcar con una composición similar a los hidrolizados (glucosa 42 g/L y xilosa 32 g/L) no se observó un aumento significativo en la masa celular (Vargas-Tah *et al.*, 2015) ya que se supone que el amoníaco presente en el fosfato contenido en los medios AM1 limita la cantidad de biomasa que se puede generar (Martínez *et al.*, 2006). Por dicha razón, es necesario incrementar la cantidad de sales del medio de cultivo base, ya que para cultivos aerobios se requiere de mayor masa celular que para cultivos anaerobios. En cultivos con los anteriores hidrolizados, la cepa AV03 fue capaz de consumir ambos azúcares simultáneamente, produciendo D-Lactato (D-LA) con altos rendimientos 0.95 g<sub>D-LA</sub> /g Azúcares. Estos resultados muestran que es posible usar mezclas de azúcares para producir D-LA, y en el caso de esta tesis se propone usar estas mezclas para producir piruvato, utilizando la cepa AV13.

En uno de los ejercicios más importantes en la producción de piruvato, usando una cepa modificada de *E. coli*, se obtuvo una concentración final de 90 g/L de piruvato en cultivo lote alimentado y un rendimiento de 0.68 g de piruvato /g de glucosa (Zhu *et al.*, 2008). La cepa utilizada en ese trabajo presentaba interrupciones realizadas por transducción de fago P1 de los genes *aceE-F*, *pfl*, *poxB*, *pps* y *ldhA*, los cuales codifican respectivamente para dos genes del operón PDH, y para la piruvato formato liasa, piruvato oxidasa, fosfoenolpiruvato sintasa y lactato deshidrogenasa. Una de las características esenciales en el genotipo de cepas productoras de piruvato es la eliminación del complejo *aceEF*, dos genes que forman parte del operón encargado de producir el complejo *pdh*, específicamente las subunidades E1 (piruvato deshidrogenasa) y E2 (dihidrolipoil transacetilasa). El gen *lpd* que codifica

para la subunidad E3 (dihidrolipoil deshidrogenasa) se mantuvo intacta ya que *E. coli* requiere producir precursores de biomasa derivados de acetil-CoA para crecer, así como regenerar el poder reductor de FADH<sub>2</sub> a FAD.

Como se mencionó anteriormente, el complejo E1, E2, E3 de la Pdh puede ser inhibido por desbalances en una o más de las tres siguientes proporciones: ATP/ADP, NADH/NAD<sup>+</sup> y acetil-CoA/CoA. La cepa AV13 no presenta modificación alguna en los genes que codifican para el complejo de la Pdh, ya que la expresión del complejo *pdh* es sensible a oxígeno.

En este trabajo se pretende modular la cantidad de oxígeno transferido en el medio de cultivo, para aumentar o disminuir la transcripción y actividad intracelular del complejo Pdh, con el fin de mantener la mayor concentración de piruvato, producir bajas cantidades de acetil-CoA, generar biomasa y modular la velocidad de producción de piruvato.

### **1.10 Construcción de la cepa AV13**

La respectiva construcción de la cepa utilizada en el presente trabajo fue realizada previa a este trabajo por la Dra. Alejandra Vargas-Tah quien partió de la cepa homoetanológica MS04 (MG1655,  $\Delta pflB$ ,  $\Delta adhE$ ,  $\Delta frdA$ ,  $\Delta xylFGH$ , *gatC* S184L,  $\Delta midarpA$ ,  $\Delta reg$  27.3 kb  $\Delta ldhA$ , *PpflB*: *pdcZm-adhBZm*, evolucionada) (Fernández-Sandoval *et al.* 2009). La cepa fue modificada genéticamente interrumpiendo los genes: *mgsA* que cataliza la formación de metilglicoxal a partir de dihidroxiacetona fosfato (una vía utilizada en la formación de ácido láctico), el gen *poxB*, piruvato deshidrogenasa, involucrado en la síntesis de acetato a partir de piruvato y ubiquinona, así como los genes *ack* (acetato cinasa) y *pta* (fosfato acetiltransferasa) involucrados en la síntesis de acetato dando origen a la cepa AV13 (MS04,  $\Delta poxB$ ,  $\Delta mgsA$ ,  $\Delta ackA-pta$ ). Los genes anteriormente mencionados fueron eliminados de la cepa MS04 empleando la metodología de recombinación homóloga descrita por Datsenko y Wanner (2000). La producción de ácido acético a partir de piruvato fue eliminada al inactivar el gen *poxB* del cromosoma empleando los oligonucleótidos *poxBDFw* (TCA GAT GAA CTA AAC TTG TTA CCG TTA TCA CAT TCA GGA GAT GGA GAA CCG TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG) y *poxBDRv* (TCA GAT GAA

CTA AAC TTG TTA CCG TTA TCA CAT TCA GGA GAT GGA GAA CCG TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG). Para la confirmación de la mutación se emplearon los oligonucleótidos: *poxBFw* (GTG AGC AGC ACA ATG ACG CTG A) y *poxBRv* (AGT GAC TGA GCA GAG CGA CCA G). Asimismo, la producción irreversible de ácido acético a partir de acetil coenzima A fue interrumpida mediante la eliminación de los genes *ackA* y *pta*. Para realizar estas mutaciones se emplearon los oligonucleótidos *ackADFw* (CTC TAT GGC TCC CTG ACG TTT TTT TAG CCA CGT ATC AAT TAT AGG TAC TTC C GT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G) y *ptaDRv* (GAT TAT TTC CGG TTC AGA TAT CCG CAG CGC AAA GCT GCG GAT GAT GAC GAG ACA TAT GAA TAT CCT CCT TAG TTC). La confirmación de la interrupción de los genes fue realizada con los oligonucleótidos *ack-FWf* (GCA GCC TGA AGG CCT AAG TAG) y *pta-RVf* (CGG GCA TTG CCC ATC TTC TTG). Finalmente, la eliminación de la producción de ácido L-láctico se realizó mediante la eliminación el gen *mgsA* con los oligonucleótidos *mgsADFw* (GCA GCG ATA AGT GCT TAC AGT AAT CTG TAG GAA AGT TAA CTA CGG ATG TAC ATT GTG TAG GCT GGA GCT GCT TCG) y *mgsADRv* (CGG TGG CGA GAA AAC CGT AAG AAA CAG GTG GCG TTT GCC ACC TGT GCA ATA CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TCC) y la confirmación de la inactivación de dicho gen se realizó con los oligonucleótidos *mgsAFw* (GGA TAT TCT CGC CAT TAC CTC) y *mgsARv* (AGC CTG GAA AAA GCG GCA ACA). Mediante éstas tres interrupciones se eliminaron todas las vías conocidas de producción de ácido acético y la producción de ácido L-láctico.

Las mutantes transformadas se seleccionaron debido a la resistencia a kanamicina. Las integraciones e inactivaciones fueron comprobadas por tamaño del producto amplificado por PCR. Los protocolos para la realización de PCR, digestión con enzimas de restricción, transformación de cepas por electroporación, visualización del ADN por electroforesis en geles de agarosa, se realizaron de acuerdo con los procedimientos estándar y a lo descrito en el manual de cada una de las enzimas o reactivos. El ADN cromosomal fue aislado y purificado con el kit “Ultra Clean Microbial DNA Isolation” (MO BIO laboratories, Inc, USA). Los productos de PCR utilizados para la modificación de dicha cepa se amplificó con la enzima de alta fidelidad Kapa HiFi (KAPA BIOSYSTEMS, Inc, USA).

Posterior a la amplificación los productos de PCR se purificaron a partir de banda de agarosa 0.8% utilizando el kit “GeneJet Gel Extraction” (Thermo Fisher Scientific, Inc, USA).

Se realizaron pruebas internas preliminares por Eliseo Ronay Molina para confirmar la producción de piruvato en la cepa AV13.

## **2. Justificación**

La presente investigación se enfocó en estudiar una cepa modificada de *E. coli* construida en el grupo de trabajo y la producción biológica de piruvato a partir de hidrolizados de rastrojo de maíz como materia prima y medios minerales simulados bajo limitación de transferencia de oxígeno en varias estrategias de cultivo con el fin de aumentar la concentración máxima de piruvato.

## **3. Hipótesis**

- Variaciones en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en cultivos lote permitirá modular la producción y productividad de ácido pirúvico a partir de glucosa en la cepa de *E. coli* AV13, debido a la condición de limitación de oxígeno. Como consecuencia se podrá maximizar la generación de ácido pirúvico. Además, el uso de cultivos continuos a ciertas tasas de dilución permitirá el consumo simultáneo de xilosa y glucosa, así como aumentar la productividad volumétrica y concentración máxima de piruvato.
- La estrategia de cultivo lote alimentado permitirá aumentar la concentración de ácido pirúvico en contraste con el cultivo lote y continuo debido a que se suministrará una mayor fuente de carbono y se concentrará el piruvato producido.
- El uso de un medio de cultivo proveniente del tratamiento de hidrolizados de rastrojo de maíz permitirá la producción de piruvato ya que la hidrólisis de rastrojo de maíz producirá un medio con altos valores de glucosa y xilosa que podrán servir como nutrientes a la cepa AV13.

## 4. Objetivo general

Evaluar la producción de ácido pirúvico a distintos niveles de transferencia de oxígeno con la cepa de *E. coli* AV13 en cultivos en lote, continuos, alimentados y utilizando hidrolizados termoquímicos de rastrojo de maíz.

## 5. Objetivos particulares

- Evaluar los parámetros cinéticos de la cepa AV13 a distintos  $k_{LA}$  en cultivos lote con glucosa con el fin de determinar un  $k_{LA}$  adecuado para la producción de piruvato. El parámetro obtenido será usado en todos los cultivos subsecuentes del presente trabajo.
- Evaluar los parámetros cinéticos como la concentración máxima y productividad volumétrica de piruvato a partir de glucosa, xilosa y una mezcla de ambos en cultivos lote.
- Caracterizar la cinética de la capa y evaluar la producción de piruvato en cultivos continuos con mezcla de glucosa y xilosa.
- Utilizar una estrategia de cultivo de tipo lote alimentado con el fin de incrementar la producción de piruvato a partir de glucosa con cepas recombinantes de *E. coli*.
- Probar la cepa utilizando jarabe de hidrolizados de rastrojo de maíz como medio de cultivo en cultivo lote.

## 6. Metodología

### 6.1 Microorganismos

Se utilizó una cepa diseñada para la producción de piruvato denominada AV13, proveniente del linaje MG1655 de *E. coli*; cuyo genotipo es:  $\Delta pfIB$ ,  $\Delta adhE$ ,  $\Delta frdA$ ,  $\Delta ldh$ ,  $\Delta xylFGH$ ,  $\Delta reg$  27.3 kb,  $gatC$  S184L,  $\Delta midarpA$   $\Delta mgsA$   $\Delta poxB$   $\Delta ack-pta$ , Km<sup>R</sup>. La cepa AV13 fue generada en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por la Dra. Alejandra Vargas-Tah bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

### 6.2 Medio de cultivo

El medio utilizado fue el medio mineral AM1 (Martínez *et al.* 2007) suplementado con ácido cítrico (100 mg/L al que se denominó AM2) y para aumentar la cantidad de biomasa se utilizó el triple de cantidad de fosfatos de amonio requeridos para el medio AM2. Este medio se nombró AM3x. El medio AM3x contiene, por litro: 7.89 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.61g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.246 g MgSO<sub>4.7</sub>H<sub>2</sub>O, 2 mM KCl, 0.1 g/L ácido cítrico, 1 mM de betaína y 1.5 ml de solución de elementos traza.

La solución de elementos traza contiene por litro: 1.6 g FeCl<sub>3</sub>, 0.2 g CoCl<sub>2.6</sub>H<sub>2</sub>O, 0.1 g CuCl<sub>2</sub>, 0.2 g ZnCl<sub>2.4</sub>H<sub>2</sub>O, 0.2 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.05 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y 0.33 g MnCl<sub>2.4</sub>H<sub>2</sub>O. Dependiendo del tipo de experimento realizado se adicionó como fuente de carbono: 72 g/L de glucosa, 72 g/L de xilosa o una mezcla de ambos, con 42 g/L de glucosa y 32 g/L de xilosa.

Las soluciones concentradas de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4.7</sub>H<sub>2</sub>O y KCl fueron esterilizadas por calor húmedo (121° C, 20 min). Los componentes restantes fueron preparados en soluciones concentradas y esterilizados por filtración (0.22 μm).

En todos los casos los azúcares se diluyeron al 80% en agua del volumen total final y se esterilizaron por calor húmedo (121 °C, 20 min) por separado, se mezclaron una vez fríos y previo a la inoculación con los componentes restantes del medio.

Componente	Concentración en solución patrón	Concentración inicial en el medio de cultivo
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> y NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60X	7.89 g/L 2.61 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 M	1 mM
KCl	2 M	2 mM
Betaína	1 M	1 mM
Ácido cítrico	50 g/L	0.1 g/L
Elementos traza		1.5 ml/L

### 6.3 Preparación del inóculo

Con el fin de obtener inóculos bajo las mismas condiciones y disminuir variaciones potenciales en los cultivos a lo largo de todo el estudio se generó un solo banco de células de la cepa AV13 de la siguiente forma: una asada de la cepa original fue obtenida del banco de cepas del Dr. Alfredo Martínez (Instituto de Biotecnología UNAM) y crecida en 2 cajas Petri con medio sólido con agar 15 g/L en medio LB (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl y 5 g/L extracto de levadura) con 30 µg/ml de kanamicina.

Las cajas fueron incubadas a 37 °C por 12 horas y se tomó una única colonia por tubo de ensayo estéril con 3 ml de medio LB + kanamicina 30 µg/ml y mezclados con ayuda de un “vortex”. Esta suspensión fue crecida por otras 12 horas (hasta llegar a fase estacionaria), 37 °C, 300 rpm, alcanzando una DO<sub>600nm</sub> de 3.5 y se tomó 1 ml de esta mezcla para inocular matraces con 150 ml de medio AM2 adicionado con 5 g/L glucosa y MOPS 100 mM, 37 °C, 300 rpm por 12 horas hasta llegar a una DO de 3.

El cultivo fue centrifugado a 5000 rpm y las células se resuspendieron en 40 ml de glicerol (para quedar a una concentración final de glicerol del 40%). Cincuenta muestras de 1 ml fueron transferidas a crioviales, congeladas en hielo seco por 5 minutos y almacenadas a -70 °C.

Para los fermentadores de 5 L (3 L de volumen de operación) se siguió el siguiente procedimiento: se tomó un glicerol del banco y se inoculó un matraz con 150 mL de medio AM3x con MOPS 100 mM. Se dejó crecer por 12 horas y finalmente se inoculó el reactor para iniciar a una DO de 0.2 (a 600nm).

#### **6.4 Condiciones de operación**

Los cultivos lote bajo limitación de transferencia de oxígeno se realizaron en fermentadores de 5 L con un volumen de operación inicial de 3 litros, equipados con una turbina tipo Rushton de 4 paletas planas. La temperatura fue controlada a 37 °C. El pH se mantuvo a 6.5 mediante la adición automática de KOH 6 N.

La espuma fue controlada mediante adición de antiespumante a base de silicón al 50%.

El oxígeno disuelto no fue controlado y la aireación se mantuvo siempre a 0.55 vvm, equivalentes a 100 l/h de flujo de aire (cultivos lote). La velocidad de agitación (400 a 840 rpm) fue distinta en cada caso y se hará notar.

Todos los experimentos fueron hechos por triplicado: en las figuras y tablas se muestra los valores promedio y la desviación estándar.

La frecuencia de muestreo fue similar en todos los cultivos, tomando muestras de 1 ml cada dos horas durante la fase de crecimiento exponencial (primeras 12 horas), una a las 24 horas y cada 6 horas posteriormente, con excepción de aquellas muestras que fueron tomadas cuando la fermentación se encontraba próxima a terminar la glucosa.

#### **6.5 Cultivos continuos**

Los cultivos continuos se realizaron en fermentadores de 1 litro (con un volumen de operación de 750 ml), equipados con dos turbinas tipo Rushton de 6 paletas planas. La temperatura fue controlada a 37 °C. El pH se mantuvo a 6.5 mediante adición automática de KOH 6 N. La espuma fue controlada mediante adición de antiespumante.

En el caso de los cultivos continuos, se comenzó a adicionar medio fresco a las 24 h. Las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes almacenados a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior.

El oxígeno disuelto no fue controlado y la aireación se mantuvo siempre una condición de 0.33 vvm (500 ml/min), asimismo se mantuvo una velocidad de agitación de 700 rpm, correspondiente a un  $k_{LA}$  de  $145\text{ h}^{-1}$ .

Se probaron distintas tasas de dilución (D): a partir de una D de  $0.56\text{ h}^{-1}$ , que corresponde con la velocidad máxima de crecimiento de la cepa AV13 en cultivo lote, y subsecuentemente se disminuyó a 0.4, 0.3, 0.2, 0.15, 0.1, 0.075 y finalmente 0.05. Con la finalidad de alcanzar un estado estable en cada tasa de dilución evaluada, se permitió transcurrir un total de tres tiempos de residencia y las muestras se tomaron durante el cuarto tiempo de residencia: específicamente al inicio del cuarto tiempo de residencia, a la mitad del cuarto tiempo de residencia y al final de este. A continuación, se presenta una tabla con las distintas tasas de dilución ensayadas, el flujo a que corresponde y el tiempo de residencia para cultivos continuos.

**Tabla 2:** Tasas de dilución, flujo correspondiente y tiempo de residencia para los distintos experimentos para cultivos continuos.

<b>Dilución (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>	<b>Flujo (mL/h)</b>	<b>Tiempo de residencia (horas)</b>
0.05	50	20
0.075	75	15
0.1	100	10
0.15	150	6.7
0.2	200	5
0.3	300	3.3

La velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y la evolución de dióxido de carbono (CER), fueron calculadas estableciendo un balance gaseoso sobre el fermentador y se calcularon tomando en cuenta la composición del aire (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> gaseoso) a la entrada y salida del fermentador.

La velocidad de transferencia de oxígeno se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

**Ec. 2**

$$OTR = \frac{Q_G}{V} \frac{16666.7}{V_m} [O_{2\ IN} - O_{2\ OUT}]$$

**Ecuación 2 utilizada para la determinación del OTR.**

Dónde:

OTR = velocidad de transferencia de oxígeno (mmol oxígeno/ (m<sup>3</sup> s))

Q<sub>G</sub>= flujo volumétrico de aire (l/min)

V=volumen de operación en el fermentador (1 litro)

V<sub>m</sub>= volumen molar (22.4 l/mol)

O<sub>2 IN</sub>= fracción de oxígeno presente a la entrada del fermentador

O<sub>2 OUT</sub>= fracción de oxígeno presente en el gas de salida del fermentador

16666.7= factor de conversión de mol/ (L min) a mmol/ (m<sup>3</sup> s)

En los cultivos realizados en esta tesis el bajo nivel de transferencia de oxígeno es consumido por las bacterias presentes en la fermentación, debido a lo anterior se manejó que **OTR=OUR**.

La evolución de dióxido de carbono se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

**Ec.3**

$$CER = \frac{Q_G}{V} \frac{16666.7}{V_m} [CO_{2\ OUT} - CO_{2\ IN}]$$

CER=Velocidad de evolución de dióxido de carbono (mmol CO<sub>2</sub>/ (m<sup>3</sup>/s))

CO<sub>2 IN</sub>=Fracción de CO<sub>2</sub> presente en el aire a la entrada del fermentador

$CO_{2\text{ OUT}}$ =Fracción de  $CO_2$  presente en gas a la entrada del fermentador

El coeficiente respiratorio RQ en moles de  $CO_2$  producido entre moles de  $O_2$  consumido, se calculó como la relación entre la CER y la OTR

## 6.6 Balance de Carbono

Para realizar el balance de carbono, en este caso se utilizó como unidad los gramos de carbonos presentes en cada muestra. Sabiendo que el porcentaje de carbono típico de una célula de *E. coli* es de 48%, es decir 0.48 g/g<sub>DCW</sub> (Bratbak & Dundas, 1984). Posteriormente los datos obtenidos de biomasa seca se multiplicaron por 0.48 con el fin de conocer la cantidad de carbono presente en cada muestra. Asimismo, la concentración máxima de piruvato obtenido se multiplicó por 0.4088 (relación de carbono en la molécula) y la de glucosa y xilosa se multiplicó por 0.4 (relación de carbono en ambas moléculas).

Finalmente, se corrigió la cantidad de carbono producida normalizando con la composición de  $CO_2$  ambiental y se integró la cantidad de carbono producido en forma de  $CO_2$  durante todo el proceso mediante integración por sumatoria de trapecios.

Para calcular la cantidad de carbono en un punto dado se sumaron los datos de carbono presente en peso seco, carbono presente en piruvato, carbono presente en sustrato y la cantidad producida de carbono en forma de  $CO_2$ .

El 100% utilizado como referencia se encuentra dado por los 74 g/L de glucosa y/o xilosa.

## 6.7 Cultivo lote alimentado

Los cultivos de tipo lote alimentado se realizaron en fermentadores de 5 L con un volumen de operación inicial de 3 L, equipados con una turbina tipo Rushton de 4 paletas planas. La temperatura fue controlada a 37 °C. El pH se mantuvo a 6.5 mediante adición automática de KOH 6 N. La espuma fue controlada mediante adición de antiespumante de emulsión de silicona grado industrial al 50%.

El oxígeno disuelto no fue controlado y la aireación se mantuvo siempre una condición de 0.55 vvm, 100 l/h ( $k_{La}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$ ). Se realizó una sola adición de 74 g/L de glucosa (en polvo), cuando el nivel de glucosa inicial se encontraba cerca de un 10% del valor inicial de 74 g/L. Esto sucedió a las 28 horas con el fin de que no se acabara la glucosa en el medio y no se consumiera el producto.

Adicionalmente se añadió una segunda carga de las siguientes sales 7.89 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.61 g  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.246 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.15g KCl, y la misma cantidad de elementos traza que se añadieron al principio con el fin de cubrir los requisitos nutricionales de la cepa AV13.

Finalmente se añadió 5 veces más de betaína (5 mM por litro) con fines osmoprotectores (Zhu *et al.*, 2008).

## **6.8 Determinación de la concentración celular**

Para medir la concentración celular, a través de las diferentes etapas de los cultivos, se utilizó la densidad óptica, la cual fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro Thermo Genesys 10s UV-Visible.

Posteriormente se hizo la conversión de esta  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  a peso seco de células (DCW), haciendo uso de una curva de calibración previamente desarrollada en el grupo de investigación, en la cual  $1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.37 \text{ gDCW/L}$  (Fernández-Sandoval, 2012).

## **6.9 Estudio de la velocidad de transferencia de oxígeno**

Se llevaron a cabo cultivos con la cepa AV13 en medio AM3x ensayando diferentes velocidades de agitación, 400, 660, 720, 780 y 810 rpm.

\*NOTA: La velocidad de aireación se mantuvo siempre constante 100 l/h en los 3 litros de trabajo (cultivos lote).

Se determinó el  $k_{LA}$  correspondiente a cada velocidad de agitación utilizada, y la velocidad de transferencia de oxígeno máxima correspondiente a la condición en la cual el oxígeno disuelto es cero.

## 6.10 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

Se realizaron ensayos de transferencia de oxígeno en los reactores con bajas velocidades de transferencia de oxígeno. La aireación se mantuvo siempre constante: 0.55 vvm que corresponde a 100 l/h. El volumen utilizado fue de 3 litros de trabajo (vaso de 5 L) con medio AM3x, 37 °C, pH 6.5 y sin células. El método utilizado fue el de eliminación de gas (*gassing out*) (Tribe, *et al*, 1995) y utilizando las distintas velocidades de agitación. En este método, el oxígeno se desplazó de la fase líquida con nitrógeno y posteriormente se suministró aire, se registró el cambio en la tensión de oxígeno disuelto (TOD) a lo largo del tiempo bajo las condiciones indicadas de rpm y con los datos obtenidos se estimó el  $k_{LA}$  mediante regresión lineal al integrar la ecuación 4: donde el  $C^*_{O_2}$  es la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con fase gaseosa y  $C_{O_2}$  es la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido, en función de las condiciones iniciales de tiempo y concentración de oxígeno disuelto.

**Ec. 4:**

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C^*_{O_2} - C_{O_2}) = OTR$$

**Ec. 5:**

$$\ln \frac{C^*_{O_2} - C_{O_2}}{C^*_{O_2} - C^0_{O_2}} = -k_L a (t - t_0)$$

## 6.11 Determinación de compuestos

Con el fin de determinar componentes de interés a lo largo de las fermentaciones se llevaron a cabo determinaciones por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), usando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 ml/min y la columna Aminex HPX-87H a 50 °C para separar azúcares y ácidos orgánicos.

Los compuestos de interés determinados con dicha columna comprenden: ácido pirúvico, glucosa, ácido fórmico, ácido láctico y ácido succínico.

Debido a que la xilosa y el piruvato presentan tiempos de retención similares en la columna HPX-87H se utilizó la columna para monosacáridos HPX-87P (300x7.8 mm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), solución de fase móvil: 5.0 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.5 ml/min) a 50°C, un detector con arreglo de fotoiodos a 210 nm (Modelo 996, Waters, Millipore Co) y un detector de índice de refracción (Modelo 2410, Waters, Millipore Co., Milford, MA, USA), con el fin de determinar de forma correcta ambos compuestos.

La preparación de las muestras para ser analizadas en el equipo de HPLC se hizo por medio de filtración con membranas con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , éstas muestras fueron diluidas en fase móvil

Para determinar el tiempo de los cultivos al cual se agotó la glucosa se utilizó un analizador bioquímico basado en un método enzimático, utilizando D-glucosa oxidasa inmovilizada (YSI Modelo 2700; Yellow Springs Instruments, Ohio USA).

Las muestras de interés fueron diluidas en caso de ser necesario con el fin de tener concentraciones menores a 10 g/L de glucosa.

## 6.12 Ensayo de Bial para determinación de pentosas

El reactivo de Bial contiene orcinol en ácido clorhídrico, el cual forma complejos de coloración en conjunto con las pentosas. Para este ensayo se disolvió 0.2 g de orcinol y 0.075 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 5 ml de agua fría, posteriormente se aforó a 50 ml con HCL 30%

(w/v). Se agregó 1.5 ml del reactivo de Bial a 500  $\mu$ l de la(s) muestra(s) problema (concentración máxima de 25 mg/l) en un tubo de ensayo con tapa, se incubó a 90 °C durante 20 minutos y se enfrió rápidamente en hielo.

Se dejó reposar las muestras durante 30 minutos fuera del hielo. Se preparó un blanco reemplazando la muestra por agua destilada. Finalmente se midió la absorbancia a 660 nm en el espectrofotómetro calibrado a cero con la muestra blanco. Para realizar la curva de calibración se realizó una curva patrón con concentraciones entre 0 y 25 mg/L de xilosa.

### **6.13 Hidrolizados**

Una carga del 15% p/p (en base seca) de rastrojo de maíz, con partículas de 1-2 cm, se trató con ácido sulfúrico al 1%, con un tiempo de mantenimiento de 30 minutos a una temperatura de 130 °C. La temperatura se aumentó en una rampa constante por 2 horas en un equipo presurizado con control de temperatura y calentamiento homogéneo. La suspensión se enfrió, a través de una chaqueta integrada al reactor, con agua y se dejó reposar por dos horas.

El líquido resultante se filtró en un juego de tamices con mallas mayores a 0.05 mm. El material fue presionado con el fin de extraer la mayor cantidad de líquido posible. Para detoxificar el hidrolizado se aumentó el pH con Ca (OH)<sub>2</sub> a pH 10 a lo largo de 2 horas y se mantuvo así por 12 horas a 50 °C. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 5,000 rpm para eliminar sólidos y se llevó a cabo una corrección a pH 6.5.

Finalmente se añadieron componentes del medio AM2 betaína (1 mM), citrato (0.1 g/L) y sales de fosfato (0.66 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.22 g/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ya que con cantidades superiores de estas dos últimas sales el medio presentaba precipitación abundante.

## 6.14 Parámetros celulares

La velocidad específica de crecimiento fue calculada con la ayuda del software GraphPad Prism 3.0 graficando el logaritmo de la biomasa ( $\ln g_{DWC}$ ) vs el tiempo (h). La velocidad específica de crecimiento se obtuvo durante la fase de crecimiento exponencial por medio de cálculo por regresión no lineal, utilizando la ecuación de crecimiento exponencial ( $X=X_0 \exp^{\mu t}$ ) por el método de mínimos cuadrados, lográndose en todos los casos analizados correlaciones mayores a 0.95

Debido a la cantidad de base añadida para neutralizar el ácido pirúvico producido fue necesario corregir por un factor de dilución. La concentración de biomasa, carbohidrato consumido y productos obtenidos. Al tiempo ( $t_x$ ) en que se tomó la muestra, se midió el volumen de base adicionado ( $V_b$ ) al cultivo y se suma al volumen inicial del cultivo ( $V_i$ ), con estos datos se calcula el factor de corrección de la siguiente forma: FD

$$FD = (V_i + V_b) / V_i$$

A partir del valor de obtenidos para cada tiempo, los datos fueron corregidos de la siguiente manera:

$$\text{Biomasa} = \text{Biomasa (g/L)} * FD$$

$$\text{Hidratos de carbono} = \text{Hidratos de carbono (g/L)} * FD$$

$$\text{Producto} = \text{Producto (g/L)} * FD$$

Los rendimientos  $Y_{X/S}$ ,  $Y_{P/S}$  y  $Y_{X/P}$ , fueron calculados de la siguiente forma:

$$X_{MAX} = \text{Biomasa producida durante la fase de crecimiento exponencial.}$$

$$Y_{X/S} = \text{g de biomasa generada/g de hidratos de carbono consumido}$$

$$Y_{P/S} = \text{g de producto (piruvato) generado/g de hidratos de carbono consumido}$$

$$Y_{P/X} = \text{g de producto (piruvato) generado/g de biomasa generada}$$

La velocidad específica de consumo de glucosa y/o xilosa ( $q_s$ ) y de producción de piruvato ( $q_p$ ) fueron calculadas para las dos fases de los cultivos: La exponencial y la estacionaria.

Para la fase exponencial se calculó de la siguiente manera:

$$q_s = \mu / (Y_{x/s})$$

$$q_p = Y_{p/s} * \mu$$

En el caso de la fase estacionaria, se llevó a cabo de la siguiente manera: se eligió el intervalo de tiempo a evaluar y se calculó la concentración de biomasa promedio ( $X_{prom}$ ) así como el consumo de hidratos de carbono o la producción de piruvato en dicho intervalo, con los datos obtenidos, se calculó de  $q_s$  y  $q_p$  de la siguiente manera:

$$q_s = \text{hidratos de carbono consumido} / (t(h) * X_{prom})$$

$$q_p = \text{piruvato producido} / (t(h) * X_{prom})$$

La productividad volumétrica se calculó de la siguiente manera:

$$Q_p = \text{g/L de piruvato producido} / \text{tiempo (h) al cual se agotó la(s) fuente(s) de carbono}$$

Los parámetros evaluados fueron: velocidad específica de crecimiento  $\mu$  ( $h^{-1}$ ), rendimiento producto/sustrato  $Y_{p/s}$  (g piruvato/g glucosa) o (g piruvato/g de xilosa), productividad volumétrica de piruvato  $Q_p$  (g piruvato/L.h). Dichos parámetros se calcularon de acuerdo a los datos obtenidos para las curvas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de piruvato. Estos datos fueron previamente corregidos por el factor de dilución, corrección necesaria ya que a medida que avanzaba la fermentación se añadía una cantidad considerable de base (KOH 6 N) para el control de pH y por ende se diluía el medio y sus componentes.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Es posible controlar la producción de piruvato bajo limitación de oxígeno

Se realizaron cultivos en fermentadores de 5 L con un volumen de operación de 3 L, a distintas velocidades de agitación (rpm), con el fin de encontrar un  $k_{La}$  en el que la cepa AV13 produzca piruvato a mayor velocidad volumétrica usando medio mineral suplementado con 74 g/L de glucosa. En la **Tabla 3** se presentan las equivalencias entre el  $k_{La}$ , las rpm y el OTR utilizado en los experimentos realizados y en la **Figura 2** se presentan las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de piruvato para cada caso.

**Tabla 3.-** Equivalencia entre rpm,  $k_{La}$  determinado por el método de “gassing out” y OTR en reactores de 3 L con aireación de 100 l/h (0.55 vvm), a 37 °C y medio AM3x.

Velocidad de agitación (rpm)	660	720	780	810
$k_{La}$ ( $h^{-1}$ )	96.31	126.7	146.69	190.21
OTR ( $mmol O_2/m^3 s$ )	3.94±0.19	4.39±0.06	7.95±0.09	10.07±0.05

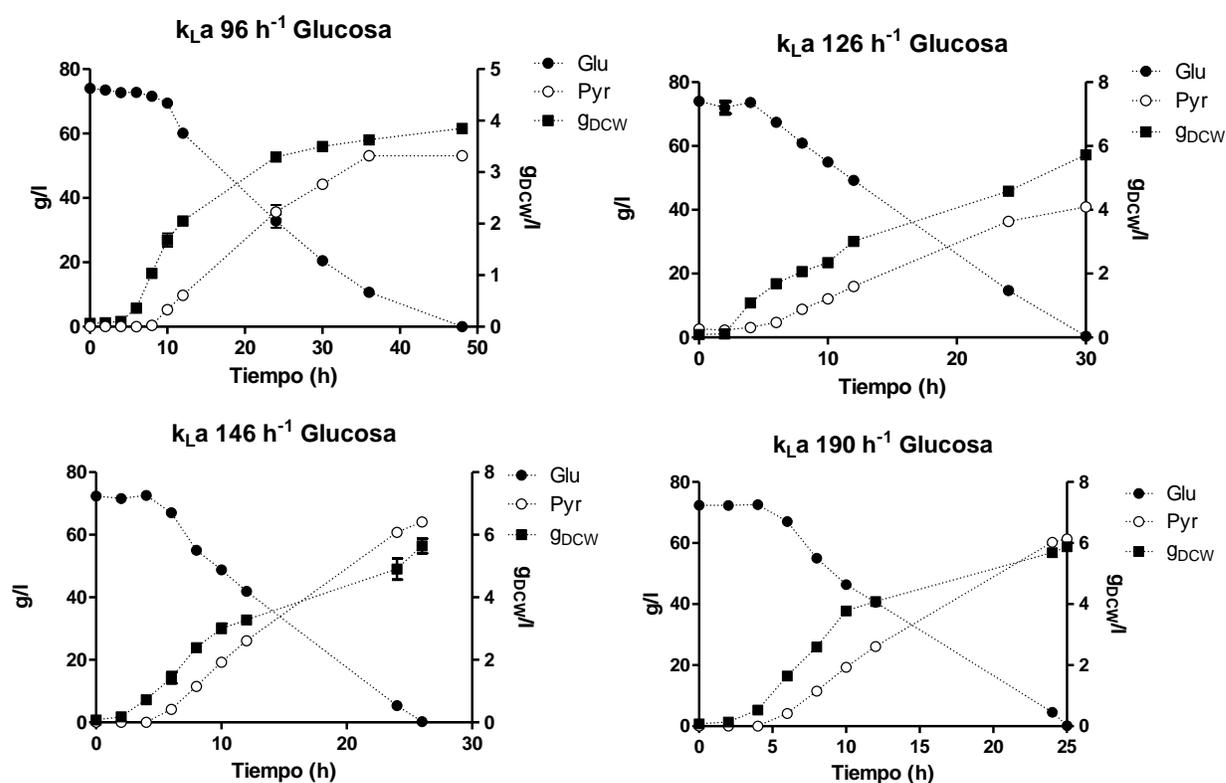
---

Nota: por cuestiones prácticas el  $k_{La}$  de 146.69  $h^{-1}$  se presentará como  $k_{La}$  correspondiente a 145  $h^{-1}$  en los siguientes resultados.

En los datos mostrados en la figura 2 se demuestra que la cepa AV13 es capaz de crecer a valores cercanos a 6  $g_{DCW}/L$  en cultivos con bajas velocidades de transferencia de oxígeno y también que la concentración máxima de piruvato se puede modular a medida que se varía el  $k_{La}$ .

La condición que resultó ser la más favorable para la producción de biomasa (6  $g_{DCW} /L$ ) fue a 810 rpm, correspondiente a un  $k_{La}$  de 190.21  $h^{-1}$ . Sin embargo, aunque a la condición de 810 rpm se obtuvo un tiempo de duplicación menor, es decir, que crecen más rápido las células y por lo tanto llegan a alta biomasa en menor tiempo, tanto los cultivos a un valor

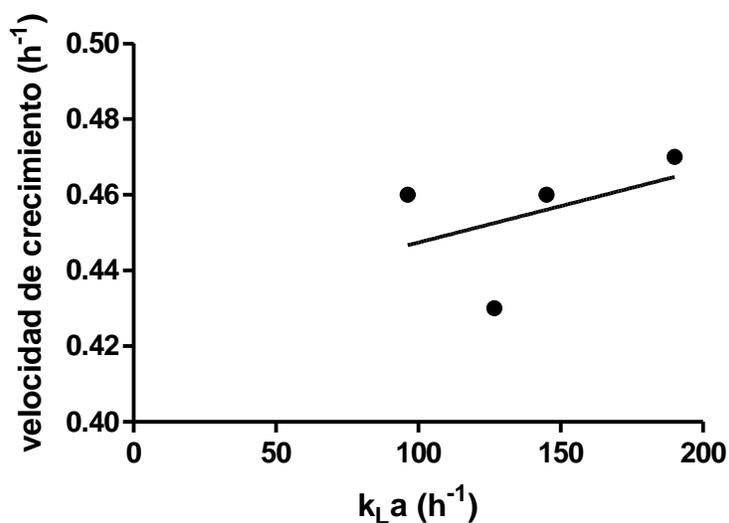
de  $k_{La}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  y de  $190.21 \text{ h}^{-1}$ , presentaron la misma velocidad volumétrica de producción de piruvato (ver adelante la Figura 7). En los experimentos desarrollados a un  $k_{La}$   $145 \text{ h}^{-1}$  se obtuvo la mayor concentración de piruvato (título). Las otras dos condiciones ( $k_{La}$   $96.31$  y  $126.70 \text{ h}^{-1}$ ) requieren más tiempo para llegar a altas densidades ópticas y por lo tanto requieren más tiempo para terminar la fuente de carbono.



**Figura 2.** Glucosa residual y producción de piruvato a distintos valores de  $k_{La}$ . En todos los casos se utilizó la cantidad de  $74 \text{ g/L}$  de glucosa. Glu (glucosa), Pyr (piruvato),  $g_{DCW}$  (biomasa en peso seco). Cada ensayo se realizó por duplicado excepto el correspondiente a  $k_{La}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  el cual se realizó por triplicado. Los valores graficados son el promedio de las réplicas y se presenta el error experimental.

En la **Figura 2** se observa una pequeña fase de producción lenta de piruvato, la cual coincide con la fase de adaptación y el inicio del crecimiento exponencial, que en este caso es de aproximadamente 6-8 horas dependiendo del valor de transferencia de oxígeno. En cada condición es evidente que el aumento de las revoluciones por minuto aumenta el  $k_{La}$  y por lo tanto afectan el tiempo al cual se consume la glucosa. Las duraciones totales de los experimentos fueron 660 rpm: 36 h, 720 rpm: 30 h, 780 rpm: 26 h y 810: 26 h.

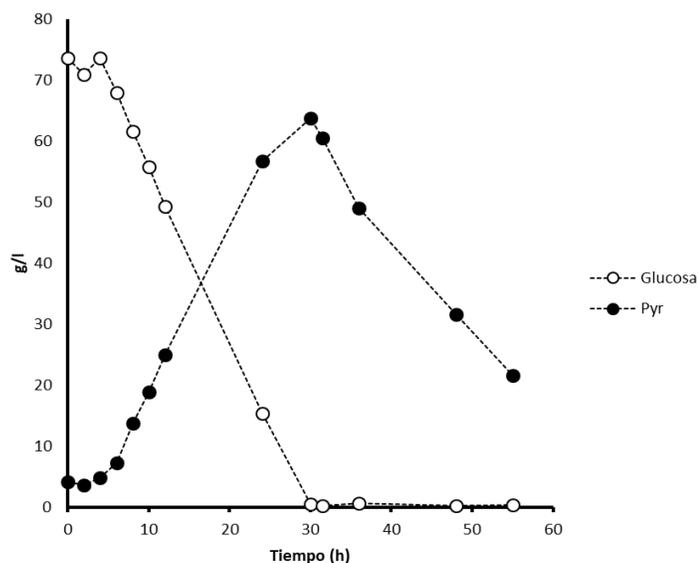
Esto se traduce en productividades mayores con tan solo el incremento de una revolución por segundo. Gracias a dichos experimentos se pudo observar que no existe una relación entre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y la velocidad de crecimiento (figura 3) de la bacteria y que la velocidad de crecimiento no se encuentra gravemente afectada por el cambio en el  $k_{La}$ .



**Figura 3.** Velocidad de crecimiento en función del  $k_{La}$ . Nota:  $r^2=0.096$ .

Es importante notar que los cultivos a 660, 720, 780 y 810 rpm no se detuvieron una vez que se agotó la fuente de carbono (glucosa), y se observó que la cepa consumió parte del ácido pirúvico producido lo cual permitió que la cepa continuara creciendo. Un ejemplo de este comportamiento se muestra en la **Figura 4**, donde se observa que la cepa AV13 es capaz de utilizar piruvato como fuente de carbono una vez que se agota la glucosa. Experimentos posteriores sugieren que la concentración de glucosa debajo de la cual la

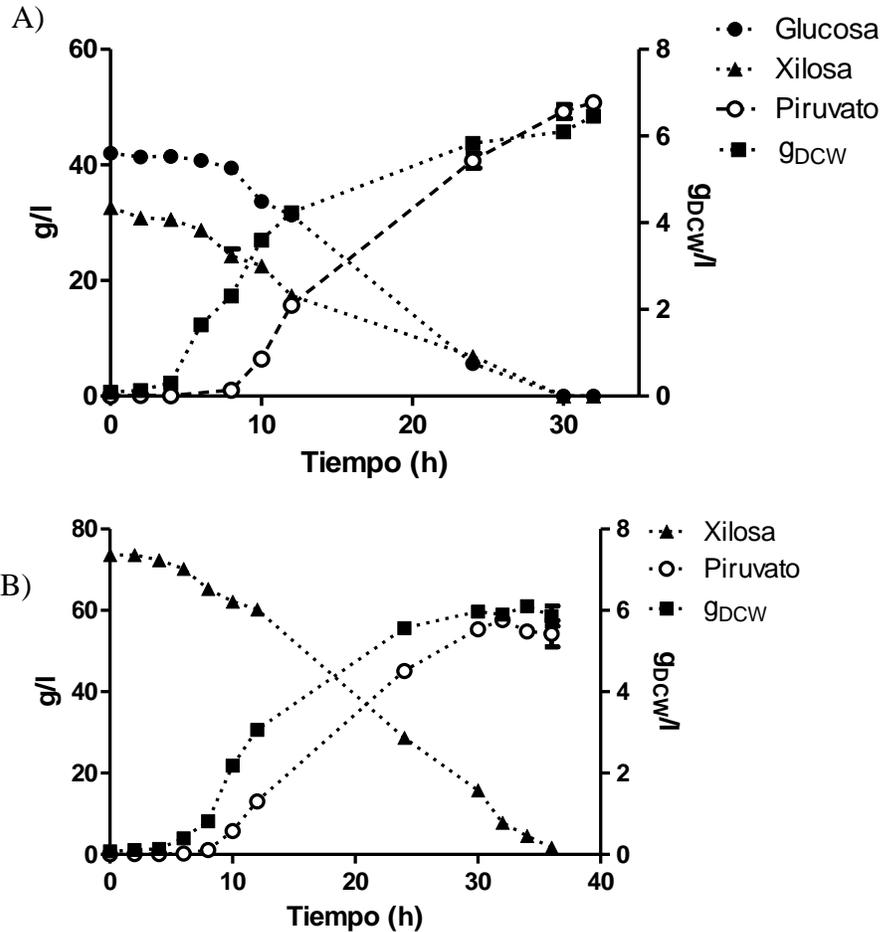
cepa AV13 consume piruvato se presentaba cerca de los 5 g/L (experimentos no mostrados).



**Figura 4.** Consumo de glucosa y producción y consumo de piruvato por la cepa AV13 en el experimento realizado a un  $k_{La}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$ . También se muestra la concentración de glucosa residual. Experimentó sin duplicados.

## 7.2 La cepa AV13 consume eficientemente glucosa, xilosa y la mezcla de ambos azúcares

Con el fin de evaluar el comportamiento de la cepa AV13 usando xilosa como fuente de carbono, se utilizó la condición de  $k_{La}$  correspondiente a  $145 \text{ h}^{-1}$  con  $72 \text{ g/L}$  xilosa como única fuente de carbono (experimento denominado 780 X; Figura 5A), así como una mezcla de los dos azúcares,  $42 \text{ g/L}$  glucosa y  $32 \text{ g/L}$  xilosa, (experimento 780 GX; **Figura 5B**). Estos experimentos permitieron evaluar el comportamiento de la cepa AV13 en ambas fuentes de carbono identificar las diferencias de los parámetros obtenidos en comparación con los cultivos lote con  $74 \text{ g/L}$  glucosa como única fuente de carbono (y para comparaciones con los experimentos realizados en cultivos continuos).



**Figura 5.** Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar y producción de piruvato con un  $k_{La}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  en medio mineral AM3x A) Se utilizaron 42 g/L de glucosa y 32 g/L de xilosa. B) 74 g/L de xilosa. Ensayos realizados por duplicado los valores graficados son el promedio de las réplicas con el error experimental asociado.

Los resultados obtenidos en ambos experimentos demuestran que la cepa AV13, es capaz de consumir tanto xilosa como la mezcla de ambos hidratos de carbono. En el caso de la mezcla de azúcares, se observa claramente que la glucosa y xilosa son consumidas de forma simultánea. Aunque ningún gen de los interrumpidos en el fondo genético de la cepa AV13 se encuentra directamente relacionado con el fenómeno de represión catabólica, no se descartó la posibilidad de que se haya perdido algún gen dentro de las 27.3 kb que fueron perdidas espontáneamente derivadas de cuando la cepa parental fue sometida a evolución

adaptativa con el fin de consumir xilosa por vías distintas a la que involucra el transportador xylFGH. Dentro de dicha región perdida se encuentran varios genes que se identificaron, pero ningún gen pudo ser relacionado directamente con el fenómeno de consumo simultáneo y que por ende tuviera influencia directa sobre dicho fenómeno de represión. Asimismo, los resultados obtenidos en otros grupos han demostrado que la eliminación del gen *mgsA* disminuye los efectos de la represión catabólica permitiendo el consumo simultáneo de xilosa y glucosa (Yomano, *et al.* 2009) lo cual parece tener más sentido.

**Tabla 4.** Resumen de parámetros cinéticos en cultivo lote. 4.1 Resumen de parámetros cinéticos de cultivos lote. Se muestran los valores correspondientes a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), velocidad específica de consumo de azúcar en la fase exponencial ( $q_{S_{exp}}$ ), la velocidad específica de producción de piruvato en la fase exponencial ( $q_{P_{exp}}$ ), la velocidad específica de consumo de azúcar en la fase estacionaria ( $q_{S_{est}}$ ), y la velocidad específica de producción de piruvato en la fase estacionaria ( $q_{P_{est}}$ ). En la tabla 4.2 se presentan los mismos datos a un valor constante de  $k_{La}$  ( $145 \text{ h}^{-1}$ ), para los cultivos correspondientes a glucosa (145G), xilosa (145X) y la mezcla de ambos azúcares (145 XG).

Tabla 4.1

$k_{La} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	96	126	145	190
$\mu_{max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.318	0.269	0.318	0.328
$q_S \text{ (exp)}$	7.835	5.406	5.482	4.417
$q_S \text{ (est)}$	0.747	0.533	0.660	0.639
$q_P \text{ (exp)}$	0.264	0.164	0.316	0.275
$q_P \text{ (est)}$	0.431	0.229	0.469	0.370

Tabla 4.2

$k_{La} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	145G	145 XG	145 X
$\mu_{max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.318	0.235	0.305
$q_S \text{ (exp)}$	5.482	4.996	4.089
$q_S \text{ (est)}$	0.660	0.469	0.490
$q_P \text{ (exp)}$	0.316	0.271	0.212
$q_P \text{ (est)}$	0.469	0.319	0.416

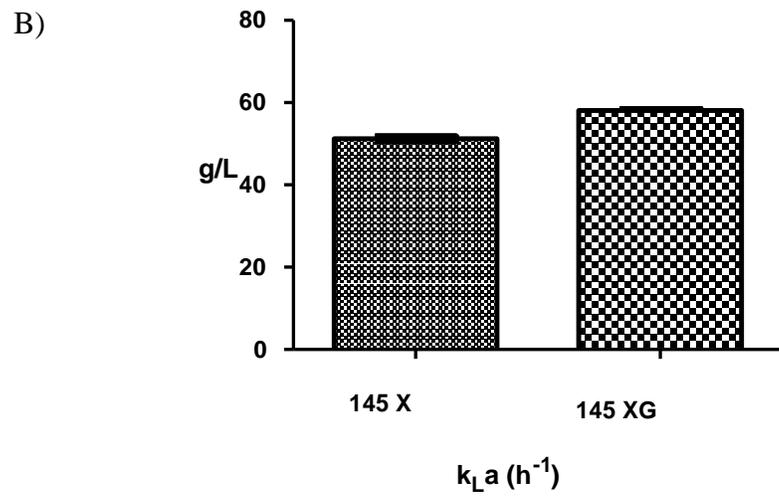
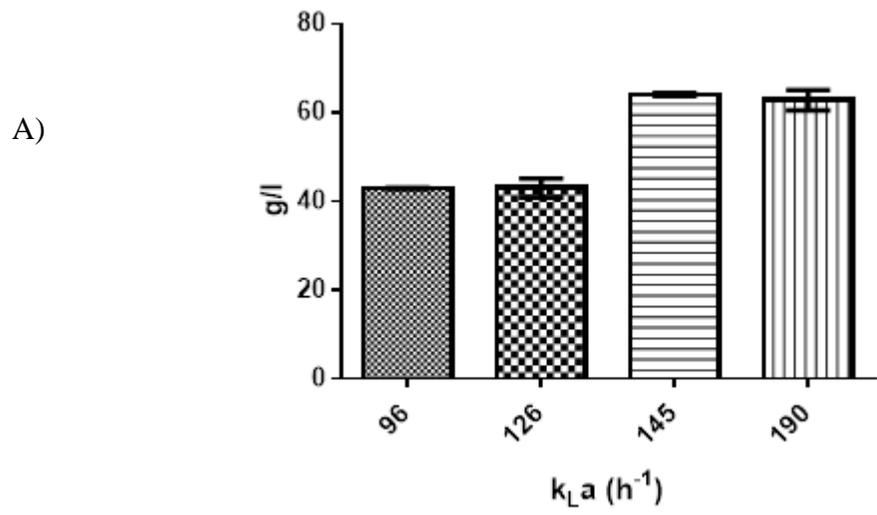
Los parámetros correspondientes a las velocidades específicas de consumo de sustrato o producción de piruvato tienen como unidades  $g_s/g_{DCW}\cdot h$  o  $g_p/g_{DCW}\cdot h$  respectivamente. G (glucosa 74 g/L), XG (xilosa 32 g/L, glucosa 74g/L) y X (xilosa 74 g/L).

La cepa AV13 presenta distintas velocidades de consumo de glucosa o xilosa (Tabla 4.1 y Tabla 4.2). Al comparar los resultados de la figura 2 y figura 5 se observa que en presencia de glucosa como única fuente de carbono la cepa presenta una velocidad de consumo de sustrato en fase exponencial de cerca de  $5.5 g_s/g_{DCW}\cdot h$  en la condición de  $k_{La}$   $145 h^{-1}$ , en presencia de xilosa, como única fuente de carbono, dicha velocidad disminuye a  $4.1 g_s/g_{DCW}\cdot h$  y en presencia de ambos hidratos de carbono, la velocidad conjunta se situó en  $5.0 g_s/g_{DCW}\cdot h$ .

Al observar los datos correspondientes a la velocidad de consumo en fase estacionaria se obtuvo un comportamiento similar:  $0.66 g_s/g_{DCW}\cdot h$  para la condición con solo glucosa,  $0.49 g_s/g_{DCW}\cdot h$  para aquella con xilosa como única fuente de carbono y  $0.47 g_s/g_{DCW}\cdot h$  para aquella con ambos hidratos de carbono.

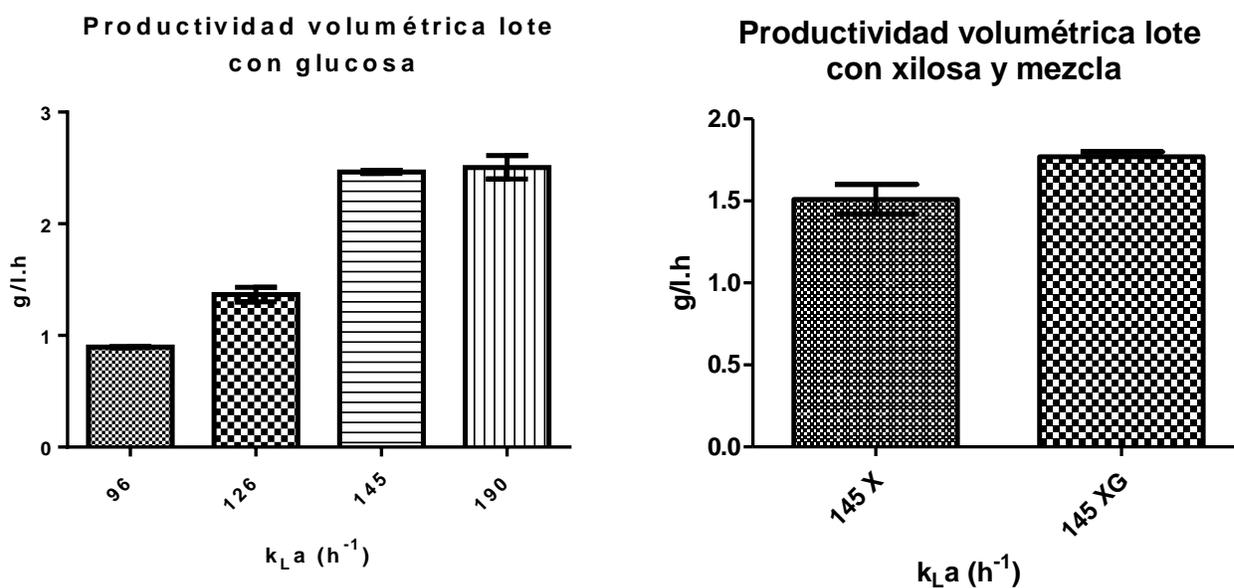
Esto significa que la cepa AV13 consume preferentemente glucosa, la cual es capaz de metabolizar a una mayor velocidad que la xilosa, pero es capaz de consumir ambos hidratos de carbono simultáneamente. Esto se puede ver reflejado en las distintas velocidades específicas de crecimiento: en la condición que tuvo solamente glucosa, la  $\mu$  registrada fue de  $0.32 h^{-1}$ , cuando se utilizó solamente xilosa fue de  $0.30 h^{-1}$  y al utilizar ambas fuentes de carbono la velocidad específica de crecimiento se situó en un dato intermedio de  $0.23 h^{-1}$ .

Por otro lado, la concentración máxima de piruvato obtenida en los cultivos lote con glucosa, xilosa y mezcla de ambos azúcares se muestra en la figura 6. En dichos resultados se observa que el sustrato utilizado no afecta gravemente la concentración máxima de producto, ya que los valores se mantienen entre los 50 y los 60 g/L bajo un  $k_{La}$  de  $145 h^{-1}$  en cada caso.



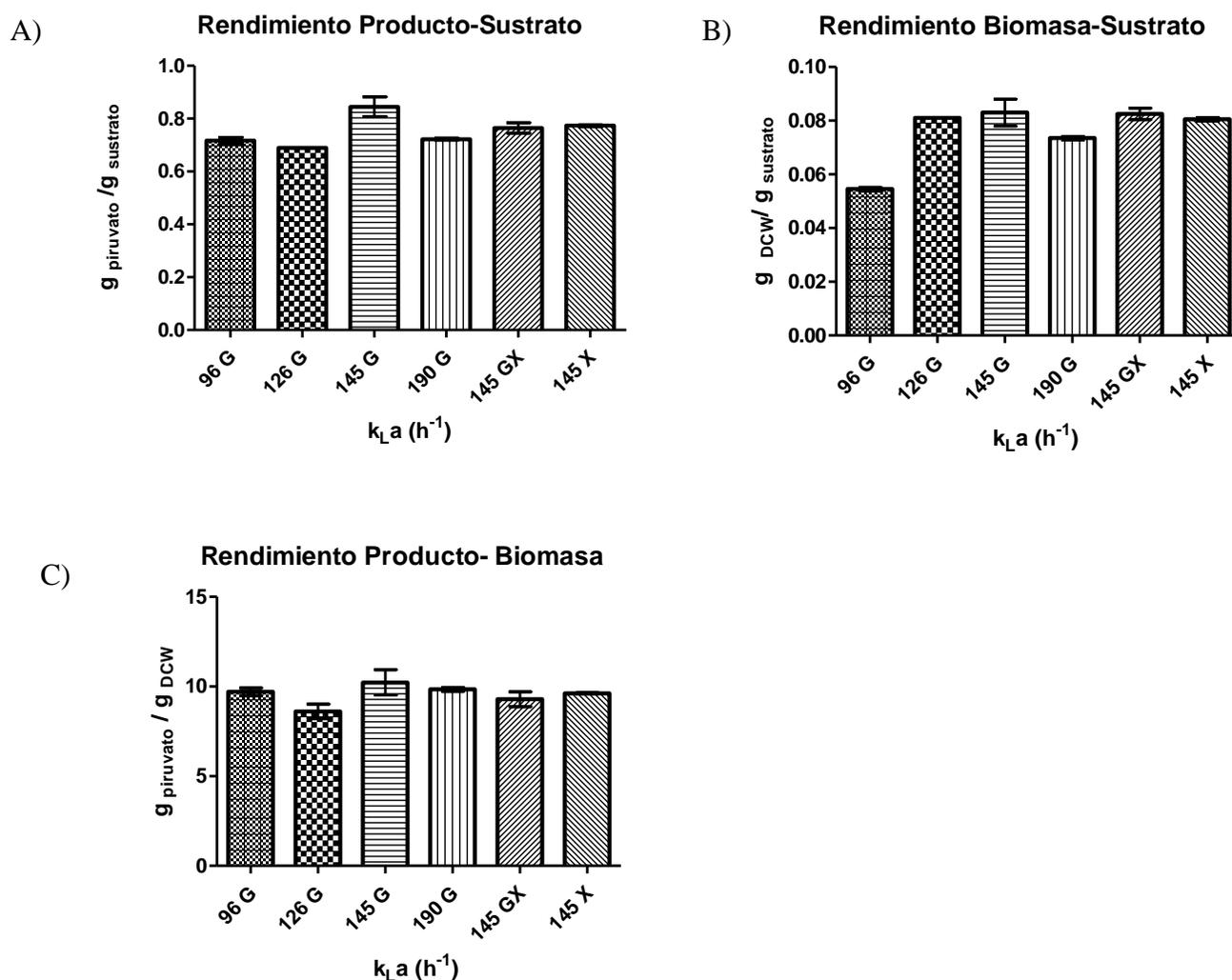
**Figura 6.** Concentraciones máximas de producto en cultivos lote. 6A. Concentración máxima de piruvato obtenida para cada condición de  $k_L a$  ensayada en cultivos lote con glucosa. Figura 6B Concentración máxima correspondiente a los cultivos con xilosa (X) y mezcla de glucosa y xilosa (XG) a un valor de  $k_L a$  de  $145 h^{-1}$ . La concentración máxima obtenida corresponde al tiempo al cual se agotó la fuente de carbono. Los valores graficados son el promedio de las réplicas con su respectiva desviación estándar.

Como se postuló en la introducción, la productividad volumétrica se ve afectada por el  $k_{La}$  en medios con glucosa (**Figura 7**), obteniéndose la mayor velocidad con los valores de  $k_{La}$  de 145 y 190  $h^{-1}$ . Sin embargo, en el caso de los cultivos con xilosa y mezcla de ambos azúcares, la productividad volumétrica disminuye: en la condición con glucosa y xilosa se observa una reducción de ~4% y en la condición con solo xilosa una de ~16% en comparación con la fermentación con glucosa en un  $k_{La}$  de 145  $h^{-1}$ .



**Figura 7.** Productividades volumétricas de cultivos lote. 7A. Productividad volumétrica para cada condición de  $k_{La}$  ensayada en fermentaciones con glucosa. Los datos se obtuvieron al tiempo que se agotó la fuente de carbono. 7B. Productividad correspondiente a los cultivos con xilosa (X) y mezcla de ambos (XG). Los valores graficados son el promedio de las réplicas con su respectiva desviación estándar y los datos se obtuvieron al tiempo que se agotó la fuente de carbono.

En la **Figura 8** se presenta el rendimiento producto sustrato, tanto de los cultivos con glucosa como de aquellos con xilosa y mezcla de ambos hidratos de carbono, donde se observa que el mayor valor de este parámetro se obtuvo con el  $k_{La}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  usando glucosa como fuente de carbono.



**Figura 8.** Rendimientos en cultivo lote. A) Rendimiento producto-sustrato en cultivo lote B) Rendimiento biomasa- sustrato en cultivo lote C) Rendimiento producto biomasa en cultivo lote. Se denota con una G las cinéticas que fueron realizadas con  $74 \text{ g/L}$  de glucosa, con X la cinética que presenta  $74 \text{ g/L}$  de xilosa y con una GX aquella que contiene  $42 \text{ g/L}$  de glucosa y  $32 \text{ g/L}$  de xilosa. Todos los cultivos se realizaron en medio mineral AM3x por triplicado, los valores graficados son el promedio de las réplicas con su respectivo error experimental.

Los datos obtenidos muestran que la mejor condición encontrada, hasta el momento, es la correspondiente a un  $k_{LA}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$ . Condición en la cual se obtuvo la mayor producción de piruvato  $62 \text{ g/L}$ . El mayor rendimiento de conversión de glucosa en piruvato;  $87.43\% \pm 3.16$  respecto al teórico, mayor rendimiento producto sustrato ( $0.84 \pm 0.03 \text{ g/g}$ ), mayor velocidad específica de consumo de sustrato en la fase exponencial ( $5.4 \text{ g}_S/\text{g}_{DWC} \cdot \text{h}$ ), mayor velocidad específica de consumo de sustrato en la fase estacionaria ( $0.66 \text{ g}_{\text{glucosa}}/\text{g}_{DWC} \cdot \text{h}$ ), y mayor  $Q_s$  (producción volumétrica) ( $2.6 \text{ g (piruvato)}/\text{L} \cdot \text{h}$ ). Dicha condición fue utilizada para llevar a cabo los experimentos de cultivo continuo.

En cuanto a las productividades volumétricas se notan datos diferentes: con glucosa  $2.40 \pm 0.09$ , con mezcla de glucosa y xilosa  $1.77 \pm 0.03$  y con xilosa  $1.59 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{L} \cdot \text{h}$ , respectivamente. Tanto los valores de concentración máxima, como los de productividad volumétrica de piruvato son los más altos reportados hasta el momento en cultivo lote utilizando cepas recombinantes de *E. coli*.

Asimismo, la cepa AV13 es capaz de consumir glucosa y xilosa para la producción de piruvato sin presentar represión catabólica, algo que no había sido reportado por otros grupos para cepas de *E. coli* modificadas para producir piruvato.

Cabe resaltar que con la cepa AV13 se obtuvo un mayor rendimiento piruvato/glucosa ( $87.43\%$ ), mayor concentración de piruvato:  $64 \text{ g/L}$  y mayor productividad volumétrica:  $2.5 \text{ g/L} \cdot \text{h}$  que las dos mejores cepas recombinantes de *E. coli* reportadas hasta el momento: *E. coli* TC44 W(3110): (Succ+),  $\Delta\text{focA-pflB}::\text{FRT}$ ,  $\Delta\text{frdBC}$   $\Delta\text{ldhA}$   $\Delta\text{atp(FH)}::\text{FRT}$   $\Delta\text{adhE}::\text{FRT}$   $\Delta\text{sucA}::\text{FRT}$   $\Delta\text{poxB}::\text{FRT}$   $\Delta\text{ackA}::\text{FRT}$  con rendimiento de  $79\%$ , concentración máxima de  $52 \text{ g/L}$  y productividad de  $1.21 \text{ g/L} \cdot \text{h}$  reportada por Causey *et al.* (2004); y *E. coli* ALS(1059) YYC202  $\text{ldhA}::\text{Kan}$   $\text{arcA726}::\text{FRT}$   $\text{atpFH}::\text{Cam}$  desarrollada por Zhu *et al.* (2008) con concentraciones de piruvato correspondientes a  $90 \text{ g/L}$ , rendimiento de  $68\%$  y productividad volumétrica de  $2.1 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ , ambas cepas probadas en cultivos lote alimentados.

### **7.3 La implementación de un cultivo alimentado permite incrementar la producción de piruvato.**

El conocimiento generado a partir de los experimentos realizados en cultivo lote permitió conocer el umbral de glucosa debajo del cual la cepa AV13 consume piruvato, por lo que se pudo diseñar un experimento de tipo lote alimentado para tener la mayor cantidad de producto sin que la cepa lo consumiera.

El cultivo lote alimentado es un tipo de operación semi lote, en la que los nutrientes y el medio de cultivo son alimentados intermitente o continuamente, durante el transcurso de una operación por lote, pero no de salida, por lo que el volumen en el biorreactor incrementa con cada pulso que se suministra. Este proceso puede ser repetido varias veces en un mismo biorreactor.

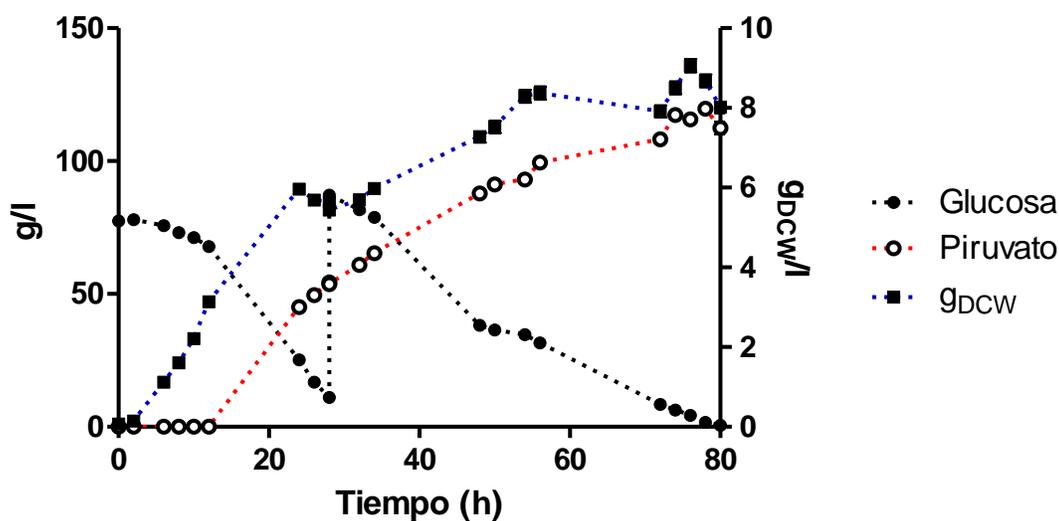
Por su naturaleza, el cultivo en lote alimentado es una operación dinámica, y las velocidades de alimentación y las concentraciones de los nutrientes limitantes pueden ser moduladas tanto para mantener concentraciones siempre constantes de los nutrientes, como para lograr cultivos con concentraciones específicas de nutrientes con el fin de lograr concentraciones más elevadas que las obtenidas en cultivos lote, lo que hace de este modo de operación una alternativa para producción de metabolitos de interés industrial y en este caso para obtener la mayor cantidad de piruvato posible.

Una desventaja de los procesos de lotes alimentados es que numerosas sustancias se acumulan, no solo el producto deseado, el cual a elevadas concentraciones es tóxico para el microorganismo que lo produce.

Ya que la acumulación de ácido pirúvico en este estudio constante requiere la acumulación de potasio (u otro contraión) para mantener el pH a niveles deseados, lo cual produce irremediamente un estrés osmótico elevado. Por esta razón se llevó a cabo un experimento para determinar si la adición de mayores concentraciones de betaína como osmoprotector permitiría la acumulación de piruvato. En contraste con los cultivos lote, el

aumento a 5 mM de betaína permitió que las células continuaran creciendo aún en concentraciones altas de hidratos de carbono y piruvato.

Asimismo, se realizaron experimentos preliminares para determinar la cantidad y frecuencia de las alimentaciones al sistema (datos no mostrados). Finalmente se optó por realizar una alimentación adicional correspondiente a 74 g/L de glucosa en polvo. Esto correspondió a 148 g/L de glucosa finales. En la **Figura 9** se presentan los resultados obtenidos.



**Figura 9.** Fermentación realizada en cultivo lote alimentado. Una sola adición de hidratos de carbono en medio mineral AM3x con un pulso de glucosa y nutrientes. Ensayo realizado por triplicado. Los valores graficados son el promedio de las réplicas con su respectivo error experimental.

La concentración máxima de piruvato obtenida fue de  $119.6 \pm 0.8$  g/L partiendo de una glucosa inicial de 74 g/L y de glucosa añadida en el único pulso de 74 g/L por lo que en total se suministraron 148 g/L de glucosa. Dado lo anterior se obtuvo un rendimiento del 80 % del teórico, un valor muy parecido al obtenido en los ensayos con  $k_{LA}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  (84%).

Uno de los fenómenos observados fue que el consumo de los primeros 74 g/L de glucosa fue de cerca de 26 horas, parámetro observado anteriormente, sin embargo, el consumo de la glucosa suministrada en el segundo pulso fue mucho más lenta,  $1.7 \text{ g/L h}$ , ya que tardó más de 52 horas. Estos resultados sugieren que el piruvato acumulado reduce la velocidad

de crecimiento, probablemente por un fenómeno de inhibición por producto, afectándose la velocidad de consumo de glucosa y la formación de piruvato.

Los resultados demuestran que la cepa AV13 es capaz de soportar niveles altos de piruvato manteniendo niveles de biomasa y productividades volumétricas similares a su contraparte en cultivo lote. Sin embargo, el proceso no se mantuvo constante durante todo el experimento: se puede observar una clara diferencia entre la primera etapa (de 0 a 34 h) y una segunda etapa (34 a 80 h).

Durante la primera etapa se produjo un total de 6 g<sub>DCW</sub>/L y se produjo un total de 85 g/L de piruvato, lo cual corresponde a una productividad de 2.5 g/L.h<sup>-1</sup>. Estos datos son muy parecidos a los obtenidos en los cultivos lote, sin embargo durante la segunda etapa se produjo solamente 2 g<sub>DCW</sub>/l lo cual se esperaba debido a que el oxígeno presente en el medio no permite que se genere mayor cantidad de biomasa, aunque es importante resaltar que la cantidad de piruvato producido durante la segunda fase fue tan solo de 65 g/L lo cual corresponde a una productividad volumétrica de 1.4 g/L.h, es decir que la segunda fase de la fermentación fue menos eficiente que la primer etapa.

Es posible que dicho fenómeno haya ocurrido debido a las altas concentraciones de piruvato en el medio, así como la acumulación de otras sustancias ya sea proveniente del medio de cultivo o la base añadida al medio, que en altas cantidades desaceleren el crecimiento de la bacteria.

Otro punto importante por denotar es la practicidad del sistema. Se optó por alimentar glucosa en polvo. Para evitar añadir grandes cantidades extras de líquido lo cual podría significar beneficios en cuanto a operación y recuperación del producto a nivel industrial. Tampoco hubo problemas de contaminación determinado por plaqueo en cajas de Petri con LB más glucosa, aun cuando la fermentación duró 80 horas y la alimentación se realizó a las 28h. También la cepa AV13 resultó capaz de sobrevivir en altas concentraciones de piruvato (120 g/L), y aunque no hay datos en la literatura sobre la concentración inhibitoria

de piruvato para *E. coli* se cuenta con un antecedente, donde la cepa productora de *E. coli* soportó al menos 90 g/L de piruvato en un cultivo similar (Zhu *et al.*, 2008).

La concentración lograda en el presente ejercicio es un 33% mayor que la máxima reportada en la literatura, con un rendimiento del 80% del teórico, una productividad de 1.5 g/L.h y en un medio definido y de bajo costo. Finalmente, aun cuando dicho ejercicio se realizó solamente con glucosa, los resultados obtenidos en los cultivos lote sugieren que también se podrían realizar con xilosa como única fuente de carbono, así como una mezcla de glucosa y xilosa esperando resultados muy similares.

#### **7.4 El uso de cultivos continuos no representa una mejora a los parámetros observados en cultivos lote**

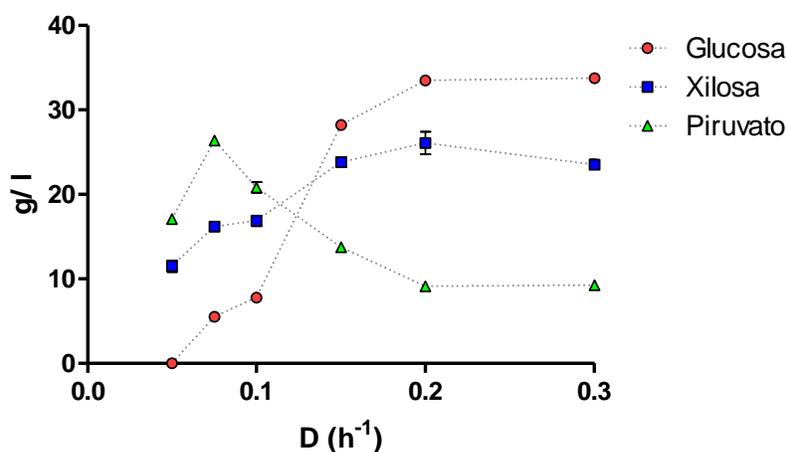
El cultivo continuo se basa en el suministro ininterrumpido de nutrientes a una velocidad predeterminada. Mientras que una corriente de salida, conteniendo medio de cultivo con biomasa, productos y otros residuos, son removidos constantemente y las células se mantienen en fase de crecimiento exponencial. Una de las propiedades más importantes en este tipo de cultivos es cuando el proceso se encuentra en estado estable; es decir, cuando se presentan los mismos flujos de entrada como de salida, se mantiene el volumen del reactor constante, así como la concentración de los nutrientes dentro del biorreactor. Dado que la velocidad de crecimiento de una bacteria depende de las condiciones de cultivo, en un cultivo continuo es posible igualar la velocidad específica de crecimiento de la bacteria ( $\mu$ ) a la tasa de dilución (D).

Sin embargo, la naturaleza de dicho tipo de cultivo presenta algunas desventajas, siendo la posible mutación de la bacteria utilizada debido a la gran cantidad de generaciones que se producen durante los largos periodos de tiempo que conlleva el cultivo y la posibilidad de contaminación con otros microorganismos. Lo anterior provoca que dicho tipo de cultivo sea poco utilizado en operaciones industriales. Además, es frecuente que en operaciones en estado estable los rendimientos sean inferiores a los de procesos en estado dinámico (Lim & Shin, 2013).

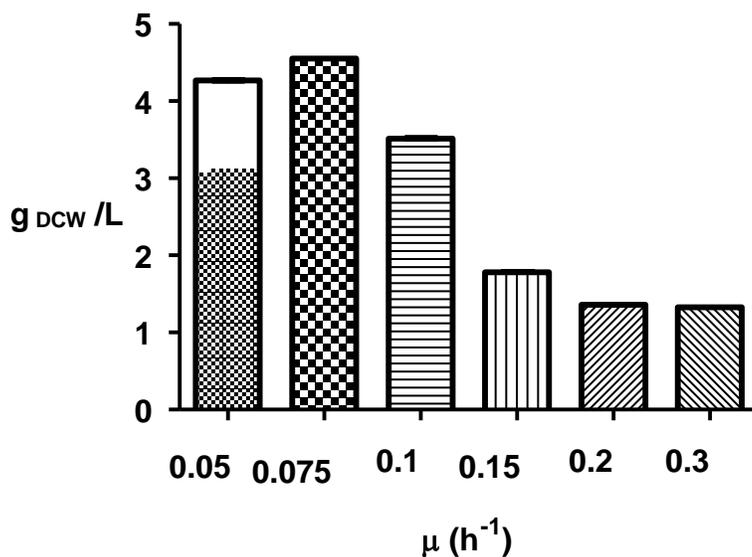
Por otro lado, la implementación de una estrategia de cultivos continuos resulta en una alternativa viable para el proceso de producción a nivel industrial de algunos químicos de interés, en este caso de piruvato. Dicha estrategia permite incrementar la productividad de estos metabolitos de interés debido a que la máxima productividad (máxima obtención de biomasa por unidad de tiempo) se puede lograr operando a la velocidad de dilución a la cuál  $D \cdot X$  sea máxima ( $D$ ).

En este trabajo se evaluaron distintas tasas de dilución (0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.3  $\text{h}^{-1}$ ) y el resumen general de resultados se presentados en la **Figura 10A y 10B**. En la figura 10 B se muestra la cantidad de biomasa recuperada bajo cada tasa de dilución probada, y se observa que los niveles más bajos de biomasa corresponden a las dos diluciones superiores: 0.3 y 0.2  $\text{h}^{-1}$ . En la figura 10 A se observa que a altas diluciones la cantidad de sustrato consumida es mínima y, por ende, la cantidad de piruvato producido es poco. Estas dos tasas de dilución presentan las productividades volumétricas más altas como se mostrará más tarde, pero de utilizarse estas tasas de dilución, se perdería gran parte del sustrato y esto representa un problema si se pretende en un futuro purificar el piruvato.

A



**B**



**Figura 10 A-** Resumen de resultados de experimentos en cultivo continuo con las seis tasas de dilución ensayadas (0.05, 0.075, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.3  $\text{h}^{-1}$ ): Perfiles de glucosa y xilosa residuales en el biorreactor, así como piruvato producido. 10 B Peso seco obtenido a cada tasa de dilución. Tres tomas de muestra por dilución en fase estable. Los valores graficados son el promedio de las réplicas con su respectivo error experimental.

De lo anterior es importante recalcar que a las mayores tasas de dilución ensayadas (0.3, 0.2  $\text{h}^{-1}$ ) se presentaron altos niveles de glucosa y xilosa en el medio, con una producción de 9.25 y 9.1  $\text{g/L}$  de piruvato, respectivamente. Esto se debió a que la velocidad de recambio no permitió que los hidratos de carbono presentes en el medio fueran metabolizados por la cepa AV13. A medida que la tasa de dilución fue disminuida (0.15, 0.1, 0.075  $\text{h}^{-1}$ ) se observó un mayor consumo de la mezcla de hidratos de carbono utilizada, aunado a esto se obtuvo una mayor cantidad de piruvato que el obtenido en las D mayores, alcanzando 26.4  $\text{g/L}$  a una D: 0.075  $\text{h}^{-1}$ . Basados en estos resultados se propuso disminuir aún más la D con el fin de maximizar la cantidad de producto y disminuir en su totalidad la cantidad de hidratos de carbono presentes en el reactor. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados. Si bien, la menor D ensayada (0.05  $\text{h}^{-1}$ ) presentó menores niveles de xilosa (aproximadamente 11  $\text{g/L}$ ).

Un fenómeno interesante se observó en los ensayos con  $k_{LA}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  en cultivo lote, una vez que la glucosa remanente era menor a  $5 \text{ g/L}$  la cepa AV13 comenzaba a consumir piruvato con un consumo simultáneo de glucosa. Los resultados presentados en la figura 10A sugieren la posibilidad de un alto consumo de piruvato a una  $D$  de  $0.05 \text{ h}^{-1}$ , este resultado significó que menores tasas de dilución no serían convenientes con el fin de obtener una mayor concentración de piruvato. Como se citó en el párrafo anterior, se consumió piruvato a pesar de tener concentraciones altas de xilosa ( $>10 \text{ g/L}$ ), algo que no se había visto anteriormente en cultivos lote (figura 5).

En cultivos continuos se observaron diferencias significativas de producción de piruvato entre las distintas  $D$  ( $0.05\text{-}0.3 \text{ h}^{-1}$ ). En estos experimentos, se observó que a una  $D$  más alta favoreció un incremento en la velocidad específica de consumo de glucosa y xilosa. La distribución de las cantidades de producto cambió significativamente entre tasas de dilución altas y bajas.

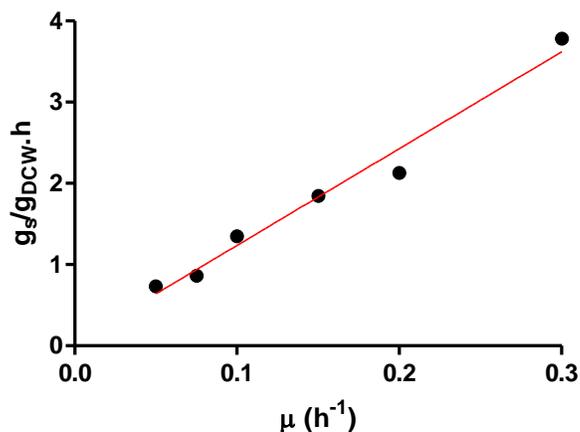
Por ejemplo, de los  $42 \text{ g/L}$  de glucosa y los  $32 \text{ g/L}$  de xilosa presentes en el medio alimentado, en la tasa de dilución de  $0.3 \text{ h}^{-1}$  en el efluente del biorreactor se cuantificaron  $33.75 \pm 0.04 \text{ g/L}$  de glucosa y  $25.53 \pm 0.47 \text{ g/L}$  de xilosa. En contraste, a bajas tasas de dilución,  $0.075 \text{ h}^{-1}$ , se obtuvieron  $5.52 \pm 0.27 \text{ g/L}$  de glucosa y  $16.18 \pm 0.13 \text{ g/L}$  de xilosa en el efluente.

Finalmente, en la tasa de dilución de  $0.05 \text{ h}^{-1}$  se obtuvo  $0 \text{ g/L}$  de glucosa y  $11.51 \pm 0.56 \text{ g/L}$  de xilosa indicando que, si bien no se nota una represión catabólica para el consumo de glucosa y xilosa, ciertamente hay una fuente de carbono preferida por la célula, en este caso la glucosa, dado que se consume a una mayor velocidad que la xilosa.

También es importante puntualizar que en todos los casos el carbono fue asimilado por la bacteria y distribuido entre dos principales factores: biomasa y producto (piruvato). En cuanto a los resultados obtenidos en los rendimientos se observan datos poco esperados: El menor rendimiento biomasa sustrato fue el obtenido en la tasa de dilución de  $0.05$  con  $0.068 \pm 0.001 \text{ g/g}$  mientras que la más alta registrada fue de  $0.095 \pm 0.008 \text{ g/g}$  en la dilución de  $0.2 \text{ h}^{-1}$ .

El rendimiento de producto sustrato se obtuvo que el menor rendimiento fue observado en la menor tasa de dilución  $0.05 \text{ h}^{-1}$  con un valor de  $0.34 \pm 0.007 \text{ g/g}$  y la mayor se obtuvo con datos similares entre las tasas de dilución de  $0.15$  y  $0.2 \text{ h}^{-1}$  con  $0.78 \pm 0.42$  y  $0.79 \pm 0.63$  respectivamente. En contraste, la menor concentración de piruvato se obtuvo en la tasa de dilución de  $0.3 \text{ h}^{-1}$  con  $11.56 \pm 0.33 \text{ g/L}$  y se obtuvo un incremento en dicha concentración a medida que se disminuyó la  $D$  hasta llegar a una tasa de dilución de  $0.075$  en la que se obtuvo una concentración máxima de  $32.95 \pm 0.34 \text{ g/L}$ .

Continuando con la tendencia observada anteriormente la tasa de dilución con el mayor dato de concentración máxima observada debió de ser la correspondiente a  $0.05 \text{ h}^{-1}$  pero en este caso se observó una concentración máxima menor  $21.36 \pm 0.63 \text{ g/L}$  a la tasa de dilución inmediatamente mayor esto se debe a que a tasas muy bajas de  $D$ , la cepa es capaz de incorporar el ácido pirúvico a su metabolismo así como también puede hacerlo con la xilosa y glucosa presente en el medio.

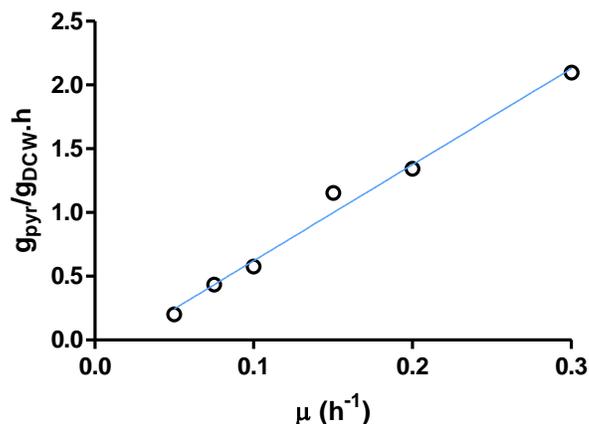


**Figura 11.** Velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ) obtenida en cultivos continuos.

En la **Figura 11** se muestra la tendencia de consumo de sustrato  $q_s$ . La teoría indica que el comportamiento debería de ser lineal. Asimismo, se observó que a medida que la  $D$  aumentó también lo hizo la  $q_s$  y el rendimiento producto sustrato sufrió una caída. De lo anterior se puede decir que existe una tasa de dilución a la que el consumo específico de sustrato es mayor y podemos decir que es óptimo. Esto concuerda con el punto en el que la productividad volumétrica de piruvato es mayor. Al observar la figura 11 se debe notar que la intersección de la velocidad específica de consumo de sustrato cuando la  $\mu$  es cero corresponde a  $0.044 \text{ g}_s/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$  esto corresponde al coeficiente de mantenimiento el cual se define como la energía utilizada con fines distintos al crecimiento como potencial de membrana, el transporte de solutos y la renovación de proteínas; etc. (Kempes *et al.*, 2017) para *E. coli* AV13. Los valores de energía de mantenimiento para *E. coli* silvestre son de  $0.047 \text{ g}_{\text{Glc}}/\text{g}_{\text{DWC}}\cdot\text{h}$  (Neijssel, *et al.* 1996).

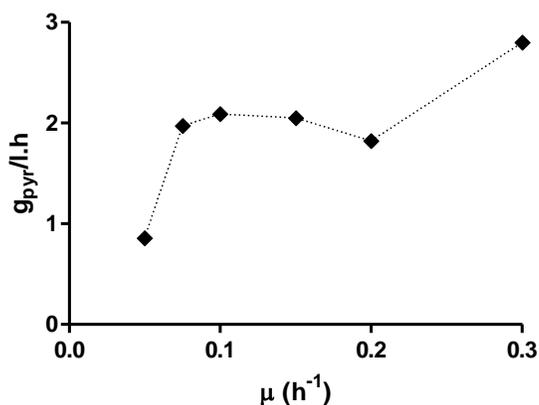
El coeficiente de mantenimiento para la cepa AV13 bajo los parámetros del experimento proporciona información sobre el límite inferior que se debe tener si se quiere producir piruvato.

De igual forma, al observarse la velocidad específica de producción de piruvato (**Figura 12**) podemos ver que la bacteria destina una gran parte de los recursos metabólicos a la producción de piruvato, razón por la cual los rendimientos fueron tan altos en los experimentos anteriores. También se observa que a medida que se aumenta la  $\mu$  también aumenta la productividad específica de piruvato, como es de esperarse.



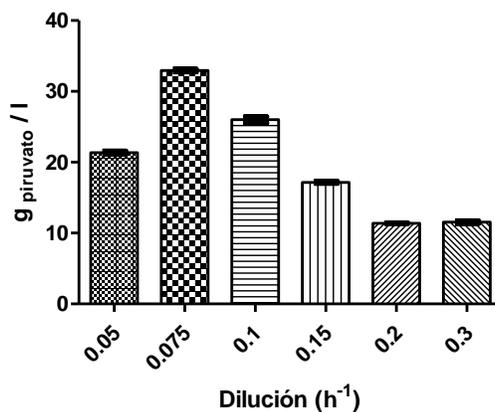
**Figura 12.** Velocidad específica de producción de piruvato ( $q_p$ ) obtenida en cultivos continuos.

En cuanto a la productividad volumétrica de piruvato (**Figura 13**) se observa que a una  $\mu$  de  $\sim 0.2 h^{-1}$  se tiene una caída en la  $Q_p$  y posteriormente sube a  $\sim 3.5 g/L h$  al aumentar la  $\mu$  a  $0.3 h^{-1}$ . Lo anterior representa un comportamiento inesperado ya que la teoría del cultivo continuo indica que se esperaría un solo aumento de la  $Q_p$  en este caso hasta una  $\mu$  de  $0.075 h^{-1}$  y un solo descenso que en este caso estaría dado después de una  $\mu$  de  $0.3 h^{-1}$ . Por esta razón y recordando que entre  $\mu$  de  $0.2$  y  $0.3 h^{-1}$  se tiene una gran cantidad de sustrato remanente, sería eficiente mantener la tasa de dilución entre  $0.075$  y  $0.15 h^{-1}$ . Como consecuencia, el intervalo comprendido entre la  $D$  de  $0.075$  y  $0.2 h^{-1}$  mantienen una productividad volumétrica similar, lo cual proporciona indicios de que la bacteria se encuentra en un estado fisiológico similar y que se podría elegir cualquier tasa de dilución en dicho intervalo esperando productividades similares.



**Figura 13.** Productividad volumétrica ( $Q_p$ ) obtenida en cultivos continuos.

Al comparar los datos obtenidos en fermentaciones de tipo lote y cultivos continuos se observa que en el caso de los cultivos continuos se obtuvo una concentración máxima menor a las obtenidas en cultivos lote (**Figura 14**).



**Figura 14-** Concentración máxima de piruvato obtenida en cada condición de cultivo continuo. Los valores graficados son el promedio de las réplicas con su respectivo error experimental.

Debido a esto se probó que los cultivos de tipo continuo no son una buena estrategia para la producción de piruvato si lo que se desea es obtener altas concentraciones de piruvato. Uno de los problemas identificados que explican dicho fenómeno es la capacidad que tiene la cepa AV13 de consumir piruvato cuando se presentan bajas concentraciones de glucosa ( $\leq 5\text{g/L}$ ).

En cada condición se obtuvo la cantidad de minutos promedio necesaria para la duplicación de dicho organismo. En resumen, la mayor velocidad de duplicación surgió a los 780 rpm. Tal condición fue aquella en la que se obtuvo la mayor productividad y título.

En contraste, el tiempo de duplicación más alto fue el correspondiente a 660 rpm, una de las condiciones que obtuvo los parámetros más bajos de título, productividad, biomasa, etc. En un principio se propuso variar la tasa de dilución para experimentos de cultivo continuo, es decir, realizar un barrido de ( $0.05$  a  $0.6\text{ h}^{-1}$ ). Sin embargo, debido a que el mayor dato de  $\square$  obtenido es de  $0.56\text{ h}^{-1}$ , la tasa de dilución debió de ser menor a  $0.56\text{ h}^{-1}$ .

## 7.5 Rendimientos

El rendimiento más alto de biomasa sustrato en cultivo lote fue el de la condición de kLa 145 h<sup>-1</sup> correspondiente a 0.083, y se puede observar una mayor tendencia en el rendimiento lo cual corresponde con los datos esperados: a mayor oxígeno en el medio, mayor biomasa (**Tabla 5**). En el caso de cultivo continuo el correspondiente a D 0.2 h<sup>-1</sup> es de 0.095 esto indica que una pequeña parte (menos del 10% en todos los casos) es destinada a la producción de biomasa, lo que permite que una fracción mucho mayor de recursos se destinen a la producción del producto de interés.

**Tabla 5.** En la presente tabla se resumen los rendimientos correspondientes a biomasa- sustrato ( $Y_{x/s}$ ), producto- sustrato ( $Y_{p/s}$ ) y producto biomasa ( $Y_{p/x}$ ). Los datos se obtuvieron por triplicado y se presenta el error experimental asociado. Datos presentados en g/g.

<b>D (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>x/s</sub></b>	<b>σ</b>	<b>Y<sub>p/s</sub></b>	<b>σ</b>	<b>Y<sub>p/x</sub></b>	<b>σ</b>
0.05	0.068	± 0.001	0.34	± 0.007	5.02	± 0.08
0.075	0.087	± 0.001	0.63	± 0.008	7.24	± 0.07
0.1	0.073	± 0.001	0.53	± 0.008	7.2	± 0.21
0.15	0.081	± 0.004	0.78	± 0.042	9.6	± 0.17
0.2	0.095	± 0.008	0.79	± 0.063	8.39	± 0.15
0.3	0.078	± 0.003	0.69	± 0.036	8.84	± 0.17

En cuanto al rendimiento producto sustrato: El mayor alcanzado en cultivo continuo fue el correspondiente a 780 rpm con 0.84, y en todos los casos todos son iguales o mayores a 0.7, en otras palabras, por cada gramo de sustrato consumido se produjo 0.7 g o más de piruvato. Los cultivos continuos presentan datos similares siendo los mayores D: 0.2 y 0.15 con 0.79 y 0.78 respectivamente. En este caso el rendimiento no llega a ser tan alto como en el caso de los cultivos continuos ya que en estas dos condiciones aún existe una alta concentración de sustrato en el medio.

El rendimiento de producto biomasa es igualmente interesante, aquí el dato más alto obtenido en cultivo lote corresponde a la condición de 660 rpm con 13.24 g piruvato/g DCW este dato es importante porque se refiere a la cantidad de producto de interés producido por cada gramo de peso seco. En otras palabras, la cantidad de piruvato producido por unidad de células ( gramo de peso seco) produjo 13.24 g de piruvato, el dato

de 660rpm es mayor en comparación ya que en esta condición se produjo una menor cantidad de biomasa, sin embargo, los datos correspondientes a las condiciones posteriores no son muy diferentes entre sí.

El caso del cultivo lote es ligeramente distinto, en este el mayor rendimiento se obtuvo en D: 0.15 con 9.60 g piruvato/ g DCW y tanto las condiciones anteriores como las posteriores son menores, esto se debe al igual que el rendimiento producto sustrato a la cantidad consumida de sustrato en el medio.

## 7.6 Productividad volumétrica

La productividad volumétrica representa uno de los mejores factores de comparación entre cepas productoras de algún compuesto ya que toma dos de los factores más importantes, la concentración máxima y el tiempo total del cultivo (factor importante en los cultivos lote realizados).

Dentro de los datos obtenidos el mayor  $Q_p$  obtenido fue de 2.4 g<sub>pyr</sub>/L h en la condición de 780 rpm. Esto quiere decir que, bajo esta condición de 780 rpm, se produjeron 2.4 g de piruvato por litro por hora (tomando en cuenta el proceso completo desde la inoculación), es por esta misma razón que en los cultivos continuos se puede aumentar la productividad hasta un total de 2.8 g<sub>pyr</sub>/L h. La  $Q_p$  de cada condición en cultivo lote se presenta con la tendencia esperada, en aquellas condiciones con menores rpm y por ende un  $k_{La}$  menor, se presenta una  $Q_p$  baja, 1.48 g<sub>pyr</sub>/L h ya que se trata de un cultivo que tardó más tiempo en terminar así y también presenta una concentración máxima alcanzada menor que las otras condiciones.

**Tabla 6.** En la presente tabla se resumen las productividades volumétricas. Se presenta la desviación estándar correspondiente a cada punto.

$D \text{ h}^{-1}$	$Q_p \text{ (g}_{pyr}/l \text{ h}^{-1})$	$\sigma$
0.05	0.85	$\pm 0.02$
0.075	1.97	$\pm 0.02$
0.1	2.09	$\pm 0.06$
0.15	2.05	$\pm 0.04$
0.2	1.82	$\pm 0.02$
0.3	2.8	$\pm 0.01$

La Qp obtenida en la condición de 780 GX y X, no se observa un cambio drástico entre las distintas condiciones. Dicho cambio se esperaba debido a que se pensaba que habría un fenómeno de represión catabólica el cual incrementaría los tiempos de fermentación y por ende la Qp respectiva de cada cultivo.

Los cultivos continuos presentan una tendencia distinta a la esperada en cultivos continuos típicos ya que varias condiciones se presentan muy similares (D: 0.075, 0.1, 0.15 y 0.2) esto podría deberse al consumo del producto de interés producido comenzando probablemente entre la D 0.15 y 0.1. También se presenta Qp calculado a las 24 horas ya que en algunas ocasiones se utiliza como parámetro de comparación debido a que toma en cuenta que distintos cultivos duran distintas horas.

La velocidad específica de consumo de O<sub>2</sub> (qO<sub>2</sub>) presentados en la **Tabla 7**, para cada caso es menor que aquellas que se obtienen en cultivos aerobios, esto se debe a que dentro de la metodología planteada se propuso un cultivo con limitación de transferencia de oxígeno y, por lo tanto, los datos de consumo de oxígeno son mayores que los de un cultivo anaerobio, pero menores que aquellos de un cultivo aerobio. La fuente de carbono (glucosa) que no fue transformada a piruvato ni utilizada para generar biomasa, fue metabolizada a CO<sub>2</sub>.

**Tabla 7.** En la presente tabla se resumen otros parámetros calculados: OTR, CER, RQ, QO<sub>2</sub> y QCO<sub>2</sub> Medio mineral AM3x.

	<b>rpm</b> <i>rpm, h<sup>-1</sup></i>	<b>OTR</b> <i>mmol O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> s</i>	<b>σ</b>	<b>CER</b> <i>mmol CO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>s</i>	<b>σ</b>	<b>RQ</b> <i>adimensional</i>	<b>σ</b>	<b>QO<sub>2</sub></b> <i>mmol O<sub>2</sub>/g<sub>DCW</sub>.h</i>	<b>σ</b>	<b>QCO<sub>2</sub></b> <i>mmol CO<sub>2</sub>/g<sub>DCW</sub>.h</i>	<b>σ</b>
<b>Cultivo lote</b>	660	3.94	± 0.19	1.030	± 0.02	0.26	±0.02	1.18	± 0.04	0.31	± 0.01
	720	4.39	± 0.06	1.854	± 0.06	0.42	± 0.02	1.04	± 0.00	0.44	± 0.02
	780	7.95	± 0.09	6.240	± 0.16	0.57	± 0.03	2.42	±0.17	1.36	±0.02
	810	10.07	± 0.05	4.687	± 0.02	0.47	± 0.00	2.15	± 0.01	1.00	± 0.01
	780 XG	7.59	± 0.01	5.953	±0.08	0.69	± 0.01	1.59	± 0.02	1.11	± 0.00
	780 X	7.66	± 0.05	3.997	± 0.02	0.60	± 0.00	1.47	± 0.01	0.88	±0.00
<b>Cultivo Continuo</b>	0.05	0.06	± 0.00	0.003	± 0.00	0.04	± 0.00	0.01	± 0.00	0.00	± 0.00
	0.075	0.07	± 0.00	0.023	± 0.00	0.32	± 0.00	0.02	± 0.00	0.01	± 0.00
	0.1	0.90	± 0.00	0.440	± 0.00	0.49	± 0.00	0.25	± 0.00	0.12	±0.00
	0.15	5.45	± 0.00	1.581	± 0.00	0.29	± 0.00	3.05	± 0.00	0.88	± 0.00
	0.2	5.49	± 0.00	2.270	± 0.00	0.41	± 0.00	4.05	± 0.00	4.05	± 0.00
	0.3	5.82	± 0.00	3.646	± 0.00	0.63	± 0.00	4.39	± 0.00	2.75	± 0.00

Los datos correspondientes al CER presentan datos muy interesantes aunque esperados, en el caso de cultivos lote el mayor dato obtenido correspondió a la condición de 660 rpm con un CER de  $1.030 \pm 0.02 \text{ mmol CO}_2/\text{m}^3 \text{ s}$  esto se ve reflejado en el tiempo de cultivo (36 h) ya que el organismo produce biomasa y todos los compuestos necesarios para su crecimiento a niveles mucho más bajos que a mayores rpm. En la condición de 780 rpm, el CER obtenido fue de  $6.24 \pm 0.001 \text{ mmol CO}_2/\text{m}^3 \text{ s}$ . Aquí se observa una mayor producción de  $\text{CO}_2$  derivada de una mayor velocidad de crecimiento y síntesis de compuestos, lo que se ve reflejado en la duración total de la cinética (26 h), pudiendo ser a que mayores cantidades de oxígeno promueven el crecimiento de las bacterias lo cual acelera el metabolismo de esta y produce mayores cantidades de  $\text{CO}_2$ .

En cultivos continuos se observa una tendencia similar, el CER obtenido en la tasa de dilución más baja 0.05 fue de  $0.003 \pm 0.001 \text{ mmol CO}_2/\text{m}^3 \text{ s}$  mientras que el mayor dato obtenido fue de  $3.64 \pm 0.001 \text{ mmol CO}_2/\text{m}^3 \text{ s}$ . Lo anterior sugiere una mayor tasa metabólica en tasas de dilución altas, ya que la bacteria se ve obligada a duplicarse a una mayor velocidad; mientras que en tasas de dilución bajas, la bacteria no tiene una presión tan fuerte.

El CER constituyó menos del 10% del carbono consumido en todos los casos en cultivos lote, y en cultivos continuos, representó menos del 3% en todos los casos. Esto refleja un alto rendimiento de sustrato derivado de una baja producción de biomasa, ocasionada por la condición de limitación de transferencia de oxígeno en todos los experimentos realizados. Estas observaciones suponen que en cultivos continuos bajas tasas de crecimiento son más efectivas dirigiendo glucosa y xilosa al producto deseado, lo cual también se encuentra relacionado con la cantidad de biomasa presente en el reactor:  $4.55 \pm 0.001 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$  en la tasa de  $0.075 \text{ h}^{-1}$  contra la D de 0.3 con  $1.31 \pm 0.02 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$  y esto ocasiona proporcionalmente menos  $\text{CO}_2$ .

En la menor tasa de dilución ocurre algo inesperado ya que la biomasa producida es menor a la tasa de dilución subsecuente con  $4.26 \pm 0.001 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$  contra los  $4.55 \pm 0.001 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$  en la tasa de  $0.075 \text{ h}^{-1}$  esto puede deberse a que la bacteria se ve obligada a consumir grandes cantidades de ácido pirúvico para poder mantenerse. lo cual supone un gran esfuerzo metabólico por parte de la célula que consume mayores cantidades de energía y, por lo tanto, cuenta con menores recursos para producir biomasa.

### **7.7 El flujo de carbono en la cepa AV13 se dirige mayoritariamente a la síntesis de piruvato en cultivos lote, pero no en cultivos continuos**

Con el fin de conocer el destino del carbono suministrado en los experimentos se realizaron balances de carbono **Figura 15**. El total del carbono suministrado en cada caso ( $74 \text{ g/L}$ ) se consideró como el 100% del carbono. Se realizó una sumatoria de diversos factores como el producto generado, el total del carbono presente en biomasa (peso seco), la cantidad de  $\text{CO}_2$  producido y la cantidad final de cada tipo de carbohidrato residual.

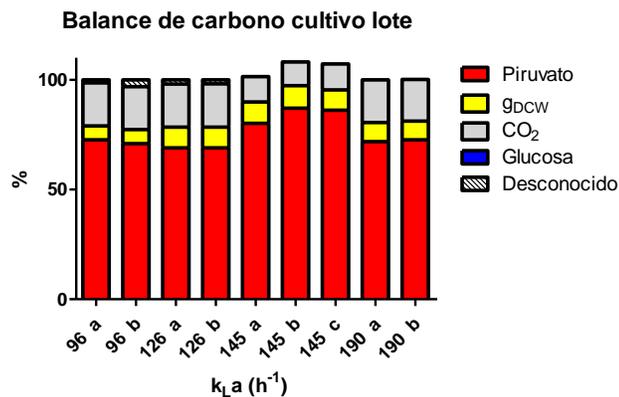
Se observó que en todos los casos referentes al cultivo de tipo lote, los valores totales se encuentran muy cerca del 100% del carbono suministrado ya que las variaciones se encuentran en un rango de  $\pm 5\%$  del total y esto se atribuyó a errores experimentales. Sin embargo, los cultivos continuos presentan valores mucho más alejados del 100% total. En el caso de la  $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$  no se encontró más del 50% del carbono total suministrado. Esto puede significar que más de la mitad del carbono suministrado se encuentra presente en un compuesto hasta el momento no identificado.

La cepa AV13 consume piruvato, una vez que se acabó la fuente de carbono añadida (glucosa o xilosa), sugiriendo que en un cultivo continuo (bajo las condiciones que se plantean para disminuir la represión catabólica) se podría presentar un consumo simultáneo de glucosa, xilosa y piruvato. De ser así, se pretende prevenir el consumo de piruvato en el medio mediante la eliminación/modificación de los transportadores de piruvato presentes en la célula CstA y YbdD. El transportador Yhjx no representa una ruta viable debido a que dicho transportador es el encargado de internalizar piruvato, así como de excretarlo. Sin

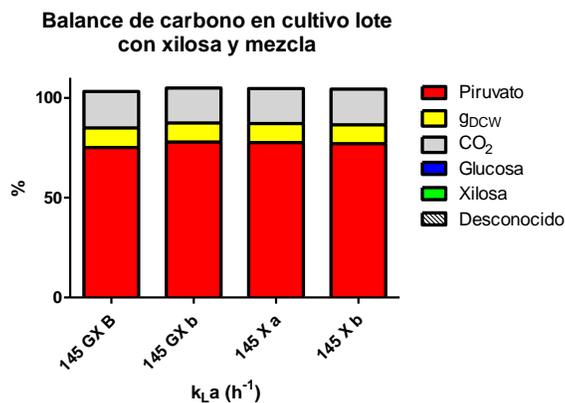
embargo, no se sabe si esto prevenga el consumo en su totalidad ya que se conoce de la existencia de transportadores promiscuos que puedan internalizar piruvato bajo esta condición.

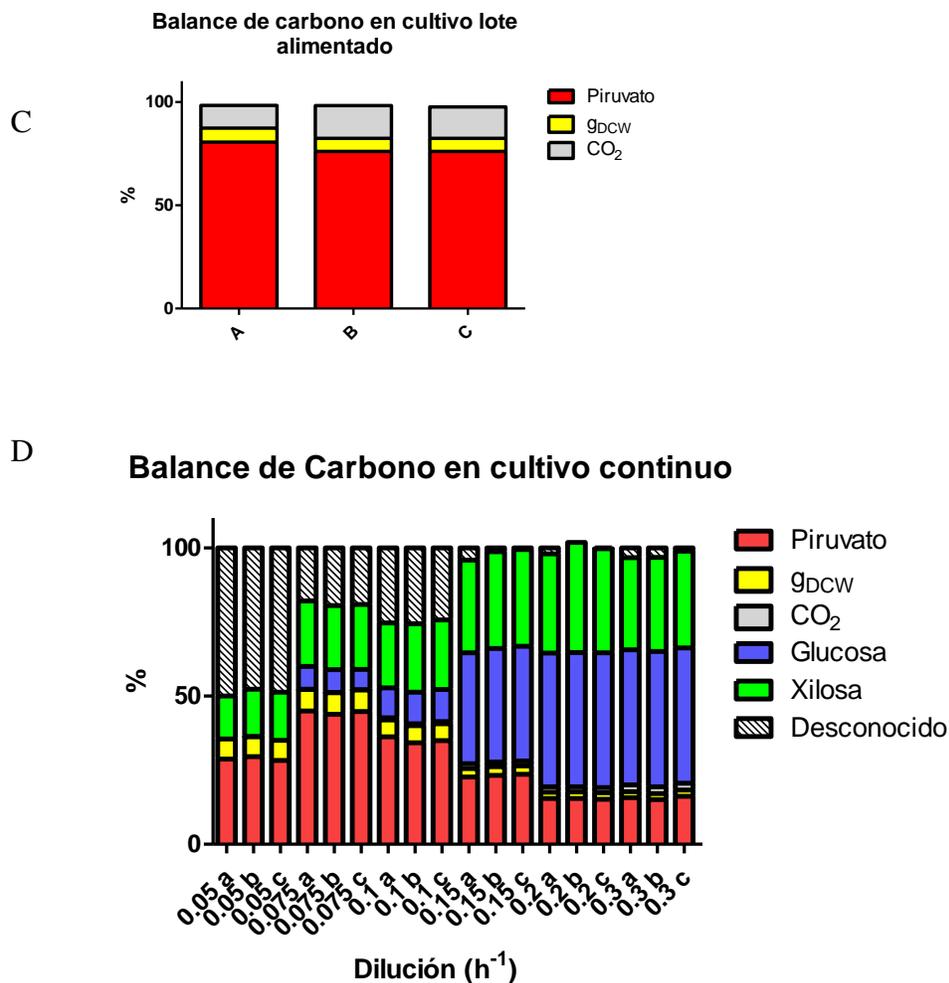
Otra estrategia consiste en que la glucosa siempre se encuentre presente en el medio, esto disminuye el consumo de piruvato (arriba de 5 g/L de acuerdo a los resultados obtenidos en cultivos lote), pero también disminuiría el consumo de xilosa, ya que se presentaría un fenómeno de represión catabólica, el cual se pretende evitar. Como alternativa se plantea una estrategia de cultivo continuo en etapas, es decir que en la primera etapa se consuma la glucosa presente en el medio y en la segunda etapa la xilosa, sin embargo, esto presenta varios problemas: es sabido que la velocidad de consumo de glucosa y xilosa no es la misma, por lo tanto se deberá trabajar con dos volúmenes distintos en cada etapa, o en su defecto con concentraciones distintas de fuente de carbono en cada una.

A



B





**Figura 15.** Balance de carbono en los cultivos realizados. A) Balance de carbono correspondiente a las fermentaciones en cultivo lote con glucosa B) Cultivo lote con xilosa y mezcla, C) lote alimentado y D) Cultivo continuo. Se presentan los duplicados o triplicados por separado según sea el caso.

Los balances de carbono mostraron datos relevantes ya que en cultivos lote se justificó en la gran mayoría de los casos el carbono proporcionado ya sea en glucosa, xilosa o mezcla de los dos. En algunos experimentos se obtuvo ligeramente más o menos carbono del proporcionado, pero estos desajustes representaron cerca del 5% del total por lo que se consideró que dicho desajuste se atribuye a errores experimentales y ligeros errores de cálculo acumulados. En cultivos lote se observa que la mayor cantidad de carbono ~75% es dirigida a la síntesis del producto de interés, una menor parte a la manutención de la célula ~15% y producción de  $\text{CO}_2$  y la menor parte se encuentra contenida en biomasa ~10%.

En los cultivos continuos se observa una tendencia similar en la que el carbono consumido se dirige mayoritariamente a la formación de piruvato y en menor medida a la producción de biomasa y CO<sub>2</sub>. Sin embargo, a tasa de dilución bajas (D: 0.1, 0.075 y 0.05) los balances de carbono presentan desajustes en los que no se puede justificar el carbono suministrado en glucosa o xilosa y se piensa que esto se debe al consumo de piruvato como fuente de carbono, dicha tendencia se observa a partir de la D: 0.1 en la cual se encuentran ~25 g/L de xilosa y ~23 g/L de glucosa, esto representa más del 50% del sustrato suministrado, pero estas cantidades presentes en cultivos continuos son suficientes para que la célula se vea obligada a consumir piruvato como fuente de carbono.

Los datos del balance de carbono recopilados en cultivo lote son bastante alentadores puesto que se presentan altas concentraciones de piruvato manteniendo poco carbono en biomasa y en forma de CO<sub>2</sub>. En el caso de los cultivos continuos la pérdida de carbono en tasas de dilución bajas podría presentar indicios sobre la producción piruvato y posterior consumo lo cual resulta en concentraciones menores que otras tasas de dilución.

Finalmente, en los cultivos lote alimentado al igual que en los cultivos lote, se conoce el destino del carbono suministrado, donde la mayor parte del carbono es dirigido a la formación de piruvato ~80%. En segundo término se dirige ~15% a CO<sub>2</sub> desprendido como resultado de la respiración bacteriana y poco se encuentra en forma de biomasa ~7%. Dado lo anterior, si se pretende aumentar aún más la concentración de piruvato en el medio, se podría optar por disminuir la cantidad de CO<sub>2</sub> producida, ya sea disminuyendo el oxígeno suministrado sabiendo los resultados que esto conllevaría u optar por inocular el cultivo con mayores cantidades de biomasa inicial. Esto podrá derivar en tiempos de fermentación disminuido, con menor producción de biomasa y por ende menor cantidad de CO<sub>2</sub> desprendido.

## 7.8 La cepa AV13 produce piruvato a partir de hidrolizados de rastrojo de maíz

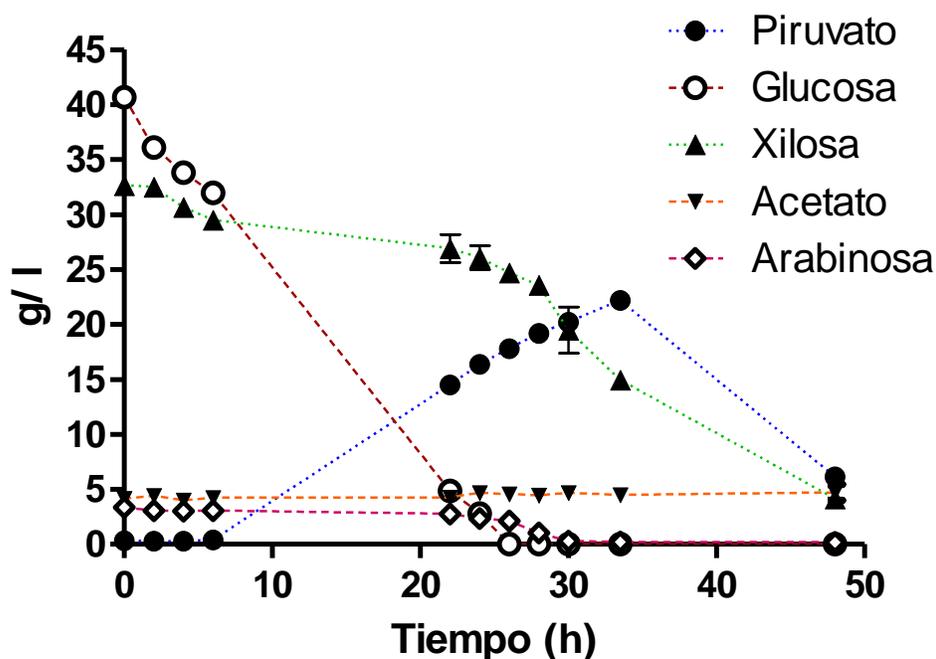
Para probar el concepto central del presente trabajo se realizaron cinéticas utilizando la mejor condición observada en cultivo lote ( $k_{La}$  145 h<sup>-1</sup>) e hidrolizados de rastrojo de maíz como medio de cultivo para producir piruvato a partir de los azúcares presentes en el medio.

El análisis por HPLC en columna Aminex® de los hidrolizados de maíz mostró la siguiente composición en promedio: acetato 3.95 ± 0.09 g/L, arabinosa 3.35 ± 0.199 g/L, hidroximetilfurfural 0.45 ± 0.001 g/L, furfural 0.19 ± 0.001 g/L, glucosa medido en YSI 32.8 ± 0.7 g/L, xilosa determinado por la prueba de Bial 27.39 ± 0.07 g/L.

Tanto la cantidad de glucosa como la cantidad de xilosa, por ser los componentes más relevantes para este estudio se determinaron inicialmente con ayuda de HPLC y posteriormente se corroboraron por métodos alternos: la glucosa por medio de YSI y la xilosa por la prueba de Bial descrita anteriormente. El presente trabajo se basó en las concentraciones de azúcares obtenidos por Vargas-Tah *et al.*, en 2015 y en la metodología aplicada en sus experimentos. No obstante, aunque la Dra. Vargas utilizó un cóctel enzimático para aumentar la cantidad de glucosa y xilosa liberada del material lignocelulósico, en el proceso llevado a cabo en el presente estudio no se utilizó dicho cóctel enzimático debido a los altos costos que significaría trabajar con los volúmenes del presente trabajo.

Sin embargo, los niveles obtenidos de glucosa y xilosa fueron mayores a los esperados. Finalmente, y con motivo de igualar los datos obtenidos por la Dra. Vargas se añadió 10 g/L de glucosa y 5 g/L de xilosa a la mezcla para obtener las concentraciones de 42 g/L de glucosa y 32 g/L de xilosa. Es importante mencionar que los preinóculos se realizaron en medio mineral por lo que la cepa no se encontraba preadaptada a los hidrolizados.

El  $k_{La}$  utilizado fue de 145 h<sup>-1</sup>, la cual fue la mejor condición encontrada en cultivos lote. La fermentación con hidrolizados como medio de cultivo (**Figura 16**) se comportó ligeramente distinta a las obtenidas anteriormente.



**Figura 16.** Cinética correspondiente a la fermentación realizada en cultivos con hidrolizados de rastrojo de maíz suplementado. Se muestran los principales compuestos de interés (glucosa y xilosa) así como la cantidad de piruvato producida y otros compuestos presentes en el medio (acetato y arabinosa). Cinética realizada por triplicado. Los valores graficados son el promedio de las réplicas con su respectivo error experimental.

En este caso se observó que la glucosa fue metabolizada a una velocidad mucho mayor que la xilosa y aparentemente en este caso concreto sí se observó un fenómeno de represión catabólica en el que la glucosa es consumida en su totalidad y posteriormente la xilosa es utilizada como fuente de carbono. Asimismo, la cantidad máxima de piruvato incrementó sostenidamente durante las primeras 30 horas de la fermentación, sin embargo, a partir de las 35 horas -con la glucosa completamente consumida-, la cepa AV13 comenzó a metabolizar piruvato al igual que xilosa.

Dado que desconocemos los orígenes de dicha falta de represión catabólica observada en los cultivos lote y el fondo genético de la cepa AV13 no nos permite predecir dicha propiedad, por el momento no conocemos los mecanismos regulatorios que resultan en este fenómeno.

Sin embargo, conocemos que el fenómeno de represión catabólica glucosa y xilosa no se presenta en derivados de la cepa MS01 cepa parental de la AV13 ya que dicha cepa no puede consumir ambos azúcares simultáneamente, por lo que dicha represión se perdió antes de la interrupción de los genes *poxB* y *ack-pta* (Estefanía Sierra, comunicación personal) y también sabemos que los hidrolizados de rastrojo de maíz presentan muchos otros compuestos distintos a los presentes en el medio mineral. Compuestos como las moléculas fenólicas derivadas de la lignina que pueden afectar la integridad de la membrana, ácido acético que puede afectar el crecimiento y otros compuestos como furfurales, hidroximetilfurfurales y ácido fórmico que se sabe inhiben enzimas glucolíticas y fermentativas. Estos compuestos siguen presentes en el medio aún después de la detoxificación preparativa y consecuentemente pueden afectar a la cepa en su capacidad de metabolizar ambas fuentes de carbono simultáneamente debido a que los compuestos fenólicos pueden comprometer la integridad de la membrana y consecuentemente afectar el consumo de la fuente de carbono. Esto representa un problema ya que la xilosa se consume a la par del piruvato y podría dificultar gravemente su implementación como proceso industrial.

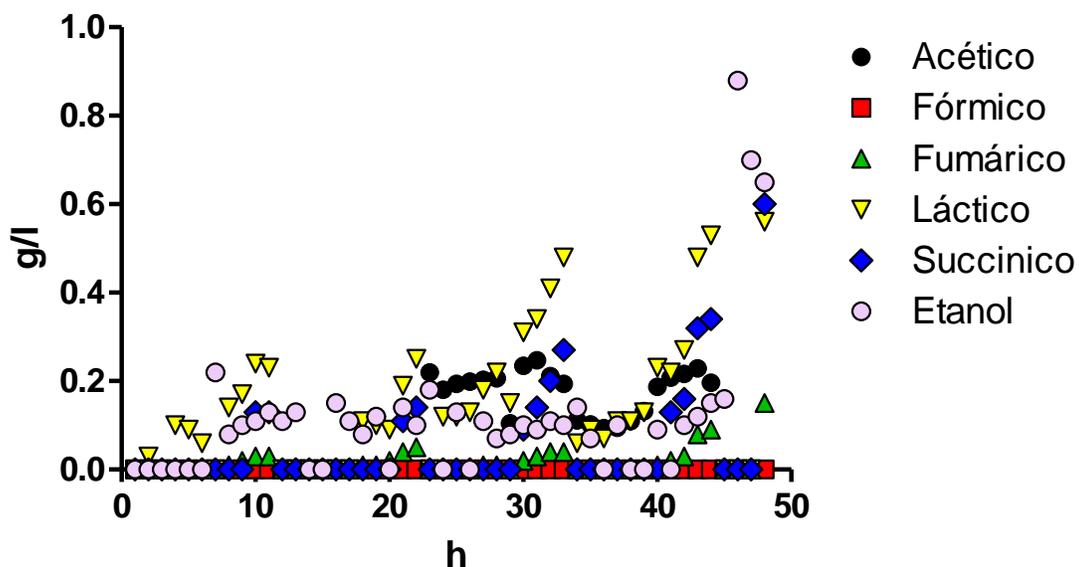
La concentración máxima de piruvato fue de ~22 g/L lo que representó un rendimiento producto sustrato de 36%, un valor mucho menor al obtenido en los cultivos con medio mineral. Lo anterior resultó de igual forma en una  $Q_p$  de 0.66 g/L h también mucho menor a las obtenidas. Dichos bajos rendimientos y productividades se derivaron del gran tiempo de fermentación (48 h) y el bajo consumo de sustrato. Sin embargo, la cepa AV13 demostró ser capaz de crecer en hidrolizados, los cuales contienen una gran cantidad de componentes, entre ellos inhibidores del crecimiento y aunque no se midió la DO en el cultivo sí se pudo observar una disminución en la tensión de oxígeno disuelto y se observó un visible incremento en la biomasa.

Es importante resaltar que, aunque las concentraciones de piruvato en el presente experimento fueron significativamente menores que los producidos en los cultivos lote con medio mineral, los resultados no son desalentadores puesto que se obtuvieron buenos resultados para tratarse de un medio tan complejo. Distintas estrategias de cultivo como una

mayor cantidad de inóculo inicial, la preadaptación del inóculo al hidrolizado y un estudio más profundo en las fermentaciones incluyendo la detoxificación completa del medio con la presente cepa en hidrolizados de rastrojo de maíz podrían mejorar tanto el consumo de hidratos de carbono, específicamente xilosa, así como aumentar las concentraciones máximas de producto.

### 7.9 El piruvato es el compuesto mayoritario en las fermentaciones realizadas

En los cultivos realizados en medio mineral, se observó que durante un proceso que acumula piruvato también se acumulan compuestos que se encuentran a pocos pasos metabólicos del piruvato (**Figura 17**). A pesar de que la producción de otros compuestos podría afectar directamente la producción de piruvato, los compuestos identificados fueron en todo caso mejores a 1 g/L siendo la mayoría menores a 0.5 g/L por lo que no se consideró un problema la presencia de dichos compuestos.



**Figura 17.** Identificación de otros compuestos obtenidos en las fermentaciones lote. Cultivo lote con un  $k_L a$   $145 \text{ h}^{-1}$ , medio mineral AM3x.

Debido a los datos obtenidos anteriormente, en específico los realizados en cultivo lote se puede observar que el piruvato producido puede ser consumido si se encuentra en concentraciones bajas de glucosa. Se observó que cuando el piruvato es consumido el flujo de carbono no es dirigido hacia la producción de biomasa y tampoco se perdió en forma de CO<sub>2</sub> como lo indican los balances de carbono. Esto plantea una incógnita ya que el carbono no se puede simplemente perder durante el proceso. Por dicha razón se realizaron experimentos en los que la bacteria consumió concentraciones conocidas de piruvato y se evaluó el medio resultante en HPLC para varios productos que se pensó pudieron ser formados de igual forma que se realizó anteriormente. Los resultados no arrojaron ningún producto que pudiéramos encontrar (acético, fórmico, ácido succínico, láctico, etc.).

Aunque no se encontró el producto que se cree que se forma con el consumo de ácido pirúvico, no se descarta la posibilidad de que sea un compuesto relevante. Sin embargo, los resultados derivados de la figura 17 indican la baja concentración de otros productos (distintos al piruvato) por lo que se permite establecer al piruvato como el producto mayoritario y muy por debajo otros compuestos por lo que la cepa AV13 presenta un fondo genético óptimo para la producción de piruvato.

## 8. Resumen de resultados

- El fondo genético de la cepa AV13 (*MG1665 ΔpfIB, ΔadhE, ΔfrdA, Δldh, ΔxylFGH, Δreg 27.3 kb, gatC S184L, Δmidarpa ΔmgsA ΔpoxB Δack-pta*) permite la producción y acumulación eficiente de piruvato en medio mineral AM1 (3x). La mejor condición probada para la producción de piruvato es cuando el  $k_{LA}$  corresponde a un valor  $145 \text{ h}^{-1}$ . Lo anterior resulta en una transferencia de oxígeno de  $7.95 \text{ mmolO}_2/\text{m}^3\text{s}$ , en la cual, en la fase de crecimiento exponencial, se obtiene una velocidad específica de consumo de glucosa equivalente a 5.5, 4.1 y 5.0  $\text{mmol}/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$  para glucosa, xilosa y la mezcla glucosa xilosa. La mayor productividad volumétrica de piruvato ( $2.47 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{l h}$ ) se obtuvo a un valor de  $k_{LA}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$ , mientras que a un  $k_{LA}$  de  $96.3 \pm 1.1 \text{ h}^{-1}$  fue de  $1.48 \pm 1.02 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{L h}$ , y a un  $k_{LA}$  mayor, de  $190 \text{ h}^{-1}$  la  $Q_p$  fue de  $2.51 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{l h}$ .
- El piruvato se produce tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria, aunque se produce mayor cantidad de piruvato en fase estacionaria ( $q_p$  fase exponencial correspondiente a  $\text{OTR } 7.95 \text{ mmolO}_2/\text{m}^3\text{s} = 0.31 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$  vs  $q_p$  fase estacionaria =  $0.47 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h}$ )
- La cepa AV13 es capaz de consumir piruvato como fuente de carbono una vez que se consume la fuente de carbono utilizada (glucosa, xilosa o mezcla de ambos).
- La mayor productividad volumétrica  $Q_p$  obtenida en cultivos lote fue a  $\text{OTR}$  de  $7.95 \text{ mmolO}_2/\text{m}^3$  o  $k_{LA}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  con  $2.40 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{L h}$ . En cultivos continuos los datos son menos concluyentes ya que la mayor  $Q_p$  obtenida fue a la dilución de  $0.3 \text{ h}^{-1}$  con  $2.8 \pm 0.1 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{l h}^{-1}$  pero se consume una pequeña parte del sustrato lo que supone un gasto de fuente de carbono no utilizada si se pretende escalar el proceso, así como una gran cantidad de azúcares contaminantes si se pretende purificar el piruvato. En cambio, en la dilución de  $0.075 \text{ h}^{-1}$  se obtuvo una  $Q_p$  de  $1.97 \pm 0.2 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{l h}$  y que, aunque menor en cantidad de piruvato, presenta una mayor fracción de azúcares consumidos.

- Condiciones de baja velocidad de transferencia de oxígeno en cultivos lote y continuos permiten una mayor producción de biomasa que su contraparte anaerobia y al mismo tiempo limitan la cantidad de biomasa producida en comparación con un cultivo aireado. Esto supone una gran ventaja, ya que existe una mayor eficiencia de producto con respecto al sustrato. La mayor cantidad de carbono se dirige al producto deseado en comparación con condiciones aerobias en donde la mayor fracción de carbono se dirige a la producción de biomasa. Así mismo una condición de limitación de transferencia de oxígeno permite aumentar parámetros como  $Q_p$  y otros rendimientos ya que la duración total de las cinéticas se ve disminuida en comparación con bajos  $k_{La}$ .
- Fue posible obtener una concentración de 120 g/L de piruvato a partir de un total de 148 g/L de glucosa en un cultivo tipo lote alimentado usando medio mineral AM3x con un pulso de nutrientes y sales.
- Los medios resultantes de la hidrólisis de material lignocelulósico, en específico de rastrojo de maíz, conforman un medio viable para el crecimiento celular de la cepa AV13, para el consumo de los hidratos de carbono presentes el medio y para la producción de piruvato. Sin embargo, la concentración máxima de piruvato alcanzada ( $22 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{L}$ ), el rendimiento producto sustrato (36%) y la productividad volumétrica ( $0.66 \text{ g}_{\text{pyr}}/\text{L h}$ ) son menores a las obtenidas en medios minerales.

## 9. Conclusiones

- Condiciones de limitación de oxígeno con un  $k_{La}$  de  $145 \text{ h}^{-1}$  favorece la velocidad volumétrica de producción de piruvato en cultivo lote con glucosa y/o xilosa como fuente de carbono con *E. coli* AV13.
- El piruvato es un metabolito parcialmente asociado a crecimiento en *E. coli* AV13, siendo su producción mayoritariamente en fase estacionaria.
- La cepa AV13 es capaz de consumir simultáneamente glucosa y xilosa en cultivo lote con medio mineral, probablemente debido a la interrupción que presenta en el gen *mgsA*.
- El piruvato puede ser utilizado como fuente de carbono a concentraciones bajas de glucosa por la cepa *E. coli* AV13 y generar un compuesto no identificado hasta el momento, supuesto derivado de los balances de carbono.
- La estrategia de cultivo continuo no constituye una buena opción para la producción de ácido pirúvico con la cepa AV13, debido a que se obtienen menores concentraciones de producto y rendimientos que lo obtenidos en los cultivos lote. Adicionalmente, dado que la cepa AV13 tiene la capacidad de metabolizar de forma simultánea xilosa y glucosa, probablemente por la eliminación del gene *mgsA*. La utilización del cultivo continuo no favoreció en gran medida el consumo simultaneo de glucosa y xilosa.
- La implementación del cultivo lote alimentado con un pulso de glucosa permitió aumentar la concentración de piruvato y llegar a las concentraciones más altas reportadas hasta el momento. No obstante, se disminuyó la productividad volumétrica de piruvato y la velocidad de consumo de glucosa después de la alimentación de glucosa.

- Es viable la utilización de hidrolizados de rastrojo de maíz para la producción de piruvato con la cepa AV13, aunque los datos obtenidos de productividad volumétrica, concentración máxima y rendimiento se mantienen por debajo de los obtenidos en cultivos con medio mineral debidos a la complejidad del hidrolizado y la baja cantidad de nutrientes agregados.

## 10. Perspectivas

A continuación, se presentan algunas propuestas que podrían solucionar algunos problemas encontrados a lo largo del presente estudio. También se proponen otras estrategias que podrían incrementar tanto la productividad, como las concentraciones máximas de producto.

- Interrumpir los genes *cstA* y *btsT* los cuales se encuentran involucrados en el consumo de piruvato. Al interrumpir dichos genes se propone que la cepa AV13 será incapaz de consumir piruvato como fuente de carbono, lo cual podría contribuir a incrementar la concentración máxima de piruvato producida bajo la estrategia de cultivos continuos. Específicamente a tasas de dilución menores a  $0.1 \text{ h}^{-1}$ .
- Mejorar la estrategia en cultivos con jarabes de hidrolizados obtenidos del maíz, mediante la evaluación de distintos métodos de detoxificación con el fin de disminuir la toxicidad de compuestos que afectan la generación de biomasa. Aumentar la cantidad de nutrientes, en específico fosfato con el fin de generar mayores cantidades de masa celular. Otra estrategia favorable sería inocular los hidrolizados con una mayor densidad celular inicial, p. ej. entre 0.5 a 1 DO, para reducir también la toxicidad y con esto aumentaría la productividad volumétrica.
- Identificar el compuesto hasta el momento desconocido que es producido por la cepa al consumir piruvato como fuente de carbono. Esto podrá explicar hacia donde se dirige el flujo del carbono en la cepa AV13.

- Medir los niveles de transcritos RT-PCR de los genes constituyentes del complejo PDH con el fin de entender el comportamiento del complejo tanto en condiciones aerobias, como en condiciones de limitación de transferencia de oxígeno y en las mejores condiciones encontradas.
- Incrementar la tolerancia de la cepa AV13 a piruvato mediante evolución metabólica. Utilizando cultivos con concentraciones cada vez más altas de piruvato y en presencia de glucosa para evitar el consumo de este se podría aumentar la tolerancia a altas concentraciones y así alcanzar mayores concentraciones de producto y a una mayor velocidad de síntesis.
- Implementar estrategias para la producción de otros productos a partir de piruvato tales como diacetilo, L-alanina, 2,3 butanediol, acetaldehído, etanol u otros compuestos producidos a partir de piruvato.
- Dado que la cepa AV13 es capaz de consumir xilosa eficientemente, se podría utilizar como organismo de pretratamiento en medios que contengan dicho carbohidrato y piruvato producido podría ser usado para cultivar otros microorganismos.
- Si la represión catabólica de xilosa en presencia de glucosa no se presenta debido a la mutación en el gen *mgsA* entonces no debe de ocurrir represión catabólica en otros azúcares como arabinosa, manosa, galactosa, etc. Así como fue reportado por Yomano, *et al.* 2009.

## 11. Referencias

1. Abdel-Hamid, A., Attwood, M., & Guest, J. (2001). Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 147(6), 1483-1498.
2. Akita, H., Nakashima, N., & Hoshino, T. (2016). Pyruvate production using engineered *Escherichia coli*. *AMB Express*, 6(1).
3. Álvarez, C., Reyes-Sosa, F., & Diez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial Biotechnology*, 9(2), 149-156.
4. Babitzke P, Romeo T (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* 10:156–163
5. Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San K-Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Metab Eng.* 2002;4:217–229.
6. Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J., & Gilles, E. (2007). Correlation between Growth Rates, EIICrr Phosphorylation, and Intracellular Cyclic AMP Levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal Of Bacteriology*, 189(19), 6891-6900.
7. Bratbak G, Dundas I. (1984) Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimations. *Appl Environ Microbiol* 48:755–757.
8. Bruckner, R., & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 141-148.
9. Causey, T., Shanmugam, K., Yomano, L., & Ingram, L. (2004). Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8), 2235-2240.
10. Cicalese, L., Lee, K., Schraut, W., Watkins, S., Borle, A., & Stanko, R. (1996). Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *The American Journal Of Surgery*, 171(1), 97-101.
11. Cicalese, L., Iyengar, A., Subbotin, V., Aitouche, A., Rastellini, C., Rao, A., & Stanko, R. (1997). Protection afforded by pyruvate during acute rejection of small-bowel allografts is mediated by inhibition of oxygen-free radicals and cytolytic activity (perforin and granzyme-B mRNA expression) in activated leukocytes. *Transplantation Proceedings*, 29(1-2), 704.
12. Crain, A., & Broderick, J. (2013). Pyruvate Formate-lyase and Its Activation by Pyruvate Formate-lyase Activating Enzyme. *Journal Of Biological Chemistry*, 289(9), 5723-5729.
13. DeBoer, L., Bekx, P., Han, L., & Steinke, L. (1993). Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *American Journal Of Physiology-Heart Andand Circulatory Physiology*, 265(5), H1571-H1576.

14. Decker K, Plumbridge J, Boos W (1998) Negative transcriptional regulation of a positive regulator: the expression of malT, encoding the transcriptional activator of the maltose regulon of Escherichia coli, is negatively controlled by Mlc. *Mol Microbiol* 27:381–390
15. Fernández Sandoval, M. (2012). Producción de etanol en presencia de acetato con Escherichia coli etanologénica en cultivos en lote y continuos utilizando mezclas glucosa-xilosa e hidrolizados de hemicelulosa (1st ed., p. 194). Cuernavaca: (Tesis).
16. Fernández-Sandoval, M., Galíndez-Mayer, J., Moss-Acosta, C., Gosset, G., & Martínez, A. (2016). Volumetric oxygen transfer coefficient as a means of improving volumetric ethanol productivity and a criterion for scaling up ethanol production with Escherichia coli. *Journal Of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(5), 981-989.
17. Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613-624. doi: 10.1038/nrmicro1932
18. Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613-624.
19. Grabar TB, Zhou S, Shanmugam KT, Yomano LP, Ingram LO (2006) Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L and D)-lactate fermentations by recombinant Escherichia coli. *Biotechnol Lett* 28:1527– 1535
20. Hardiman T, Lemuth K, Keller MA, Reuss M, SiemannHerzberg M (2007) Topology of the global regulatory network of carbon limitation in Escherichia coli. *J Biotechnol* 132:359–374
21. Hayashi, H., Shigemoto, N., Sugiyama, S., Masaoka, N., & Saitoh, K. (1993). X-ray photoelectron spectra for the oxidation state of TeO<sub>2</sub>-MoO<sub>3</sub> catalyst in the vapor-phase selective oxidation of ethyl lactate to pyruvate. *Catalysis Letters*, 19(2-3), 273-277.
22. Hayashi, H., Sugiyama, S., Shigemoto, N., Miyaura, K., Tsujino, S., Kawashiro, K., & Uemura, S. (1993). Formation of an intermetallic compound Pd<sub>3</sub>Te with deactivation of Te/Pd/C catalysts for selective oxidation of sodium lactate to pyruvate in aqueous phase. *Catalysis Letters*, 19(4), 369-373.
23. Hogema, B., Arents, J., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., & Takahashi, H. et al. (1998). Inducer exclusion in Escherichia coli by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Molecular Microbiology*, 30(3), 487-498.
24. Howard, J., & Fraser, W. (1932). Preparation of pyruvic acid. *Organic Syntheses*, 12(1), 475–480.
25. Hwang, S., Choe, D., Yoo, M., Cho, S., Kim, S., Cho, S., & Cho, B. (2018). Peptide Transporter CstA Imports Pyruvate in Escherichia coli K-12. *Journal Of Bacteriology*, 200(7).
26. Isikgor, F., & Becer, C. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497-4559.
27. Izumi, Y., Matsumura, Y., Tani, Y., & Yamada, H. (1982). Pyruvic acid production from 1,2-propanediol by thiamin-requiring Acinetobacter sp. 80-M. *Agricultural And Biological Chemistry*, 46(11), 2673-2679.

28. Kadam, K., Chin, C., & Brown, L. (2008). Flexible biorefinery for producing fermentation sugars, lignin and pulp from corn stover. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(5).
29. Kempes, C., van Bodegom, P., Wolpert, D., Libby, E., Amend, J., & Hoehler, T. (2017). Drivers of Bacterial Maintenance and Minimal Energy Requirements. *Frontiers Inin Microbiology*, 8.
30. Kimata K, Inada T, Tagami H, Aiba H (1998) A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the ptsG gene encoding major glucose transporter in Escherichia coli. *Mol Microbiol* 29:1509–1519
31. Klingenberg, P. (1987). G. Gottschalk: Bacterial Metabolism. 2. Aufl. 359 Seiten, 204 Abb. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1986. Preis: 98,—98, — DM. *Food / Nahrung*, 31(5-6), 448-448.
32. Kodaki, T., Murakami, H., Taguchi, M., Izui, K., & Katsuki, H. (1981). Stringent Control of Intermediary Metabolism in Escherichia coli: Pyruvate Excretion by Cells Grown on Succinate. *The Journal Of Biochemistry*, 90(5), 1437-1444.
33. Kornberg, H., & Smith, J. (1967). Genetic control of the uptake of pyruvate by Escherichia coli. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 148(2), 591-592.
34. Krahulec, S., Petschacher, B., Wallner, M., Longus, K., Klimacek, M., & Nidetzky, B. (2010). Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of Saccharomyces cerevisiae: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 16.
35. Kristoficova, I., Vilhena, C., Behr, S., & Jung, K. (2017). BtsT, a Novel and Specific Pyruvate/H<sup>+</sup> Symporter in Escherichia coli. *Journal Of Bacteriology*, 200(2).
36. Li, Y., Chen, J., Lun, S., & Rui, X. (2001). Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of Torulopsis glabrata :glabrata: key role and optimization of vitamin levels. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 55(6), 680-685.
37. Martinez, A., Grabar, T., Shanmugam, K., Yomano, L., York, S., & Ingram, L. (2006). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant Escherichia coli B. *Biotechnology Letters*, 29(3), 397-404.
38. Mat-Jan, F., Alam, K., & Clark, D. (1989). Mutants of Escherichia coli deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *Journal Of Bacteriology*, 171(1), 342-348.
39. Matsumoto, T., Tanaka, T., & Kondo, A. (2017). Engineering metabolic pathways in Escherichia coli for constructing a “microbial chassis” for biochemical production. *Bioresource Technology*, 245, 1362-1368.
40. Monod J (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Rev Microbiol* 3:371–394.
41. Monod, J. Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes. Thesis, Hermann et Cie, Paris (1942).

42. Moskowitz, A., Andersen, L., Huang, D., Berg, K., Grossestreuer, A., & Marik, P. et al. (2018). Ascorbic acid, corticosteroids, and thiamine in sepsis: a review of the biologic rationale and the present state of clinical evaluation. *Critical Care*, 22(1).
43. Murarka, A., Clomburg, J., Moran, S., Shanks, J., & Gonzalez, R. (2010). Metabolic Analysis of Wild-type *Escherichia coli* and a Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDHC)-deficient Derivative Reveals the Role of PDHC in the Fermentative Metabolism of Glucose. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(41), 31548-31558.
44. Nakazawa, H., Enei, H., Okumura, S., & Yamada, H. (1972). Synthesis of Tryptophan from Pyruvate, Ammonia and Indole. *Agricultural And Biological Chemistry*, 36(13), 2523-2528.
45. Neijssel, O. M., Teixeira de Mattos, M. J. y Tempest D.W. 1996. Growth yield and energy distribution. American Society for Microbiology Press Washington D.C. 2: 1683-692.
46. New, A., Cerulus, B., Govers, S., Perez-Samper, G., Zhu, B., & Boogmans, S. et al. (2014). Different Levels of Catabolite Repression Optimize Growth in Stable and Variable Environments. *Plos Biology*, 12(1), e1001764.
47. Stanko, R., Ferguson, T., Newman, C., & Newman, R. (1989). Reduction of Carcass Fat in Swine with Dietary Addition of Dihydroxyacetone and Pyruvate. *Journal Of Animal Science*, 67(5), 1272.
48. Thornalley, P. (2008). Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. *Drug Metabolism And Drug Interactions*, 23(1-2).
49. Tomar, A., Eiteman, M., & Altman, E. (2003). The effect of acetate pathway mutations on the production of pyruvate in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1), 76-82.
50. Totemeyer S, Booth NA, Nichols WW, Dunbar B, Booth IR (1998) From famine to feast: the role of methylglyoxal production in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 27:553– 562
51. Tribe, L., Briens, C. and Margaritis, A. (1995). Determination of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) using the dynamic gas out-gas in method: Analysis of errors caused by dissolved oxygen probes. *Biotechnology and Bioengineering*, 46(4), pp.388-392.
52. Utrilla, J., Vargas-Tah, A., Trujillo-Martínez, B., Gosset, G., & 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.
53. Vargas-Tah, A., Moss-Acosta, C., Trujillo-Martínez, B., Tiessen, A., Lozoya-Gloria, E., & Orencio-Trejo, M. et al. (2015). Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol. *Bioresource Technology*, 198, 611-618.
54. Wang, H., Squina, F., Segato, F., Mort, A., Lee, D., Pappan, K., & Prade, R. (2011). High-Temperature Enzymatic Breakdown of Cellulose. *Applied And Environmental Microbiology*, 77(15), 5199-5206.

55. Xu, N., Ye, C., Chen, X., Liu, J., Liu, L., & Chen, J. (2016). Genome Sequencing of the Pyruvate-producing Strain *Candida glabrata* CCTCC M202019 and Genomic Comparison with Strain CBS138. *Scientific Reports*, 6(1).
56. Yokota, A., & Takao, S. (1984). Conversion of pyruvic acid fermentation to tryptophan production by the combination of pyruvic acid-producing microorganisms and *Enterobacter aerogenes* having high tryptophanase activity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(11), 2663-2668.
57. Yokota, A., & Takao, S. (1989). Pyruvic acid production by lipoic acid auxotrophs of *Enterobacter aerogenes*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(3), 705-711.
58. Yokota, A., Shimizu, H., Terasawa, Y., Takaoka, N., & Tomita, F. (1994). Pyruvic acid production by a lipoic acid auxotroph of *Escherichia coli* W1485. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(6), 638-643.
59. Yomano, L., York, S., Shanmugam, K., & Ingram, L. (2009). Deletion of methylglyoxal synthase gene (*mgsA*) increased sugar co-metabolism in ethanol-producing *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 31(9), 1389-1398
60. Yonehara, T., & Miyata, R. (1994). Fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(2), 155-159.
61. Zaldivar, J., & Ingram, L. (1999). Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*, 66(4), 203-210.
62. Zhu MM, Skraly FA, Cameron DC (2001) Accumulation of methylglyoxal in anaerobically grown *Escherichia coli* and its detoxification by expression of the *Pseudomonas putida* glyoxylase I gene. *Metab Eng* 3:218–225
63. Zhu, Y., Eiteman, M., Altman, R., & Altman, E. (2008). High glycolytic flux improves pyruvate production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6649