



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INGENIERÍA METABÓLICA EN *Escherichia coli* PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL
E HIDRÓGENO A PARTIR DE GLICEROL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
IBQ. AZERET RODRÍGUEZ MALDONADO

TUTOR PRINCIPAL
ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
CINTHIA ERNESTINA NÚÑEZ LÓPEZ
[Instituto de Biotecnología](#)
ROBERTO OLIVARES HERNÁNDEZ
[Universidad Autónoma Metropolitana](#)

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2024



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.

MIEMBROS DEL JURADO ASIGNADO

| | |
|-------------------|--|
| PRESIDENTA | DRA. MARCELA AYALA ACEVES |
| SECRETARIO | DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO |
| VOCAL | DRA. GLORIA SAAB RINCÓN |
| VOCAL | DR. JUAN CARLOS SIGALA ALANÍS |
| VOCAL | DRA. ADRIANA MARGARITA LONGORIA HERNÁNDEZ |

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD:

Para determinar el grado de similitud con otros documentos y reportes de tesis, este reporte de tesis fue revisado mediante el sistema iThenticate por la B.A, Dip. Lib. Shirley Ainsworth Gore, responsable de la Unidad de Biblioteca del Instituto de Biotecnología-UNAM. Para el análisis se excluyó la bibliografía, fuentes citadas, similitudes de 25 palabras o menos. El reporte indica una similitud del 0% de la tesis con otros documentos. El grado de similitud de texto es responsabilidad de la postulante al grado de Maestría en Ciencias y del director de la tesis.

La presente tesis 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 (UNAM). Para la realización de este trabajo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) a través del proyecto CF-2023-I-1116 y de la UNAM, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA IV100119.

Los Estudios de Maestría se realizaron gracias a la beca otorgada a Azeret Rodríguez Maldonado por el CONAHCyT: 2021-000018-02NACF.

Agradecimientos

Al Dr. Alfredo Martínez por haberme aceptado en su grupo de trabajo y abrirme las puertas del laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas para que pudiera aprender de este proyecto de tesis y de mis compañeros. Le agradezco el apoyo brindado para mi desarrollo profesional, sus críticas hacia mi trabajo, sus consejos y enseñanzas tanto académicas como personales.

Al comité tutorial, la Dra. Cinthia Núñez y el Dr. Roberto Olivares, por sus observaciones y aportaciones para el desarrollo de este trabajo. Gracias por sus palabras de aliento y motivación.

Al Dr. Luis Caspeta por sus preguntas difíciles, sus ideas y asesoría para llevar a cabo los experimentos desarrollados en este trabajo, así como para el análisis de resultados. Gracias por su apoyo en mi desarrollo personal y académico.

Al personal técnico del laboratorio. Gracias Georgina Hernández por apoyarme en el uso del HPLC para el análisis de los metabolitos y por motivarme con tus palabras que me alegraban los días. Gracias Luz María Martínez por tu experiencia en las técnicas de Biología Molecular. Gracias Manuel y Aure, por todo el apoyo con los materiales y reactivos, así como sus pláticas para hacer el día más ameno. Muchas gracias, Rubí, que sin ti el laboratorio no funcionaría.

A todos los integrantes del consorcio, gracias por sus comentarios y aportaciones en los seminarios, así como por hacer un espacio de trabajo agradable y productivo. En especial gracias a Eliseo, Gilberto y Omar por enseñarme lo que necesitaba para el desarrollo de los distintos experimentos y gracias por las tomas de muestra en la madrugada.

Al Instituto de Biotecnología por brindarme un espacio para desarrollarme personal y profesionalmente, gracias a los maestros que me dieron clases y al personal administrativo por apoyarme con los trámites.

Al CONAHCyT por el recurso económico que hizo posible este trabajo.

Dedicatoria

Mamá y papá, este trabajo es para ustedes. Ustedes son mi más grande inspiración y mi mayor motivación, gracias por apoyarme en todas mis decisiones, por enseñarme el valor de la vida y aprender a disfrutarla. Los amo con todo mi ser.

A mi hermana Morelia, por ser mi mayor cómplice en las buenas y en las malas desde que éramos niñas. Nunca dejes de hacerme reír y enojar.

A mi hermano Paquito, por darle tanta luz a mi vida. Mi aspiración más grande no es otra más que ser el mejor ejemplo para ti y para mi More.

A mi mejor amiga Jime, por siempre ser y estar, aún a la distancia y viviendo en ciudades distintas cumpliendo nuestros sueños.

A mis amigos y compañeros de laboratorio (Fer, Gil, Eli, Omar, Estefa, Mariana, Angélica y Nadia) por sus muestras de apoyo, su ayuda y sus consejos tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por haberme enseñado e inspirarme a ser mejor persona y estudiante.

A mis amigas del laboratorio adjunto, Sol y Kary. Gracias por tantas risas, momentos divertidos, consejos, cafecitos y el ride después del concierto de Taylor Swift.

A mis amigos de la generación, Maura, Emmi y mi Manuel que, aunque primero nos conocimos virtualmente poco a poco se convirtieron en mi familia.

A todos mis amigos corredores por tantos kilómetros compartidos los domingos y todas sus porras durante las carreras.

Contenido

| | |
|--|----|
| Resumen | 13 |
| Abstract..... | 14 |
| 1. Introducción..... | 15 |
| 2. Antecedentes..... | 17 |
| 2.1 Fuentes de energía sustentables | 17 |
| 2.1.1 Bioetanol..... | 17 |
| 2.1.2 Hidrógeno | 19 |
| 2.2 Glicerol..... | 19 |
| 2.2.1 Glicerol puro | 20 |
| 2.2.2 Glicerol como fuente de carbono | 21 |
| 2.3 Metabolismo de <i>Escherichia coli</i> | 22 |
| 2.3.1 Metabolismo de glicerol en <i>E. coli</i> | 22 |
| 2.4 Ingeniería metabólica en <i>E. coli</i> | 25 |
| 2.5 Estrategia propuesta..... | 27 |
| 3. Hipótesis..... | 28 |
| 4. Objetivos..... | 28 |
| 4.1 Objetivo general..... | 28 |
| 4.2 Objetivos particulares | 28 |
| 5. Metodología..... | 29 |
| 5.1 Estrategia experimental..... | 29 |
| 5.2 Cepas, plásmidos, oligonucleótidos y técnicas de biología molecular utilizadas | 29 |
| 5.2.1 Eliminación de los genes del cromosoma de <i>E. coli</i> mediante transducción por fagos. | 31 |
| 5.2.2 Escisión cromosomal del gen de resistencia a kanamicina flanqueado por los sitios FRT | 33 |
| 5.2.3 Sobreexpresión de <i>gldA</i> y <i>dhaK</i> | 34 |
| 5.2.4 Eliminación del gen <i>dhaK</i> de <i>E. coli</i> e integración de <i>dhaK</i> de <i>Klebsiella oxytoca</i> por recombinación homóloga | 34 |
| 5.3 Evaluación en minifermentadores de las cepas <i>E. coli</i> MG1655 y mutantes obtenidas | 36 |
| 5.3.1 Obtención del preinóculo e inóculo..... | 36 |
| 5.3.2 Cultivo en minifermentadores de evaluación..... | 37 |
| 5.4 Métodos analíticos..... | 37 |
| 5.4.1 Determinación de la concentración de biomasa | 37 |
| 5.4.2 Cuantificación de sustratos y productos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | 38 |
| 5.4.3 Determinación de CO ₂ y H ₂ por balance estequiométrico..... | 38 |
| 5.5 Parámetros cinéticos y estequiométricos..... | 38 |
| 5.5.1 Velocidad específica de crecimiento (μ)..... | 39 |
| 5.5.2 Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$) | 39 |
| 5.5.3 Rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$) | 39 |
| 5.5.4 Consumo volumétrico de glicerol (Q_S)..... | 39 |
| 5.6 Determinación de actividad enzimática de DhaK..... | 40 |
| 5.6.1 Obtención de extracto celular | 40 |
| 5.6.2 Ensayo de actividad enzimática | 40 |
| 5.7 Modelamiento a escala genómica | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 6. | Resultados y discusión | 42 |
| 6.1 | Crecimiento de <i>E. coli</i> MG1655 y generación de productos de fermentación utilizando glicerol como fuente de carbono | 42 |
| 6.2 | Construcción y evaluación de las cepas mutantes obtenidas | 47 |
| 6.2.1 | Eliminación del gen <i>pta</i> en <i>E. coli</i> MG1655..... | 47 |
| 6.2.2 | Eliminación del gen <i>frdA</i> en <i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>pta</i> | 48 |
| 6.2.3 | Crecimiento y productos de fermentación por las cepas <i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>pta</i> y MG1655 Δ <i>pta</i> Δ <i>frdA</i> utilizando glicerol..... | 50 |
| 6.2.4 | Eliminación del gen <i>ldhA</i> del cromosoma de <i>E. coli</i> para reducir la producción de lactato | 55 |
| 6.2.5 | Crecimiento y productos de fermentación de la cepa MG1655 Δ <i>pta</i> Δ <i>frdA</i> Δ <i>ldhA</i> utilizando glicerol | 57 |
| 6.3 | Evaluación de cepas expresando <i>gldA</i> y <i>dhaKML</i> en vector | 59 |
| 6.3.1 | Comprobación de vectores pZS <i>blank</i> , pZS <i>gldA</i> y pZSKLM <i>gldA</i> por enzimas de restricción | 60 |
| 6.3.2 | Evaluación de cepas transformadas con plásmido pZSKLM <i>gldA</i> | 61 |
| 6.4 | Evaluación de la cepa <i>E. coli</i> SY03..... | 65 |
| 6.4.1 | Comprobación de fondo genético de la cepa SY03 | 67 |
| 6.5 | Construcción de un vector conteniendo el gen <i>dhaK</i> de <i>K. oxytoca</i> para reemplazar la enzima dihidroxiacetona cinasa nativa de <i>E. coli</i> | 68 |
| 6.5.1 | Eliminación del gen <i>dhaK</i> del cromosoma de <i>E. coli</i> | 69 |
| 6.5.2 | Comprobación de vector pLoxGentrc | 70 |
| 6.5.3 | Clonación del gen <i>dhaK</i> de <i>Klebsiella oxytoca</i> en pLoxGentrc..... | 71 |
| 6.5.4 | Integración del gen <i>dhaK</i> en el cromosoma de <i>E. coli</i> | 73 |
| 6.5.5 | Evaluación del gen <i>dhaK</i> de <i>K. oxytoca</i> en vector y cromosomalmente en la cepa 4M..... | 75 |
| 6.5.6 | Ensayo en microplaca a diferentes concentraciones de IPTG | 78 |
| 6.6 | Evaluación de la actividad de la enzima DhaK de <i>E. coli</i> y de <i>K. oxytoca</i> expresada en la cepa 4M..... | 79 |
| 6.7 | Generación de cepa carente de la vía aerobia del consumo de glicerol | 80 |
| 6.8 | Ensayo en microplaca a diferentes concentraciones de triptona..... | 83 |
| 6.9 | Comparación de mutantes obtenidas de <i>E. coli</i> | 85 |
| 6.10 | Modelamiento a escala genómica | 86 |
| 7. | Conclusiones | 91 |
| 8. | Perspectivas | 93 |
| 9. | Bibliografía | 95 |
| 10. | Anexos..... | 99 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura química del etanol | 18 |
| Figura 2. Estructura química del glicerol..... | 20 |
| Figura 3. Usos industriales del glicerol refinado..... | 21 |
| Figura 4. Metabolismo de <i>E. coli</i> utilizando glicerol como fuente de carbono (esquema realizado por la autora de la tesis). | 23 |
| Figura 5. Metabolismo de <i>E. coli</i> MG1655 después de las modificaciones genéticas planteadas en el presente proyecto. | 27 |
| Figura 6. Estrategia experimental..... | 29 |
| Figura 7. Esquema de clonación circular por extensión de la polimerasa. | 35 |
| Figura 8. Cinética de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> MG1655..... | 42 |
| Figura 9. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de <i>E. coli</i> MG1655..... | 44 |
| Figura 10. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen <i>pta</i> en la cepa <i>E. coli</i> MG1655. | 48 |
| Figura 11. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen <i>frdA</i> en la cepa 1M. | 49 |
| Figura 12. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del casete de kanamicina de la cepa 2M. | 50 |
| Figura 13. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, 1M y 2M sin generación de preinóculo. | 51 |
| Figura 14. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, 1M y 2M a partir de preinóculo. | 52 |
| Figura 15. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa 1M. | 53 |
| Figura 16. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa 2M. | 55 |
| Figura 17. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen <i>ldhA</i> y las eliminaciones previas en la cepa 3M. | 56 |
| Figura 18. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del casete de kanamicina en la cepa 3M. | 57 |
| Figura 19. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, 1M, 2M y 3M. | 58 |
| Figura 20. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa 3M. | 59 |
| Figura 21. Gel de electroforesis para la comprobación de los vectores <i>pZSblank</i> y <i>pZSgldA</i> utilizando enzimas de restricción..... | 60 |
| Figura 22. Gel de electroforesis para la comprobación del vector <i>pZSKLMgldA</i> utilizando enzimas de restricción..... | 61 |
| Figura 23. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, silvestre con <i>pZSKLMgldA</i> , 3M y 3M con <i>pZSKLMgldA</i> | 63 |
| Figura 24. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa a) MG1655 <i>pZSKLMgldA</i> y b) 3M <i>pZSKLMgldA</i> | 64 |
| Figura 25. Cinética de crecimiento de las cepas 2M, SY03 y SY03 <i>pZSKLMgldA</i> | 65 |
| Figura 26. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa a) SY03 y b) SY03 <i>pZSKLMgldA</i> | 67 |
| Figura 27. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación del fondo genético de la cepa SY03..... | 68 |
| Figura 28. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen <i>dhaK</i> y las eliminaciones previas en la cepa 4M. | 70 |

| | |
|--|----|
| Figura 29. Gel de electroforesis para la comprobación del vector pLoxGentrc utilizando enzimas de restricción..... | 71 |
| Figura 30. Gel de electroforesis para la comprobación del vector pLoxGentrc linearizado y del inserto dhaK amplificado de <i>K. oxytoca</i> | 72 |
| Figura 31. Gel de electroforesis para la comprobación del vector ploxGentrcdhaK por patrón de digestión utilizando la enzima de restricción PstI. | 73 |
| Figura 32. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación del fragmento amplificado que contiene el gen <i>dhaK</i> y el casete de gentamicina..... | 73 |
| Figura 33. Caja Petri con las colonias obtenidas de la cepa 4M transformada con el gen <i>dhaK</i> de <i>K. oxytoca</i> después de 24 horas..... | 74 |
| Figura 34. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la cepa 4M <i>lacZ::dhaK</i> | 75 |
| Figura 35. Cinética de crecimiento de las cepas 3M, 4M, 4M <i>lacZ::dhaK</i> y 4M pLoxGentrcdhaK. | 76 |
| Figura 36. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de las cepas 4M, 4M <i>lacZ::dhaK</i> y c) 4M pLoxGentrdhaK. | 78 |
| Figura 37. Diagrama de barras comparando las concentraciones de inducción con IPTG en las cepas 4M <i>lacZ::dhaK</i> y 4M ploxGentrcdhaK | 79 |
| Figura 38. Comparación de la actividad de la enzima DhaK de <i>E. coli</i> y de <i>K. oxytoca</i> | 80 |
| Figura 39. Gel de electroforesis para la comprobación del producto amplificado del casete de kanamicina de la cepa de Keio Δ <i>glpK</i> | 81 |
| Figura 40. Gel de electroforesis para la comprobación de la cepa 5M..... | 82 |
| Figura 41. Cinética de crecimiento de las cepas 4M y 5M..... | 82 |
| Figura 42. Consumo de glicerol de la cepa 5M..... | 83 |
| Figura 43. Diagrama de barras comparando la μ en las cepas silvestre y 3M pZSKLM <i>gldA</i> a diferentes concentraciones de triptona en el medio..... | 84 |
| Figura 44. Esquema del metabolismo de <i>E. coli</i> mostrando el porcentaje de flujo de carbono de cada reacción en las cepas silvestre (MG1655), 2M y 3M pZSKLM <i>gldA</i> | 87 |
| Figura 45. Esquema del metabolismo de <i>E. coli</i> con los cocientes del flujo utilizando <i>dhaK</i> de <i>K. oxytoca</i> entre <i>dhaK</i> nativo de <i>E. coli</i> | 89 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Principales productos de fermentación a partir de glucosa y glicerol | 25 |
| Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo | 30 |
| Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo | 30 |
| Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo | 31 |
| Tabla 5. Preparación de fagos con las células | 32 |
| Tabla 6. Condiciones de reacción para la construcción de pLoxGentrcdhaK | 72 |
| Tabla 7. Comparación de la actividad enzimática entre DhaK de <i>E. coli</i> y de <i>K. oxytoca</i> | 80 |
| Tabla 8. Parámetros estequiométricos de las mutantes generadas en este trabajo | 85 |

Abreviaturas

| | |
|---------------------|--|
| <i>aceE</i> | Componente 1 de la Piruvato deshidrogenasa |
| Acetil-CoA | Acetil Coenzima A |
| <i>ackA</i> | Acetato cinasa |
| <i>adhE</i> | Alcohol deshidrogenasa |
| ADP | Adenosín difosfato |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DCW | Peso celular seco (por sus siglas en inglés) |
| DHA | Dihidroxiacetona |
| <i>dhaK</i> | Dihidroxiacetona cinasa |
| DHAP | Dihidroxiacetona fosfato |
| <i>fdoG</i> | Formiato deshidrogenasa |
| <i>fhl</i> | Formiato-hidrógeno liasa |
| <i>frdABC</i> | Fumarato reductasa |
| <i>fumAB</i> | Fumarasa |
| G3P | Glicerol 3-fosfato |
| <i>gldA</i> | Glicerol deshidrogenasa |
| <i>glpABC</i> | Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (anaeróbica) |
| <i>glpD</i> | Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (aeróbica) |
| <i>glpK</i> | Glicerol cinasa |
| H ₂ | Hidrógeno |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| <i>hyaABC</i> | Hidrogenasa |
| <i>hybC</i> | Hidrogenasa |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido |
| <i>ldhA</i> | Lactato deshidrogenasa |
| <i>mdh</i> | Malato deshidrogenasa |
| OD _{600nm} | Densidad óptica a 600 nanómetros |
| <i>pckA</i> | Fosfoenolpiruvato carboxicinasa |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEP | Fosfoenolpiruvato |
| <i>pflB</i> | Piruvato formiato liasa |
| <i>pta</i> | Acetiltransferasa fosfato |
| <i>pykA</i> | Piruvato cinasa |
| <i>pyrE</i> | Orotato fosforribosiltransferasa |
| QH ₂ | Quinona reducida |

*En cursivas se presentan los genes que codifican para las enzimas indicadas (escritos en minúsculas las primeras tres letras y las últimas en mayúsculas).

Resumen

La producción biológica de productos de interés industrial y biotecnológico requiere una fuente de carbono accesible y económica. El glicerol, además de estar disponible y tener un precio bajo, se encuentra en un estado más reducido en comparación con la glucosa o la xilosa, por lo tanto, el metabolismo del glicerol a piruvato genera el doble de equivalentes reductores ($\text{NADH} + \text{H}^+$) en comparación con los azúcares. En este estudio, se modificó genéticamente a *Escherichia coli* MG1655 para producir etanol e hidrógeno utilizando glicerol (10 g/L) como fuente de carbono, en condiciones sin aireación, a 37°C durante 72 horas en fermentadores con pH controlado a 6.3. Para equilibrar la generación de $\text{NADH} + \text{H}^+$, la cepa de *E. coli* MG1655 tipo silvestre produjo etanol (2.34 g/L), formiato (1.25 g/L), acetato (0.53 g/L), succinato (0.56 g/L) e H_2 (0.07 g/L), consumiendo 6.86 g/L de glicerol con una velocidad de crecimiento específica (μ) de 0.086 h^{-1} . Se construyó una doble mutante, la cepa *E. coli* 2M (MG1655 $\Delta\text{pta} \Delta\text{frdA}$), con el objetivo de reducir la producción de acetato y succinato. La cepa de *E. coli* 2M consumió 5.76 g/L de glicerol con una μ de 0.090 h^{-1} . Sin embargo, como respuesta metabólica a la producción de $\text{NADH} + \text{H}^+$ produjo lactato como el principal producto de fermentación (2.98 g/L). Por lo tanto, se generó la cepa 3M (2M ΔldhA) para evitar la producción de lactato. En comparación con las cepas 2M y WT, la cepa 3M consumió glicerol a una tasa baja, metabolizando solo 2.87 g/L de glicerol con una μ de 0.108 h^{-1} en 72 h. Los productos de fermentación de la cepa 3M fueron pequeñas cantidades de etanol, formiato, H_2 y CO_2 , sin producción de acetato, succinato o lactato. Para mejorar el consumo de glicerol, la cepa 3M se transformó con el plásmido pZSKLM*gldA*, que contiene una copia de los genes *gldA* (glicerol deshidrogenasa) y *dhaKLM* (dihidroxiacetona quinasa), consumiendo 7.34 g/L de glicerol con una μ de 0.149 h^{-1} y, para equilibrar la generación de $\text{NADH} + \text{H}^+$, produjo etanol (3.53 g/L), formiato (1.39 g/L), H_2 (0.10 g/L) y CO_2 (2.19 g/L) con solo 0.645 g/L de biomasa celular. Otra estrategia que se implementó para mejorar el consumo de glicerol fue la sustitución de la enzima *dhaKLM* nativa de *E. coli* por la de *K. oxytoca*, la cual utiliza ATP como donador del grupo fosfato en vez de PEP, con la intención de generar un mayor flujo hacia la producción de metabolitos de interés. Finalmente, las mutantes generadas se evaluaron utilizando el modelo a escala genómica iJO1366.

Abstract

The biological production of biochemical commodities requires an accessible and inexpensive carbon source. Glycerol, in addition to its availability and low price, is more reduced compared to glucose or xylose, therefore metabolism from glycerol to pyruvate generates twice reducing equivalents (NADH + H⁺) compared to sugars. In this study the *Escherichia coli* strain MG1655 was engineered and evaluated to produce ethanol and hydrogen using glycerol (10 g/L) as the carbon source, at non-aerated conditions, 37°C during 72 h in fermenters with pH controlled to 6.3. To balance NADH + H⁺ generation, the wild type *E. coli* MG1655 produced ethanol (2.34 g/L), formate (1.25 g/L), acetate (0.53 g/L), succinate (0.56 g/L) and hydrogen (0.07 g/L), consuming 6.86 g/L of glycerol with a specific growth rate (μ) of 0.086 h⁻¹. A double mutant, the *E. coli* strain 2M (MG1655 Δ *pta* Δ *frdA*), aimed to reduce acetate and succinate production, was constructed. The strain 2M consumed 5.76 g/L of glycerol with a μ of 0.090 h⁻¹. However, as a metabolic response to NADH + H⁺ production, the strain 2M produced lactate as the main fermentation product (2.98 g/L). Hence, the strain 3M (2M Δ *ldhA*) was generated to avoid lactate production. Compared to strains 2M and WT, the strain 3M consumed glycerol at a low rate, metabolizing only 2.87 g/L of glycerol with a μ of 0.108 h⁻¹ in 72 h. The strain 3M fermentation products were minor amounts of ethanol, formate, hydrogen, and carbon dioxide, without acetate, succinate, or lactate production. The plasmid pZSKLM*gldA*, which contains a copy of *gldA* (glycerol dehydrogenase) and *dhaKLM* (dihydroxyacetone kinase) genes was transformed into the strain 3M to increase glycerol consumption. The *E. coli* strain 3M / pZSKLM*gldA* consumed 7.34 g/L of glycerol with a μ of 0.149 h⁻¹ and, to balance NADH + H⁺ generation, produced ethanol (3.53 g/L), formate (1.39 g/L), hydrogen (0.10 g/L) and CO₂ (2.19 g/L) with only 0.645 g/L of cell biomass. Another strategy implemented to improve glycerol consumption was the replacement of the native *dhaKLM* operon in *E. coli* with that from *K. oxytoca*, which utilizes ATP as the phosphate donor instead of PEP, this substitution aimed to generate a higher flux towards the production of desired metabolites as well as increasing glycerol consumption. Finally, the generated mutants were evaluated using the genome-scale model iJO1366.

1. Introducción

Actualmente, las actividades cotidianas dependen en gran medida de los combustibles fósiles. Sin embargo, en los últimos años ha surgido la necesidad de fuentes de energía amigables con el ambiente y de bajo costo económico, ya que como sabemos el precio del petróleo ha incrementado debido a su escasez. Por otro lado, en los últimos años la producción de glicerol ha aumentado drásticamente al ser un subproducto de la industria del biodiésel, el cual se ha consolidado mundialmente en el mercado como una fuente de energía sustentable. La alta producción de biodiésel ha provocado un excedente de glicerol y por lo tanto decrementos en su precio (Tan *et al.*, 2013). En 2016 la producción mundial de glicerol fue de aproximadamente 3.2 millones de toneladas (Ciani, 2019). Además de su disponibilidad y su precio, el glicerol es una molécula más reducida que los azúcares comunes (glucosa, sacarosa y lactosa, entre otros) y los azúcares mayoritarios obtenidos de la hidrólisis de la lignocelulosa (la glucosa y xilosa), lo que convierte al glicerol en una fuente de carbono deseable en procesos fermentativos, ya que favorece la obtención de compuestos reducidos con mayores rendimientos (Dharmadi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016).

El bioetanol y el biohidrógeno son productos obtenidos de procesos fermentativos con distintas aplicaciones biotecnológicas. Ambos compuestos son fuentes de energía renovables capaces de reemplazar a los combustibles fósiles en procesos de transporte y de generación de energía eléctrica. La quema y utilización de estos últimos emiten gases de efecto invernadero en distintos procesos indispensables para el estilo de vida humano, donde también representan un recurso limitado en nuestro planeta (Srivastav *et al.*, 2014). El bioetanol es utilizado como biocombustible en diversos países, siendo Brasil y Estados Unidos los principales productores (Maeda *et al.*, 2007; Shanmugam e Ingram, 2021). Sin embargo, la mayor producción de bioetanol es a partir de alimentos como el maíz, el azúcar de caña y el trigo, lo cual no es conveniente ya que esos alimentos los requerimos para nuestro consumo. Por otro lado, la mayor producción de H₂ se da por diferentes procesos que representan un costo muy elevado. Debido a lo anterior, se requieren nuevas estrategias en la producción de estos compuestos.

En ese sentido, la ingeniería de vías metabólicas ha sido utilizada para mejorar los procesos fermentativos con el objetivo de obtener una mayor producción de los compuestos deseados. *Escherichia coli* es un microorganismo ampliamente utilizado en ingeniería metabólica debido a su fondo genético manipulable y rápido crecimiento en diferentes condiciones. *E. coli* es considerada como la especie bacteriana modelo para investigación y aplicaciones industriales (Pontrelli *et al.*, 2018). La producción de etanol e H₂ forma parte del metabolismo ácido mixto de *E. coli* en condiciones anaerobias, aunque también genera otros productos de fermentación como acetato, lactato, formiato, succinato y 1,3-propanediol.

En este trabajo se pretende construir una mutante capaz de catabolizar la fuente de carbono (glicerol) y producir de manera heterofermentativa etanol, H₂ y CO₂ en cantidades equimolares. Para lo anterior se partirá de la cepa de *E. coli* MG1655, a la cual se le sobreexpresarán genes que codifican para enzimas que dirijan la fuente de carbono hacia los metabolitos de interés y se eliminarán aquellos que desvíen la fuente de carbono a productos no deseados haciendo uso de herramientas de ingeniería metabólica.

2. Antecedentes

2.1 Fuentes de energía sustentables

Actualmente existe la urgencia de generar fuentes de energía renovables capaces de reemplazar los combustibles fósiles; así como de producir compuestos que sustituyan los derivados que actualmente se obtienen del petróleo, ya que la combustión de los recursos fósiles es la causa principal de las emisiones de gases de efecto invernadero, además de que estos recursos se encuentran en cantidades limitadas.

La producción de biocombustibles impacta positivamente de manera que se minimiza la quema de combustibles fósiles y se reducen las emisiones de CO₂ y gases contaminantes a la atmósfera. Lo anterior debido a que para la producción de biocombustibles se utiliza materia orgánica o desechos ricos en carbono provenientes de algún proceso industrial, convirtiendo a los biocombustibles en fuentes renovables de energía.

Los biocombustibles más utilizados hoy en día comercialmente son el biodiésel, bioetanol y biogás, los cuales son producidos mundialmente en grandes cantidades. El biodiésel, un sustituto del diésel, es producido a partir de la reacción de transesterificación de aceites y grasas; el bioetanol es usado como sustituto de la gasolina o como aditivo que se produce principalmente a partir del almidón y sacarosa; mientras que el biogás o biometano producido a partir de digestión anaerobia puede utilizarse como combustible en vehículos (Naik et al., 2010; Oh *et al.*, 2018). Otro compuesto considerado como fuente de energía alternativa es el H₂ de origen biológico, sin embargo, aún no está consolidado dentro de la industria de los biocombustibles. La generación de estos compuestos es un tema de investigación actual, dado que es necesario implementar los métodos más eficientes, económicos y sustentables. En este trabajo nos enfocaremos en el bioetanol (C₂H₆O) y el biohidrógeno (H₂).

2.1.1 Bioetanol

El etanol, también llamado alcohol etílico, es un líquido incoloro e inflamable. El etanol se usa en la industria alimenticia como bebida alcohólica, en el sector farmacéutico como principio activo

de algunos medicamentos y en cosméticos como perfumes y ambientadores. Por sus propiedades es un buen disolvente y también puede utilizarse como anticongelante. Además de lo anterior, el etanol se emplea como combustible (bioetanol) al presentar un contenido energético de 27 MJ/kg (IEA-AMF, 2017). En la figura 1 se muestra la estructura química del etanol.

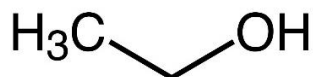


Figura 1. Estructura química del etanol

El bioetanol es el biocombustible más utilizado mundialmente, siendo Estados Unidos y Brasil los principales países productores con más de 94 billones de litros anualmente, lo que corresponde al 85% de la producción mundial de bioetanol (Costa *et al.*, 2018; Gray *et al.*, 2006). La mayor parte del bioetanol es producido a partir de la caña de azúcar, la remolacha, el trigo y el maíz, tan solo en Estados Unidos se produjeron 61 mil millones de litros a partir del maíz en el 2017, representando el 58% de la producción global (Dunn, 2019). La producción de bioetanol a partir de alimentos como el maíz, el azúcar de caña y el trigo no es conveniente, ya que compite directamente con los alimentos que son para consumo humano (Chen *et al.*, 2021).

Una alternativa que se ha implementado es la utilización de biomasa lignocelulósica, la cual incluye los desechos agrícolas, forestales y municipales. La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es la principal y más abundante componente de la biomasa (Ragauskas *et al.*, 2006), es considerada una fuente de energía renovable ya que por medio de la fermentación de los azúcares que componen esta biomasa se producen compuestos de valor agregado como el etanol (Lin y Tanaka, 2006), sin embargo, este proceso conlleva un costo de producción elevado ya que la lignocelulosa, debido a su estructura compleja y compacta, requiere un pretratamiento para liberar los azúcares presentes en la celulosa y hemicelulosa (Chen *et al.*, 2021; Gray *et al.*, 2006; Shanmugam e Ingram, 2021).

2.1.2 Hidrógeno

El hidrógeno molecular es la molécula más pequeña y ligera que existe en la atmósfera, es un gas inodoro, incoloro e inflamable. El H₂ es considerado un combustible prometedor debido a su impacto ambiental, ya que al quemarse no genera emisiones de CO₂, se espera que el mercado global de H₂ crezca a 120 millones de toneladas en 2024, comparado con 70 millones de toneladas producidas en 2019 (Atilhan *et al.*, 2021). La mayor producción de H₂ se da por el reformado con vapor del gas natural, sin embargo, requiere de un costo de producción y energía muy elevados. También hay producción de H₂ como subproducto del refinado del petróleo (Dunn, 2002; Kwang y Harrison, 2005). La producción H₂ más atractiva corresponde a aquella que se da a partir de energía renovable, como energía eólica, solar, hidroeléctrica y a partir de biomasa. La mayoría de los métodos de obtención de H₂ consisten en reacciones de división del agua, como la electrólisis (Atilhan *et al.*, 2021). Estos métodos químicos son los que producen mayor cantidad de H₂, pero representan un costo muy elevado.

Por otro lado, la producción biológica de H₂ se da por procesos fermentativos o fotosíntesis y aunque la producción es menor comparada con los procesos químicos, los métodos biológicos son más económicos (Maeda *et al.*, 2018; Rosales-Colunga *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2006). Además de que por este proceso fermentativo y utilizando la ingeniería de vías metabólicas como se ha visto en trabajos anteriores (Camacho Zaragoza, 2016; Chávez Béjar, 2010; Martínez Álvarez, 2019; Mendoza Flores, 2021) se podrían reemplazar a los métodos químicos.

2.2 Glicerol

El glicerol (C₃H₈O₃) o glicerina, es un alcohol líquido a temperatura ambiente con aspecto viscoso e incoloro, soluble en disolventes polares e insoluble en hidrocarburos, además se caracteriza por ser un compuesto higroscópico, lo que lo hace útil como humectante en cosméticos. Podemos encontrar al glicerol en todos los tipos de aceites, así como en grasas vegetales y animales. El glicerol cuenta en su estructura con tres grupos hidroxilo, en la Figura 2 se puede

apreciar su estructura química, lo que le permite reaccionar con otros grupos funcionales para formar derivados de ésteres y aldehídos.

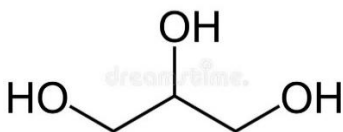


Figura 2. Estructura química del glicerol

El glicerol es un subproducto de la producción de biodiésel (Meher *et al.*, 2006), aproximadamente el 10% (p/p) de la obtención total de biodiésel corresponde a glicerol (Tan *et al.*, 2013). En los últimos años, debido a la necesidad de fuentes de energía sustentables, la producción de biodiésel ha incrementado drásticamente, y por ende también la producción de glicerol. En 2016 la producción mundial de glicerol fue de aproximadamente 3.2 millones de toneladas (Ciani, 2019). Sin embargo, el glicerol obtenido de este proceso contiene contaminantes como triglicéridos, metanol, biodiésel y jabón (Vassilev *et al.*, 2017), en consecuencia se requiere su refinación para poder ser utilizado en diversas áreas como en la industria farmacéutica, alimenticia, en resinas, cuidado personal, entre otras (Katryniok *et al.*, 2010). La refinación de dicho glicerol es costosa, por lo que las industrias a veces optan por desecharlo e incinerarlo al no encontrar un uso directo, lo que convierte al glicerol crudo en un residuo muy económico (Vassilev *et al.*, 2017).

2.2.1 Glicerol puro

El glicerol es un producto de valor agregado industrialmente que, al ser un compuesto biodegradable, comestible y no tóxico en su estado refinado, es utilizado en distintos sectores (Figura 3): en el área farmacéutica para dar humedad a las pastillas, aumentar la viscosidad de los fármacos líquidos, en jarabes para la tos y plastificantes para cápsulas de medicamentos; en el área de cuidado personal para proporcionar lubricación, como humectante en productos para la piel y el cabello, en pastas dentales para evitar que la pasta se endurezca; en la industria

alimenticia como disolvente, edulcorante y conservante, así como suavizador en pan, pasteles, queso y dulces; en la industria papelera es usado como plastificador y lubricante, entre otras (Tan *et al.*, 2013; Westbrook *et al.*, 2019).

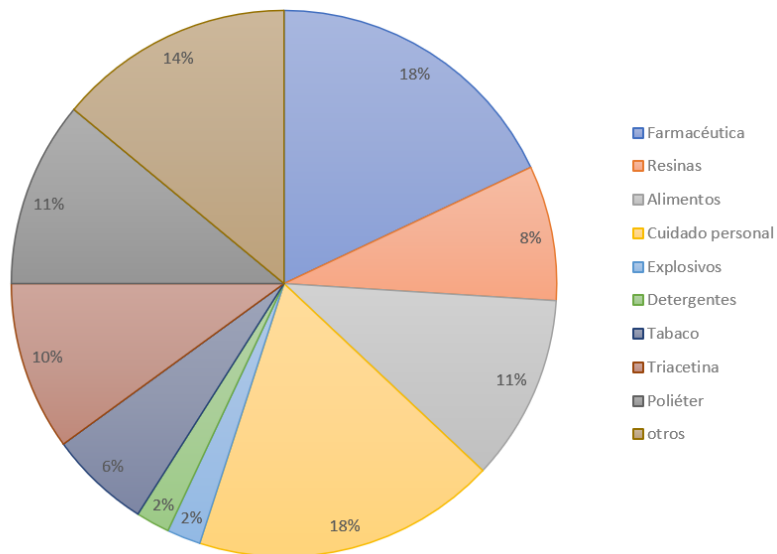


Figura 3. Usos industriales del glicerol refinado. Modificado de Katryniok (2010).

La refinación del glicerol requiere de diversas etapas como destilación, evaporación, filtración, cristalización, absorción con carbón activado y cromatografía de intercambio iónico, entre otras, lo que lo convierte en un proceso con un costo muy elevado (Tan *et al.*, 2013). Por lo anterior, surge la necesidad de desarrollar aplicaciones que requieran del glicerol no refinado para evitar desecharlo.

2.2.2 Glicerol como fuente de carbono

La producción biológica de compuestos de valor agregado requiere de una fuente de carbono que sea accesible y económica. El glicerol, además de su disponibilidad y precio bajo, se encuentra en un estado más reducido comparado con la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) o xilosa ($C_5H_{10}O_5$). Es decir que la conversión de glicerol a fosfoenolpiruvato (un intermediario de la vía glucolítica) produce el doble de equivalentes reductores que la de glucosa o xilosa. Dado lo anterior, en un

proceso fermentativo las características del glicerol permitirían alcanzar mayores rendimientos de compuestos más reducidos (Yazdani y Gonzalez, 2007) como puede ser el etanol e H₂.

2.3 Metabolismo de *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa y miembro de la familia de enterobacterias, que ha servido como modelo de estudio para la producción de compuestos de valor agregado debido a las siguientes características: por su corto tiempo de duplicación, rápido crecimiento comparado con otros microorganismos, crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, fondo genético más utilizado como modelo por el amplio conocimiento de su regulación genética, capacidad de metabolizar distintas fuentes de carbono tanto en condiciones aerobias como anaerobias, tolerancia a concentraciones elevadas de productos y es el modelo mejor estudiado en ingeniería genética (Pontrelli *et al.*, 2018).

2.3.1 Metabolismo de glicerol en *E. coli*

La glucosa es la fuente de carbono preferida de *E. coli*, sin embargo, *E. coli* es capaz de crecer usando glicerol como fuente de carbono, aunque a una tasa de crecimiento más baja. La tasa de crecimiento en condiciones anaeróbicas utilizando glucosa (2 g/L) es de 0.46 h⁻¹ a un pH de 7 y temperatura de 37°C en medio mineral (Monk *et al.*, 2016), mientras que en glicerol (10 g/L) es de 0.05 h⁻¹ a un pH de 6.5 y 7.5, temperatura de 37°C en medio mínimo suplementado con cloruro de níquel (0.02 mg/L) y selenito de sodio (0.172 mg/L) (Sanchez-Torres *et al.*, 2013). En la Figura 4 se muestra el metabolismo de *E. coli* para la obtención de productos en condiciones de fermentación utilizando glicerol como fuente de carbono.

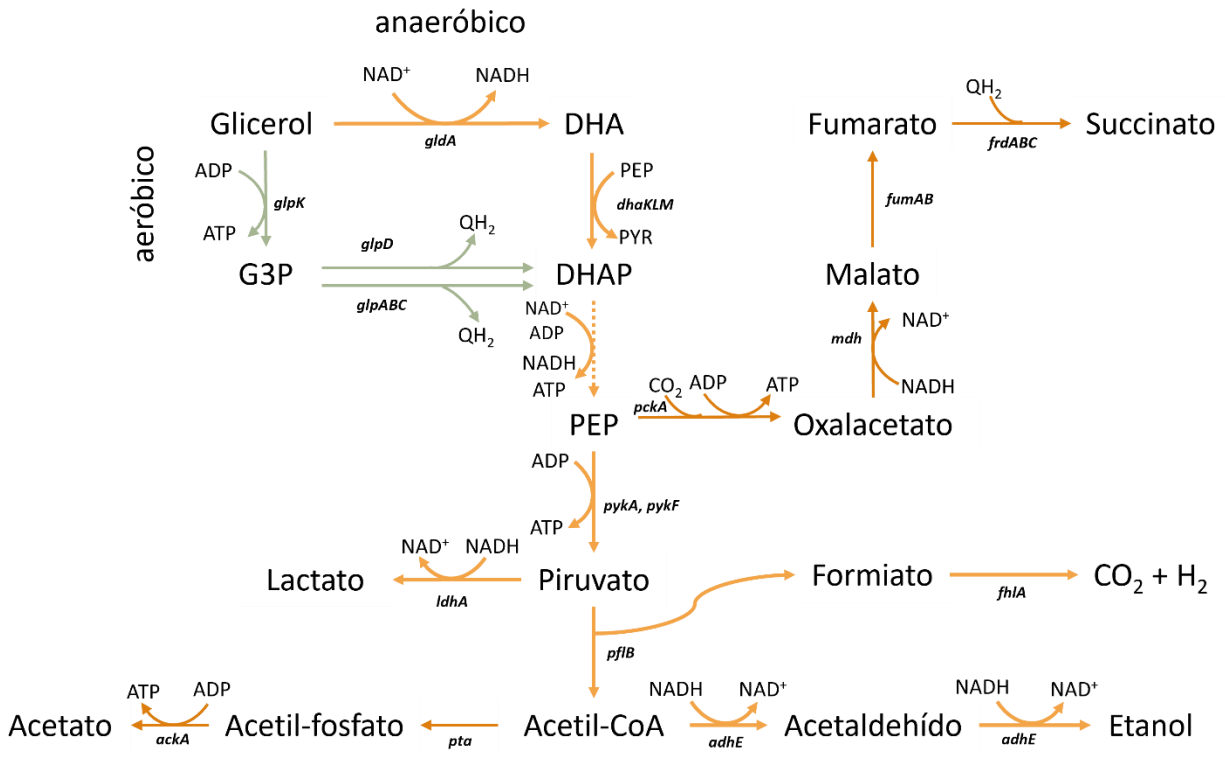


Figura 4. Metabolismo de *E. coli* utilizando glicerol como fuente de carbono (esquema realizado por la autora de la tesis). Se observa la formación de ácidos orgánicos como lactato, acetato, succinato, etanol y formiato a partir del metabolismo del glicerol en *E. coli*. El glicerol puede metabolizarse por la vía aerobia GlpK-GlpD (ruta en verde) o la vía anaerobia GldA-DhaK para la obtención de dihidroxiacetona fosfato.

La entrada de glicerol a la célula en *E. coli* ocurre por difusión facilitada por una acuaporina GlpF. Posteriormente la asimilación de glicerol puede ocurrir por dos rutas hacia la formación de dihidroxiacetona fosfato (DHAP): por respiración aerobia (GlpK-GlpD), respiración anaerobia (GlpK-GlpABC) o por fermentación (GldA-DhaKLM) (Blankschien *et al.*, 2010; Durnin *et al.*, 2009). En presencia de oxígeno o nitrato la enzima GlpD transfiere los electrones a sus respectivas oxidasas, mientras que en condiciones anaeróbicas el sistema GlpABC transfiere los electrones a fumarato. En ausencia de fumarato, la expresión de *glpABC* es limitada aún en presencia de glicerol-3-fosfato (G3P). Por lo que la asimilación de glicerol por respiración anaerobia requiere de un aceptor final de electrones como es el fumarato para el crecimiento bacteriano (Booth, 2005).

La utilización de la ruta fermentativa es preferida porque produce más poder reductor NADH. Sin embargo, la enzima DhaKLM utiliza fosfoenolpiruvato (PEP) como cofactor, lo cual afecta la disponibilidad de PEP en la producción de metabolitos fermentativos. Un factor importante en el metabolismo de glicerol que se ha estudiado es el pH. En condiciones ácidas el metabolismo de glicerol es más rápido (9 g/L de glicerol fermentado a pH 6) que en condiciones alcalinas (1 g/L de glicerol fermentado a pH 8) (Dharmadi *et al.*, 2006). Lo anterior puede estar ligado a la disponibilidad de CO₂ en el medio, ya que *E. coli* requiere bicarbonato (HCO₃⁻)/CO₂ como sustrato para la biosíntesis de moléculas pequeñas, de ácidos grasos y para el metabolismo central (oxalacetato). *E. coli* requiere un equilibrio intracelular entre bicarbonato y CO₂, donde a pH por encima de 6.3 este equilibrio cambia favoreciendo la presencia de HCO₃⁻, afectando diversas reacciones ya que HCO₃⁻ no es soluble en lípidos, mientras que el CO₂ es soluble en agua y en lípidos logrando difundirse hacia adentro y fuera de la célula. El pH óptimo de fermentación de glicerol coincide con el *pK_a* del equilibrio de reacción entre HCO₃⁻ y CO₂, el cual es de 6.3 (Dharmadi *et al.*, 2006).

Una vez que se produce dihidroxiacetona fosfato, esta entra a glucólisis por la enzima triosa fosfato isomerasa convirtiendo la DHAP en gliceraldehído-3-fosfato, el cual sigue la ruta glucolítica hasta la obtención de los productos de fermentación. El perfil de los productos obtenidos en fermentación a partir de glicerol es diferente de aquellos obtenidos a partir de glucosa, lo anterior debido al grado de reducción que contienen ambas fuentes de carbono. La Tabla 1 muestra la comparación de los productos de fermentación de dos cepas de *E. coli* en condiciones comparables donde a partir de glucosa se obtiene como metabolito principal lactato seguido de etanol, acetato, succinato y formiato, mostrando las cantidades obtenidas a la derecha de cada compuesto. Mientras que en el caso de glicerol los principales metabolitos que se obtienen son formiato, etanol, seguido de succinato y acetato (Zhang *et al.*, 2010).

Tabla 1. Principales productos de fermentación a partir de glucosa y glicerol

| Referencia | Liu <i>et al.</i> , 2013 | Zhang <i>et al.</i> , 2010 |
|-------------------|--|---|
| Cepa | <i>E. coli</i> K12 | <i>E. coli</i> ATCC8739 |
| Fuente de carbono | 20 g/L de glucosa | 15 g/L de glicerol |
| Condiciones | Medio mineral, 30 °C, 150 rpm y pH 6.6. | Medio mineral, 37 °C, 150 rpm y pH 7 |
| Productos | Lactato 6.1 g/L (0.31)* | Formiato 5 g/L (0.333) |
| | Etanol 2.9 g/L (0.145) | Etanol 3.7 g/L (0.25) |
| | Acetato 2 g/L (0.1) | Succinato 3 g/L (0.20) |
| | Succinato 1.3 g/L (0.065) | Acetato 1 g/L (0.067) |
| | Formiato 0.3 g/L (0.015) | |

*Números entre paréntesis representan el rendimiento de gramos de producto por gramo de glucosa o glicerol respectivamente.

2.4 Ingeniería metabólica en *E. coli*

Muchos proyectos se han enfocado en modificaciones genéticas en *E. coli* para la obtención exclusiva de algún metabolito de interés. En el caso de la obtención de etanol e H₂ (ya sea en el mismo proceso de fermentación o por separado), diversos grupos de trabajo han llevado a cabo diferentes estrategias, como la sobreexpresión de genes pertenecientes a la ruta de obtención de etanol e H₂ y la eliminación de aquellos que forman productos no deseados como succinato, lactato y acetato. En 2008, Yazdani y Gonzalez modificaron la cepa de *E. coli* MG1655 eliminando los genes *frdA* y *pta*, y sobreexpresando los genes *gldA* y *dhaKLM* para la producción de etanol e H₂ a partir de glicerol. En ese trabajo, la cepa se evaluó en condiciones microaerobias en fermentadores de 500 mL en medio mínimo descrito por Neidhardt (1974), utilizando 10 g/L de glicerol como fuente de carbono a 37°C, 200 rpm y pH de 6.3, y lograron obtener 1.02 mmol_{H₂}/mmol_{glicerol} y 1.02 mmol_{etanol}/mmol_{glicerol} después de 60 h de fermentación. Lo anterior demuestra que la sobreexpresión de *gldA* y *dhaKLM* mejoraron la velocidad de consumo de glicerol, ya que se sabe que *E. coli* crece lento en presencia de glicerol comparado con glucosa (Martínez-Valenzuela, 2018; Martínez-García, 2020; Monk *et al.*, 2016; Vuoristo *et al.*, 2016).

La vía de obtención de etanol es favorable a partir de glicerol, ya que al ser el glicerol una molécula más reducida que la glucosa o xilosa se obtienen el doble de equivalentes reductores (2 NADH) y la formación de etanol requiere justamente 2 NADH, lo que resulta en el balance redox que la célula requiere; balance redox que no se logra con la glucosa para la producción de etanol por la vía homóloga de *E. coli* (Figura 4).

Existen pocos trabajos en la obtención de etanol e H₂ a partir de glicerol en *E. coli*, sin embargo, se ha evaluado la producción de H₂ utilizando glucosa como fuente de carbono. En el 2007, Maeda y colaboradores obtuvieron la cepa BW25113 $\Delta hyaB \Delta hybC \Delta hycA \Delta fdoG \Delta frdC \Delta ldhA \Delta aceE$, la cual fue evaluada en condiciones anaerobias a 37°C en fermentadores de 250 mL para la producción de H₂. En ese estudio reportan un rendimiento de 1.3 mol H₂/mol glucosa. En el 2006, Yoshida y colaboradores lograron producir 1.82 mol H₂/mol de glucosa, valor cercano al máximo teórico, el cual es 2 mol H₂/mol de glucosa. Para esto utilizaron la cepa *E. coli* SR15 $\Delta hycA, \Delta frdC, \Delta ldhA$ y sobreexpresaron *fhfA* en condiciones anaerobias con medio mineral y 150 mM (27 g/L) de glucosa a pH 6. En ambos trabajos los genes *hyc* forman parte del complejo FHL que cataliza la reacción de formato a H₂ y CO₂, por lo que comparando los dos trabajos permite sugerir que es necesario eliminar *hycA* para obtener una mayor producción de H₂. Lo anterior no funciona de la misma manera utilizando glicerol como fuente de carbono, ya que aún no es claro el rol que tienen los genes *hyc* en la producción de H₂ (Maeda *et al.*, 2018; Valle *et al.*, 2019).

Otra estrategia que se ha implementado para la conversión de dihidroxiacetona (DHA) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) es utilizar una enzima DhaK que utiliza ATP como donador de grupo fosfato. En trabajos anteriores (Wang *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019) se ha demostrado que la actividad enzimática de DhaK de *K. oxytoca* presenta diez veces mayor actividad respecto a la enzima nativa de *E. coli*. La diferencia entre estas dos enzimas es el cofactor utilizado; la enzima nativa de *E. coli* utiliza PEP (fosfoenolpiruvato) mientras que la de *K. oxytoca* utiliza ATP como donador del grupo fosfato. El hecho de utilizar PEP desvía el flujo metabólico de los productos de interés al ser un metabolito precursor de mucha importancia celular. Lo anterior es útil ya que, en anaerobiosis, la asimilación del glicerol es por la enzima GldA. Esta enzima produce DHA, el cual es un metabolito tóxico en *E. coli* afectando su crecimiento en glicerol. Una mayor eficiencia de conversión de DHA en DHAP podría mejorar la tasa de consumo de glicerol.

2.5 Estrategia propuesta

En este trabajo se propone la modificación genética de la cepa *E. coli* MG1655 (*E. coli* K12F-, $\Delta\lambda$ -, *ilvG*, *rfb-50*, *rph-1*) para la construcción de una cepa productora de etanol, CO₂ e H₂ en condiciones anaerobias a partir de glicerol. Para lo anterior se sobreexpresarán los genes involucrados en el consumo de glicerol por la vía anaeróbica, los cuales corresponden a *gldA* y *dhaKLM*, así como la expresión de *dhaK* de *K. oxytoca*, este último reemplazando al gen *dhaKLM* nativo de *E. coli*. También se eliminarán los genes *fdrA* y *pta* que conducen a la producción de compuestos no deseados (succinato y acetato, respectivamente). En la figura 5 se observa la ruta propuesta de obtención de etanol e H₂.

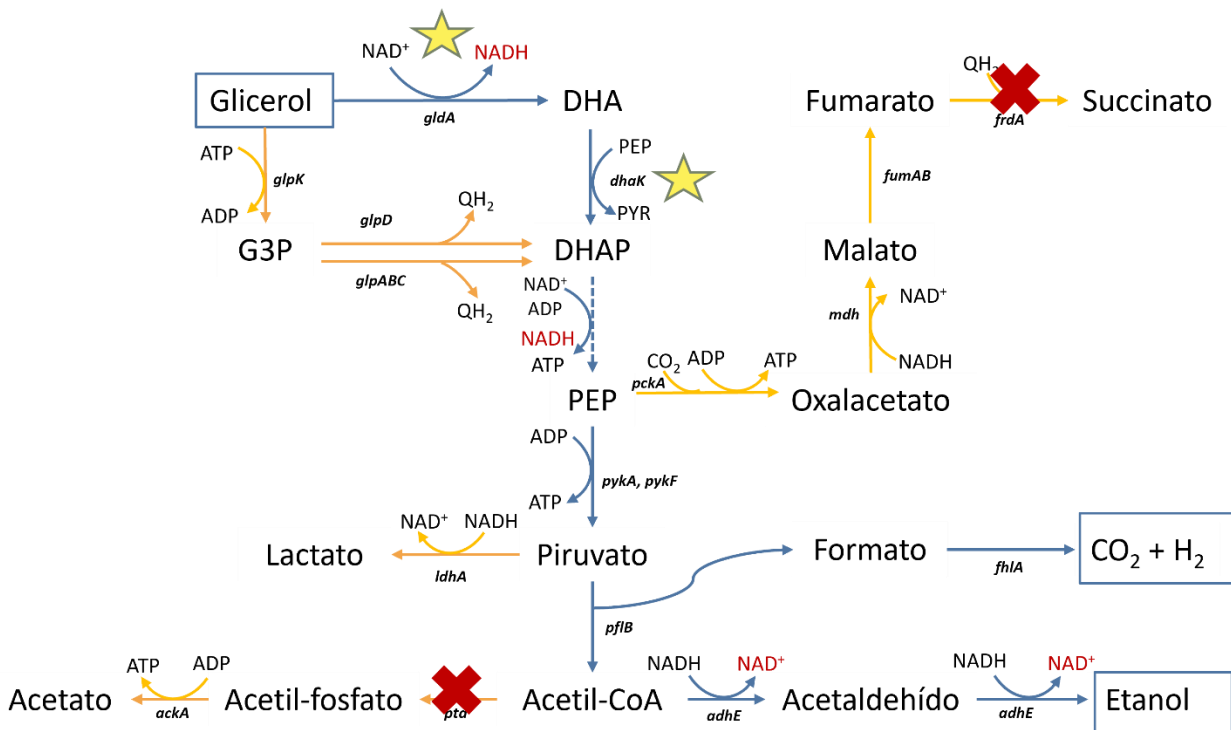


Figura 5. Metabolismo de *E. coli* MG1655 después de las modificaciones genéticas planteadas en el presente proyecto. En color azul se muestra la ruta metabólica desde glicerol hasta los metabolitos de interés planteado en el proyecto. En letras rojas están señalados los equivalentes reductores generados, así como la utilización de estos para la obtención del balance redox. Las estrellas amarillas indican las sobreexpresiones genéticas que se realizarán para mejorar el consumo de glicerol. Las rutas color amarillo corresponden a aquellas que desvían la fuente de carbono y energía, por lo que la equis de color rojo representa las eliminaciones de genes.

3. Hipótesis

Debido al grado de reducción del glicerol, es posible utilizarlo como fuente de carbono para producir etanol, hidrógeno y dióxido de carbono en proporciones equimolares y como únicos productos en *Escherichia coli* modificada genéticamente.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Dirigir el flujo de carbono y electrones en *E. coli* mediante ingeniería metabólica hacia la formación equimolar de etanol e hidrógeno usando glicerol como fuente de carbono.

4.2 Objetivos particulares

- a) Determinar parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa MG1655 de *E. coli* en minifermentadores en condiciones anaerobias.
- b) Erradicar el flujo de carbono hacia la formación de succinato y acetato eliminando los genes *frdA* y *pta* de *E. coli*.
- c) Incrementar el consumo de la fuente de carbono de *E. coli* mediante la sobreexpresión de *gldA* y *dhaK*.
- d) Incrementar el consumo de la fuente de carbono de *E. coli* mediante la sustitución del gen *dhaK* de *E. coli* por el de *Klebsiella oxytoca*.
- e) Evaluar parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas modificadas en minifermentadores a diferentes concentraciones de glicerol en condiciones anaerobias.
- f) Cuantificar la actividad de enzimas que participan en la vía de formación de los productos de interés.

5. Metodología

5.1 Estrategia experimental

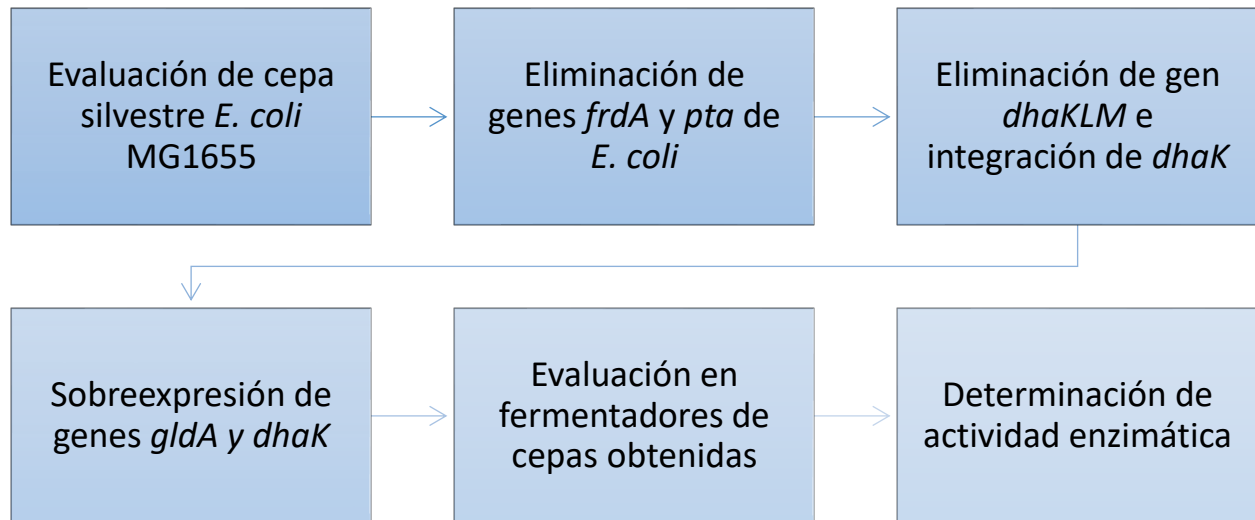


Figura 6. Estrategia experimental

5.2 Cepas, plásmidos, oligonucleótidos y técnicas de biología molecular utilizadas

Este estudio partió de la cepa de *E. coli* MG1655 (*E. coli* K12F-, $\Delta\lambda$ -, *ilvG*-, *rfb-50*-, *rph-1*) (Blattner *et al.*, 1997), la cual es descendiente de la cepa *E. coli* K-12. Esta cepa es una cepa de laboratorio con mínimas manipulaciones genéticas, donde la mayoría de las mutaciones descritas en el fenotipo están presentes en la mayoría de las cepas K-12. La diferencia está en un cambio en el marco de lectura al final de *rph* que resulta en una disminución de la expresión de *pyrE* y en la mutación *ilvG*- que elimina la acetohidroxiácido sintasa II (participa en ruta de síntesis de valina y de isoleucina). La mutación *rfb-50* es una inserción IS5 que resulta en la ausencia de síntesis de O-antígeno. Las Tabla 2, 3 y 4 muestran las cepas, plásmidos y oligonucleótidos, utilizados en este trabajo, respectivamente.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo

| Cepa | Descripción | Referencia |
|---|--|---------------------------|
| MG1655 | <i>E. coli</i> K12F-, $\Delta\lambda$ -, <i>ilvG</i> , <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1 | Colección del laboratorio |
| <i>K. oxytoca</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> | Colección del laboratorio |
| Keio Δ <i>pta</i> ::Km ^R | Keio Δ <i>pta</i> ::FRT-Km ^R -FRT | Colección de Keio |
| Keio Δ <i>frdA</i> ::Km ^R | Keio Δ <i>frdA</i> ::FRT-Km ^R -FRT | Colección de Keio |
| Keio Δ <i>ldhA</i> ::Km ^R | Keio Δ <i>ldhA</i> ::FRT-Km ^R -FRT | Colección de Keio |
| Keio Δ <i>dhaK</i> ::Km ^R | Keio Δ <i>dhaK</i> ::FRT-Km ^R -FRT | Colección de Keio |
| 1M | MG1655 Δ <i>pta</i> | Este trabajo |
| 2M | 1M Δ <i>frdA</i> | Este trabajo |
| 3M | 2M Δ <i>ldhA</i> | Este trabajo |
| 4M | 3M Δ <i>dhaK</i> | Este trabajo |
| 5M | 4M Δ <i>glpK</i> | Este trabajo |
| SY03 | MG1655 Δ <i>frdA</i> Δ <i>pta</i> ::Km ^R | Yazdani y González, 2008 |
| DH5 α | Δ <i>recA1</i> , Δ <i>endA1</i> , <i>lacZ</i> Δ M15 | Colección del laboratorio |

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|------------------------|---|-----------------------------|
| pCP20 | Vector que porta los genes de la recombinasa FLP | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pKD3 | Vector que es utilizado como molde para amplificar un casete de cloranfenicol flanqueado por sitios Frt-Cm ^r | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pKD46 | Vector que contiene las recombinasas del fago lamda con un origen de replicación sensible a temperatura Cb ^r | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pZSblank | Vector blanco (<i>tetR</i> , oriR SC101, <i>cat</i>) | Yazdani y Gonzalez, 2008 |
| pZS <i>gldA</i> | Vector que contiene el gen <i>gldA</i> bajo el control de PLtetO-1 (<i>tetR</i> , oriR SC101, <i>cat</i>) | Yazdani y Gonzalez, 2008 |
| pZSKLM <i>gldA</i> | Vector que contiene los genes <i>gldA</i> y <i>dhaKLM</i> bajo el control de PLtetO-1 (<i>tetR</i> , oriR SC101, <i>cat</i>) | Yazdani y Gonzalez, 2008 |
| pLoxGentrc | Derivado de pLoxGen4 con la inserción de un fragmento proveniente de pTrc99A, el cual lleva el gen que codifica para el represor <i>lacI</i> , la secuencia de P _{trc} , el sitio múltiple de clonación (MCS) y los terminadores <i>rrnB</i> . | Sabido <i>et al.</i> , 2013 |
| pLoxGentrc <i>dhaK</i> | Derivado de pLoxGentrc conteniendo el gen <i>dhaK</i> de <i>K. oxytoca</i> clonado que codifica para la dihidroxiacetona cinasa | Este trabajo |

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

| Nombre | Descripción | Referencia |
|-----------------|---|------------------------------|
| k1 | 5' CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT 3' | Datsenko y Wanner, 2000 |
| k2 | 5' CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC 3' | Datsenko y Wanner, 2000 |
| csgC | 5' ACA ACG CGA CCG CTC ATC AG 3' | Hayashi <i>et al.</i> , 2006 |
| ymdA | 5' CGT CAC ATG CCG GTT CCA CA 3' | Hayashi <i>et al.</i> , 2006 |
| Fw-pta | 5'ATC'GGC GGT AAC GAA AGA GG 3' | Colección del laboratorio |
| Rv-pta | 5'GCA AAG CTG CGG ATG ATG AC 3' | Colección del laboratorio |
| Fw-frdA | 5'GCT CCT TCT TAC CGT GGT CGC 3' | Colección del laboratorio |
| Rv-frdA | 5'TTC CCG CAG TTG CGT TTT GTC 3' | Colección del laboratorio |
| F_ldhA | 5'AGC AGC GTC AAC GGC ACA AG 3' | Colección del laboratorio |
| R_ldhA | 5'AGC GCA ACA AAC GCG GCT AC 3' | Colección del laboratorio |
| F_dhaR | 5'ATC AGT TTT TTC ATC GGA TCG CCA TTA CGG CT 3' | Este trabajo |
| R_dhaL | 5'GAG GAT ATT CAT ATG ATT CGG CGA TGC TAC TGC C 3' | Este trabajo |
| FdhaKLox | 5'CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGA CCA TGA AAA AAC TGA TTA ACC GTG TCG 3' | Este trabajo |
| RdhaKLox | 5'ACT CTA GAG GAT CCC CGG GTA CCT TAA TGA CAT GTC GTG CTC CTT A 3' | Este trabajo |
| trcmelA/lacZfwd | 5'GAG TGC GAT CTT CCT GAG GCC GAT ACT GTC GTC GTC CCC TCA AAC GCT TAT CAT CGA CTG CAC GG 3' | Sabido <i>et al.</i> , 2013 |
| trcmelA/lacZrvs | 5'GAC ATG GCC TGC CCG GTT ATT ATT ATT TTT GAC ACC AGA CCA ACT GCA CAG ATG CGT AAG GAG AA 3' | Sabido <i>et al.</i> , 2013 |
| lacIF | 5'GTG GAA GCT GCC TGC ACT AA 3' | Este trabajo |
| lacYR | 5'GTG GCG AAC GAT GAG CCA AT 3' | Este trabajo |
| GenF | 5'CAG AAC CTT GAC CGA ACG CA 3' | Este trabajo |
| glpKF | 5'CTG AAT GCG GCG AAT GGT GC 3' | Este trabajo |
| glpKR | 5'TCG TGG AGG TCC GTG ACT TTC 3' | Este trabajo |

5.2.1 Eliminación de los genes del cromosoma de *E. coli* mediante transducción por fagos.

La eliminación de genes del cromosoma de *E. coli* MG1655 se llevó a cabo utilizando el protocolo de transducción por fagos (modificación de la metodología de Miller H., 1992) y utilizando el

banco de cepas de la colección de Keio (Baba *et al.*, 2006). La transducción por fagos es una metodología que permite la transferencia de material genético de una bacteria a otra utilizando el bacteriófago P1, este material genético se integra en el cromosoma de la cepa receptora por recombinación homóloga.

Para lo anterior se preparó un cultivo con 4 mL de medio Luria-Bertani (LB descrito en Anexos) con el antibiótico respectivo de la cepa donadora (kanamicina), con incubación a 37°C y 300 rpm toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron 1.5 mL del cultivo de la cepa donadora a 13,000 rpm por 1 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 750 µL de amortiguador MC (Anexo 1), el cual contiene magnesio que actúa como cofactor y calcio facilitando la adsorción de los bacteriófagos. Para que la metodología funcione de manera adecuada, el fago debe contener un título alto de lisis (1×10^9 UFC/mL). Posteriormente se preparó la siguiente serie de microtubos:

Tabla 5. Preparación de fagos con las células

| Tubo | Volumen de células (µL) | Volumen de fago (µL) | Notas |
|------|-------------------------|----------------------|---|
| 1 | 100 | - | Control de contaminación por bacterias |
| 2 | 100 | 10 | Diferentes concentraciones de bacteriófago para encontrar la de mayor lisis celular |
| 3 | 100 | 50 | |
| 4 | 100 | 100 | |
| 5 | - | 10 | Control de contaminación por bacteriófagos |

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min permitiendo el contacto de los bacteriófagos con la membrana bacteriana, pasado ese tiempo se agregaron 4 mL de agar suave fundido con MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 5 mM a cada tubo y se agitaron con vortex. Lo anterior debe realizarse cuidando que el agar permanezca fundido, pero no demasiado caliente evitando así dañar a los fagos. Las mezclas anteriores se agregaron a cajas Petri con LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se raspó el agar suave de las cajas

correspondientes a los tubos 2, 3 y 4 con una espátula y el contenido se almacenó en tubos cónicos de 50 mL, añadiendo 5 mL de LB y 200 μ L de cloroformo. Lo anterior se agitó con vortex para eliminar los gránulos de agar y lograr una mezcla homogénea. La mezcla se centrifugó a 5,000 rpm por 30 min a 4°C, el sobrenadante se filtró en una membrana de 0.45 μ m y se almacenó a 4°C. Las cajas correspondientes a los tubos 1 y 5 son controles, donde la caja 1 debe presentar un crecimiento saturado de bacterias y en la caja 5 no debe haber crecimiento de bacterias.

Posteriormente, se preparó la cepa receptora y se realizaron las mezclas de células con los fagos previamente obtenidos como se describió en la Tabla 3. Los tubos con las mezclas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, se agregaron 100 μ L de citrato de sodio 1M y se mezclaron suavemente. El contenido de cada tubo se plaqueó en cajas Petri con el medio de selección (kanamicina) y se incubaron por 24 h a 37°C.

Las colonias obtenidas se analizaron por PCR a partir de la propia colonia usando oligonucleótidos externos y específicos de la región insertada (oligos k1 y k2 internos de FRT-kan) (Datsenko y Wanner, 2000).

5.2.2 Escisión cromosomal del gen de resistencia a kanamicina flanqueado por los sitios FRT

El casete de resistencia a kanamicina, que sustituyó el gen de interés, debe ser eliminado para realizar subsecuentes eliminaciones. Para lo anterior la mutante obtenida se transformó con el plásmido pCP20 y se recuperó en 1 mL de medio rico SOC a 30°C y 300 rpm por 2 horas. Se platearon 100 μ L directo de la transformación y 100 μ L de una dilución 1:10 en placas con medio de selección LB_{Cb100} y se incubaron a 30°C durante 24 horas. De una de las placas, se seleccionaron 20 colonias, las cuales se resembraron en cajas con medio LB_{Km30} y LB para comprobar la pérdida del casete de kanamicina. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

Posteriormente se seleccionaron 2 colonias sensibles a kanamicina mostrando el fenotipo de pérdida del casete. Las colonias se inocularon en 5 mL de medio LB y se incubaron a 42°C durante 8 h, después se realizó otro pase tomando 25 μ L del cultivo e inoculando en 5 mL de medio LB incubando nuevamente a 42°C durante 8 h. Finalmente las colonias se estriaron en cajas con

medio LB y se crecieron a 37°C. De la placa anterior se seleccionaron 10 colonias y se estriaron en cajas con medio LB, LB_{Cb100} y LB_{Km30} incubándolas a 37°C toda la noche. Las colonias sensibles a carbenicilina y kanamicina se seleccionaron y se comprobó la escisión del casete FRT-km con una reacción de PCR utilizando los oligos externos a la región donde se encontraba el casete.

5.2.3 Sobreexpresión de *gldA* y *dhaK*.

Una copia de los genes que codifican para las enzimas encargadas de la conversión del glicerol a dihidroxiacetona y dihidroxiacetona fosfato se insertaron en la cepa dentro de plásmidos proporcionados por el grupo del Dr. González (Yazdani & Gonzalez, 2008). Para lo anterior, se generaron células electrocompetentes de la cepa silvestre y las mutantes y se transformaron con los distintos plásmidos proporcionados.

5.2.4 Eliminación del gen *dhaK* de *E. coli* e integración de *dhaK* de *Klebsiella oxytoca* por recombinación homóloga

La integración del gen *dhaK* de *Klebsiella oxytoca* en el cromosoma de *E. coli* MG1655 se llevó a cabo mediante una modificación de la estrategia de Datsenko y Wanner (2000). Ésta consiste en utilizar una construcción donde sus extremos corresponden a homología a las regiones adyacentes del gen a inactivar de *E. coli* que en su interior contengan el gen *dhak* de *K. oxytoca* y un casete de resistencia como factor de selección. En el laboratorio se cuenta con el plásmido pLoxGentrc (Sabido *et al.*, 2013) el cual contiene un sitio de clonación múltiple donde se puede clonar cualquier gen de interés. Lo anterior se realizó linealizando el plásmido y por clonación circular por extensión de polimerasa (CPEC por sus siglas en inglés), que consiste en una reacción en el termociclador que une secuencias que se sobrelapan en forma circular de doble hebra sin utilizar ligasas (Quan y Tian, 2011). La clave de esta reacción está en el diseño cuidadoso de los oligonucleótidos, los cuales servirán para amplificar el inserto de DNA con las regiones de homología con el vector. La Figura 7 muestra un diagrama general de la técnica.

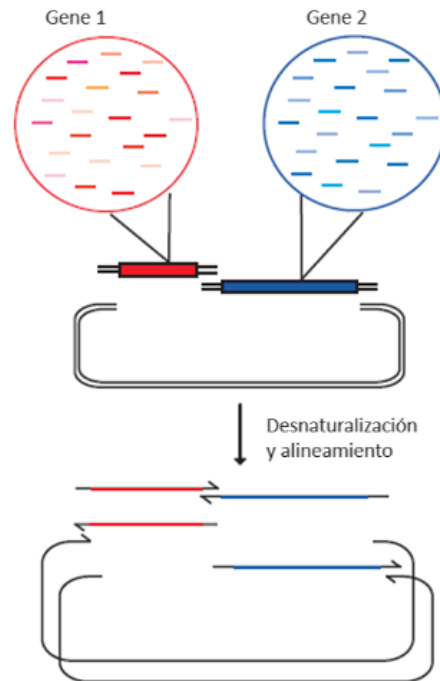


Figura 7. Esquema de clonación circular por extensión de la polimerasa. Dos genes son clonados en un vector, donde el vector comparte regiones iguales a los extremos de los fragmentos a clonar. En cada ciclo, después de la desnaturalización y alineamiento, los insertos que hibridaron con el vector se extienden, usando como templado las regiones alineadas, hasta completar un círculo.

El vector pLoxGentrc se linealizó con enzimas de restricción utilizando el sitio de clonación múltiple, lo cual es conveniente comparado con la amplificación por oligonucleótidos, ya que se evita la generación de posibles mutaciones ocasionadas por la polimerasa. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *dhak* de *K. oxytoca* fueron diseñados de manera que alrededor de 20 pares de bases tuvieran homología con las regiones extremas del plásmido linealizado. Ambos fragmentos (vector linealizado e inserto) se purificaron y cuantificaron en nanodrop (Thermo scientific NanoDrop 2000c, No. De serie 4332, E.U.A.) Posteriormente se establecieron las condiciones de reacción en el termociclador (ver Tabla 6), donde primero los fragmentos se desnaturalizan por calor, después las homologías se alinearon y se extendieron usándose como templados para formar plásmidos circulares de doble cadena. El resultado de esta reacción se utilizó para transformar la cepa DH5 α . El vector contiene resistencia a gentamicina y ampicilina

por lo que se tomaron como factores de selección después de la transformación. Una vez que se comprobó la correcta clonación, se transformaron las cepas de interés.

El siguiente paso fue la integración del gen *dhak* en cromosoma. Para lo anterior se optó por realizar la recombinación homóloga en el gen *lacZ* de *E. coli* ya que ofrece un factor de selección adicional de la resistencia a antibiótico mediada por el reactivo X-gal, el cual se descompone en un colorante azul por acción de la enzima β -galactosidasa. Entonces las cepas carentes de *lacZ* no formarán la coloración azul ya que no expresan la enzima capaz de degradar el colorante y las cepas que no hayan realizado la recombinación, presentaron coloración azul al ser capaces de degradar el colorante. El vector pLoxGentrcdhaK previamente construido fue utilizado como templado para amplificar la región del gen *dhaK* de *K. oxytoca* con el casete de resistencia a gentamicina, así como la región del promotor y el sitio de unión a ribosoma. Los oligonucleótidos utilizados para realizar la amplificación anterior se diseñaron de modo que tuvieran 20 pares de bases homólogas a las de los extremos del gen *lacZ* de *E. coli* en cromosoma para que se realizara la recombinación. La integración en cromosoma permitió evaluar la función del gen *dhaK* de *K. oxytoca* sin la carga metabólica que le conlleva a la cepa contener el plásmido.

5.3 Evaluación en minifermentadores de las cepas *E. coli* MG1655 y mutantes obtenidas

5.3.1 Obtención del preinóculo e inóculo

Las cepas silvestres o mutantes (las cuales una vez que se obtuvieron fueron almacenadas en congelación en glicerol al 40% como crioprotector) se sembraron en cajas de medio LB sólido con el antibiótico respectivo según correspondía. Se incubaron durante 18 h a 37°C. De éstas, se tomaron 2 colonias aisladas y se cultivaron hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 DO_{600nm} a 37°C y 200 rpm en tubos de vidrio (16x150 mm) con 10 mL de medio Mínimo MOPS (descrito en Anexos) añadiendo los antibióticos según fueran necesarios.

Para el inóculo se tomó el volumen necesario del preinóculo para empezar a una densidad de 0.05 DO_{600nm}, el cual se centrifugó y la pastilla se resuspendió en medio recién preparado añadiéndose a matraces de 125 mL con un volumen total de 80 mL de medio mínimo MOPS

(Neidhardt *et al.*, 1974) incubando nuevamente a 37°C y 200 rpm hasta llegar a una densidad de 0.5-0.7 DO_{600nm} correspondiente a la fase exponencial del cultivo.

En algunos casos no se realizó el preinóculo, por lo que se tomaron dos colonias de las placas de LB y se inocularon directamente en los matraces de 125 mL con un volumen total de 80 mL, incubando a 37°C y 200 rpm hasta llegar a una densidad de 0.5-0.7 DO_{600nm}.

De los inóculos se tomó el volumen necesario para iniciar el cultivo en los minifermentadores de evaluación a 0.05 DO_{600nm} y se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.

5.3.2 Cultivo en minifermentadores de evaluación

Para la evaluación de la cepa silvestre y de las mutantes se determinaron parámetros cinéticos; velocidades específicas de crecimiento, consumo de glicerol y formación de productos; así como rendimientos biomasa/glicerol, productos de fermentación/glicerol, en minifermentadores de evaluación de 300 mL. Las cepas se cultivaron en 200 mL de medio mínimo mineral (descrito en Anexos) suplementado con 2 g/L de triptona, 5 mM de selenito de sodio y 10 g/L de glicerol a 37°C, 200 rpm y pH 6.3 controlado con una mezcla de NaOH 0.5 M. Las cinéticas se llevaron a cabo por triplicado.

5.4 Métodos analíticos

5.4.1 Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa celular se cuantificó como densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro *Thermo Scientific GENESYS 10S UV-VIS*. Posteriormente se obtuvo la concentración de biomasa en gramos de peso celular seco (Gleizer *et al.*, 2019) utilizando la siguiente relación:

$$1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.43 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$$

5.4.2 Cuantificación de sustratos y productos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La determinación de los metabolitos (etanol, formiato, succinato, acetato, lactato y glicerol) por HPLC se llevó a cabo utilizando H₂SO₄ 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.4 mL/min en dos columnas acopladas *Aminex HPX-87H* a temperatura interna de 50°C y una externa de 45°C. La detección se hizo simultáneamente con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). La determinación se realizó mediante la comparación de las áreas bajo la curva de los analitos y los estándares donde el análisis y el procesamiento de datos se hizo mediante el sistema *Empower 2 (Waters Corporation)*.

La preparación de las muestras para ser analizadas en el equipo de HPLC se realizó por medio de filtración, donde los sobrenadantes fueron filtrados con membranas de 0.45 µm.

5.4.3 Determinación de CO₂ y H₂ por balance estequiométrico

La cuantificación de CO₂ e H₂ no se realizó por un método cromatográfico, sin embargo, se realizó una aproximación de la producción de estos metabolitos por balance estequiométrico como se ha hecho en trabajos anteriores (Dharmadi *et al.*, 2006; Yazdani y Gonzalez, 2008). La producción de H₂ y de CO₂ fue calculada por la diferencia de la concentración molar de formiato menos la suma de las concentraciones de etanol y acetato. La relación anterior se asume de acuerdo con que en anaerobiosis la vía de asimilación de piruvato es por la enzima piruvato formiato liasa (PFL) (véase Figura 3), teniendo una actividad nula de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH).

$$\text{moles de H}_2 = \text{moles de etanol} + \text{moles de acetato} - \text{moles de formiato}$$

$$\text{moles de CO}_2 = \text{moles de etanol} + \text{moles de acetato} - \text{moles de formiato}$$

5.5 Parámetros cinéticos y estequiométricos

Los parámetros evaluados fueron la velocidad específica de crecimiento μ , rendimiento biomasa/sustrato $Y_{X/S}$, rendimiento producto/sustrato $Y_{P/S}$ y consumo volumétrico de glicerol Q_s . Estos parámetros se calcularon de acuerdo con los datos obtenidos para las curvas de crecimiento, consumo de glicerol y producción de metabolitos. La concentración de biomasa,

sustrato consumido y productos obtenidos fueron corregidos en función al volumen de base adicionado a cada tiempo para controlar el pH mediante un factor de dilución (FD).

$$FD = \frac{(V_i + V_B)}{V_i} \quad (1)$$

Donde:

V_i = Volumen de trabajo inicial

V_B = Volumen de base adicionada

5.5.1 Velocidad específica de crecimiento (μ)

La μ se calculó con base en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria. Para lo anterior, se graficó el logaritmo natural de los datos de crecimiento contra el tiempo y se hizo una regresión lineal de los datos correspondientes a la fase exponencial. La pendiente de dicha regresión corresponde a μ .

$$\mu = \frac{(\ln(\text{Biomasa final}) - \ln(\text{Biomasa inicial}))}{\text{tiempo final} - \text{tiempo inicial}} \quad (2)$$

5.5.2 Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$)

El $Y_{X/S}$ se calculó como la biomasa neta producida ($X_f - X_i$) durante todo el transcurso de la fermentación, dividido por la fuente de carbono neta consumida ($S_i - S_f$).

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad (3)$$

5.5.3 Rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$)

El ($Y_{X/S}$) se calculó como se describió en la sección anterior, pero ahora para el caso de los productos de fermentación netos.

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (4)$$

5.5.4 Consumo volumétrico de glicerol (Q_S)

El Q_S se calculó como el glicerol neto consumido en la fermentación, dividido por el tiempo total de fermentación.

$$Q_s = \frac{(S_f - S_i)}{(t - t_0)} \quad (5)$$

Los datos presentados en la gráficas y tablas se obtuvieron a partir de tres réplicas. La desviación estándar se calculó y muestra para todos los puntos en las cinéticas y en los valores de los parámetros en las tablas. En el caso de las gráficas, si la desviación es menor que el tamaño del símbolo, las barras no se muestran.

5.6 Determinación de actividad enzimática de DhaK

5.6.1 Obtención de extracto celular

Las células fueron cosechadas de los mini-fermentadores durante la fase exponencial por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. A continuación, se lavaron 2 veces en amortiguador de cosecha y permeabilización Hepes 100 mM pH 7.5. Posteriormente, los paquetes celulares se resuspendieron en 1 mL de lizozima (1 mg/mL) y se dejaron por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se sonicaron (Sonicador Soniprep 150) con 3 pulsos de 10 s cada uno con una amplitud del 70%, separando cada pulso con 30 s y manteniéndolos en hielo con etanol. Finalmente, se removieron los restos celulares centrifugando 30 minutos a 12,000 rpm y a 4°C. El extracto crudo resultante se usó para determinar la actividad enzimática inmediatamente después.

5.6.2 Ensayo de actividad enzimática

El ensayo de actividad para la enzima DhaK, encargada de la fosforilación de dihidroxiacetona utilizando PEP o ATP dependiendo de la enzima, se realiza acoplado la reacción con la conversión de dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato por acción de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa utilizando NADH como cofactor, por lo que se monitorea la oxidación de NADH a 340 nm.

Para lo anterior, se prepara 1 mL de ensayo enzimático conteniendo:

- Amortiguador Hepes (50 mM; pH 7.5)
- MgCl₂ (2.55 mM)
- NADH (0.25 mM)
- ATP o PEP (1 mM)
- Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (1.7 unidades)
- DHA (25 mM)
- Extracto celular

5.7 Modelamiento a escala genómica

Las cepas obtenidas se evaluaron por análisis de balance de flujos (*FBA* por sus siglas en inglés) utilizando el modelo iJO1366, el cual se basa en la reconstrucción de la red metabólica de *E. coli* K-12 MG1655 (Orth *et al.*, 2011). Este modelo cuenta con 1366 genes, 2251 reacciones metabólicas y 1136 metabolitos. La metodología se basa en un algoritmo de programación lineal donde la función objetivo inicial es la producción de biomasa y las restricciones son una serie de ecuaciones que corresponden al balance de masas de cada metabolito, así como las tasas de consumo y producción calculadas experimentalmente.

Los análisis computacionales se llevaron a cabo usando *Cobra Toolbox* 3.0 en MATLAB 2022. El primer paso fue evaluar las cepas y calcular los flujos en unidades de mmol/g_{DCW} h, después se realizó el análisis y ajuste del modelo, así como la restricción de las reacciones con los flujos obtenidos experimentalmente y las condiciones de cultivo. Finalmente se realizaron las simulaciones y se analizaron los resultados.

Las simulaciones se llevaron a cabo con las restricciones siendo los límites superiores e inferiores de +10% y -10% respectivamente de los flujos calculados experimentalmente. Mientras que el intercambio de O₂ y de algunas otras reacciones aerobias se restringió a 0 mmol_{Gly}/g_{DCW} h.

6. Resultados y discusión

6.1 Crecimiento de *E. coli* MG1655 y generación de productos de fermentación utilizando glicerol como fuente de carbono

La cepa de *E. coli* MG1655 se evaluó en minifermentadores a un volumen de 200 mL de medio mineral suplementado con 10 g/L de glicerol, 2 g/L de triptona y 5 mM de selenito de sodio. Las condiciones de cultivo fueron 37°C, 200 rpm, sin aireación y pH 6.3 controlado con NaOH 0.5 M. Después de 72 h la cepa alcanzó una densidad óptica de 1.3 DO_{600nm} (Figura 8), calculando una μ de 0.086 h⁻¹. Esta tasa de crecimiento es aproximadamente un tercio del valor obtenido con la misma cepa cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono bajo condiciones comparables de crecimiento (0.37 h⁻¹), medio mineral AM1 (sin triptona), sin aireación, pH 7 y 150 rpm (Martínez-Valenzuela, 2018).

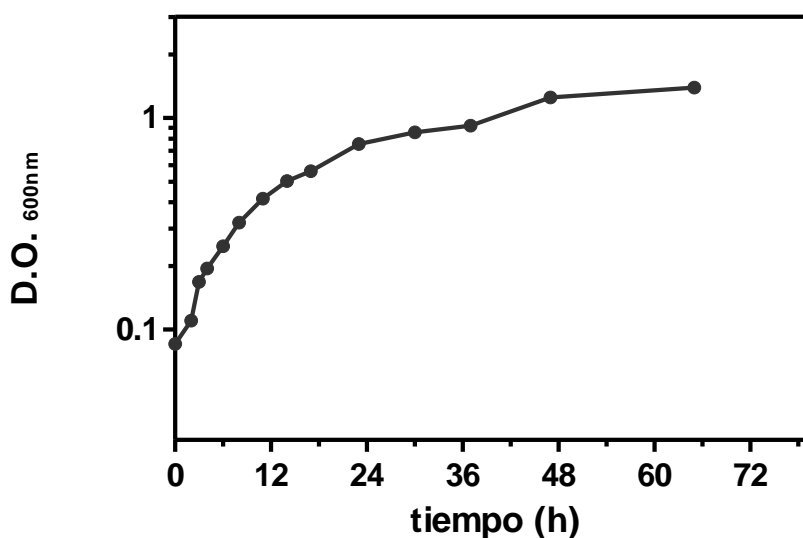


Figura 8. Cinética de crecimiento de la cepa *E. coli* MG1655. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre MG1655 representada con el logaritmo de base 10 de D.O._{600nm} a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona, calculando una μ de 0.086 h⁻¹.

Las condiciones de cultivo y la concentración de fuente de carbono se eligieron tomando como referencia el trabajo de Yazdani y Gonzalez (2008), donde se ha reportado que para el cultivo anaerobio de *E. coli* con glicerol se requiere un pH de 6.3, ya que el consumo de glicerol por *E.*

coli está ligado a la disponibilidad de CO₂ en el medio y éste incrementa su solubilidad a un pH ligeramente ácido (Dharmadi *et al.*, 2006). La disponibilidad de CO₂ también es importante debido a que es sustrato de varias reacciones durante el crecimiento de *E. coli*, como por ejemplo la síntesis de ácidos grasos y para la formación de moléculas del metabolismo central (oxalacetato) (Murarka *et al.*, 2008). Por otro lado, la fermentación de glicerol se favorece al utilizar sales de sodio en lugar de las sales de potasio (Blankschien *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2008a), por lo que el medio mínimo descrito por Neidhart se modificó cambiando las sales de potasio por sodio.

Se consideran condiciones anaerobias a pesar de que no existe un control directo del oxígeno disuelto y los minifermentadores no se encuentran completamente sellados. Sin embargo, se utilizó un volumen total de 200 mL de medio dejando el cabezal de los minifermentadores reducido de modo que después de las primeras horas de fermentación el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio es prácticamente cero. Además, analizando los productos de la fermentación de *E. coli* se producirán gases como CO₂ e H₂ por lo que el oxígeno será desplazado eventualmente. La velocidad específica de consumo de oxígeno por *E. coli* está en el intervalo de 12 a 15 mmolO₂/g_{DCWH}, de tal manera que el oxígeno disuelto al inicio del cultivo a 37 °C es consumido por las células en aproximadamente dos horas.

En cuanto a la regulación de la expresión de los genes que codifican para las enzimas encargadas de la producción de H₂ y etanol, el gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa, encargada de la producción de etanol y CO₂, requiere condiciones anaerobias. El complejo enzimático FHL (formiato hidrógeno liasa) se encarga de la producción de CO₂ e H₂ a partir del formiato. En trabajos anteriores se ha descrito que FHL presenta su mayor actividad a un pH de 6.3 (Dharmadi *et al.*, 2006) y requiere cofactores como el molibdato y el selenito (Murarka *et al.*, 2008; Yazdani y Gonzalez, 2007).

La Figura 9 muestra el perfil de metabolitos durante la fermentación de la cepa silvestre MG1655, así como el consumo del glicerol. Después de 72 h de cultivo se consumieron 6.86 g/L de glicerol. En cuanto a los metabolitos, el etanol se produjo en mayor cantidad (2.34 g/L), seguido de

formiato (1.25 g/L), succinato (0.56 g/L) y acetato (0.53 g/L). El perfil de metabolitos (ver Figura 9) es similar a lo reportado en trabajos anteriores (Zhang et al., 2010).

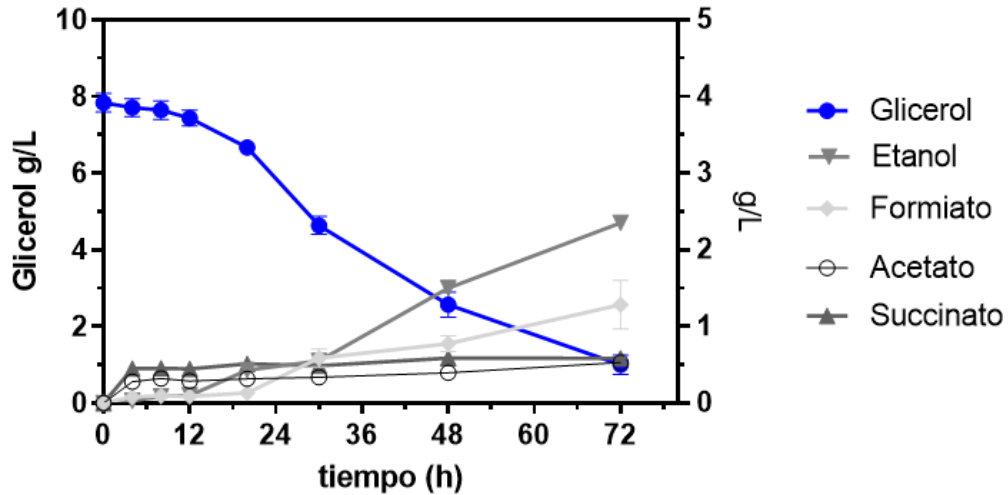
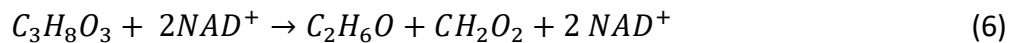


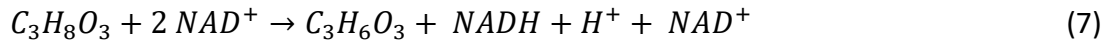
Figura 9. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de *E. coli* MG1655. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo, mientras que los metabolitos cuantificados en g/L (etanol, formiato, acetato y succinato) tienen su eje del lado derecho.

Durante la asimilación de glicerol y su conversión a piruvato se producen dos equivalentes reductores NADH, las cuales se oxidan en la vía de obtención de etanol regenerando así el NAD⁺ requerido para diversos procesos celulares, convirtiendo esta fermentación en un proceso con balance redox. Lo anterior se ejemplifica en la reacción (6), donde por cada molécula de glicerol se obtiene una molécula de etanol y una de formiato con balance redox, ya que se regeneran ambos equivalentes reductores, además de que existe un balance entre los carbonos.

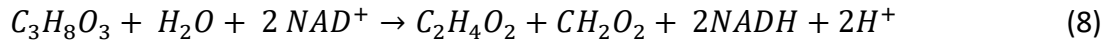


Lo anterior también explica por qué no se produce lactato, recordando que en la conversión de piruvato a lactato solo se consume un equivalente reductor. La reacción (7) muestra que solo un equivalente reductor es regenerado a NAD⁺, mientras que otro queda en su forma reducida provocando un desbalance redox en la célula, lo que es tóxico para la célula ya que puede afectar

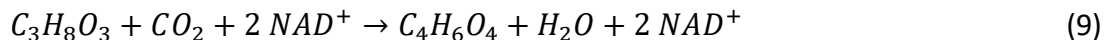
el funcionamiento de distintas enzimas, limitar la producción de ATP y generar cambios negativos en la expresión génica, lo que compromete el crecimiento celular.



En cuanto a los demás metabolitos producidos, también podemos analizarlos por balance de carbonos. La conversión de glicerol a acetato o a succinato produce dos moléculas de ATP, a diferencia de los demás metabolitos que solo producen una molécula de ATP. Por lo que la obtención de acetato y succinato es deseable al aportar energía a la célula. Sin embargo, en cuanto a la producción de acetato tenemos un desbalance redox, ya que no se regeneran los equivalentes reductores (reacción 8). Esto podría explicar la cantidad de acetato producida, la cual es menor que la del etanol.



Por otro lado, la ruta de producción de succinato presenta balance redox (se regeneran ambos NAD^+), lo que podría ser un producto deseable en el consumo de glicerol (9). Sin embargo, esta ruta involucra el consumo de una molécula de CO_2 , por lo que su generación depende de la disponibilidad de CO_2 en el medio. Otro aspecto por analizar es que un precursor en la síntesis de succinato es el fosfoenolpiruvato (PEP), el cual también es utilizado como molécula energética en distintos procesos, como la conversión de dihidroxiacetona (DHA) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP), la cual es de las primeras reacciones en la asimilación de glicerol a piruvato. Dado lo anterior, el flujo hacia la producción de succinato se puede ver limitado por la baja disponibilidad de PEP.



El balance general de los moles de productos generados respecto a los moles de glicerol consumido queda de la siguiente manera:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 6.86 | → | 2.34 | + | 1.25 | + | 0.56 | + | 0.53 | + | 1.43 | + | 0.07 | + | 0.00 | 6.18 |
| mmoles | 74.49 | → | 50.79 | + | 27.13 | + | 4.74 | + | 8.83 | + | 32.49 | + | 32.49 | + | 0.00 | 156.46 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas, con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.43; Etanol, 0.15; Formiato, 0.54; Succinato, 0.02; Acetato, 0.06.

Del lado izquierdo tenemos el glicerol consumido tanto en g/L como en mmoles/L consumidos durante la fermentación y del lado derecho el perfil de los productos. La cantidad de gramos consumidos de glicerol corresponde a 6.86 g, por lo que, haciendo un balance de masas, se espera que la cantidad de gramos producidos sea similar a la masa consumida. De acuerdo con la sumatoria de los gramos de los metabolitos cuantificados, la masa obtenida difiere en aproximadamente 10% respecto a la masa consumida. Esto puede deberse a errores experimentales desde el pipeteo hasta la cuantificación en HPLC o al consumo de algunos aminoácidos presentes en el medio de cultivo (en los 2 g/L de Triptona) y metabolizados a productos de formación y biomasa de *E. coli*.

El acetato y el succinato no fueron productos principales de fermentación. Sin embargo, se pretende dirigir el flujo de carbono del glicerol solamente hacia etanol e H₂, por lo que se optó por eliminar los genes que codifican para las enzimas encargadas de la producción de succinato y acetato. De modo que en una fermentación ideal donde se consuman los 10 g/L de glicerol, se obtengan 5 g/L de etanol y 5 g/L de formiato suponiendo que son los productos de fermentación deseados. En las siguientes reacciones podemos analizar la cantidad de moles consumidos y producidos de acuerdo con este supuesto, donde se recupera en los productos la totalidad de moles de sustrato.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 10 | → | 5 | + | 5 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | 10 |
| mmoles | 108.59 | → | 108.53 | + | 108.53 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 0.00 | 217.06 |

Los productos de fermentación deseados son etanol e H₂, por lo que suponiendo que el total de los moles de formiato se convierten en CO₂ e H₂, tendríamos el siguiente balance:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 10 | → | 5 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 4.78 | + | 0.22 | + | 0 | 10 |
| mmoles | 108.59 | → | 108.53 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | 108.53 | + | 108.53 | + | 0.00 | 325.59 |

6.2 Construcción y evaluación de las cepas mutantes obtenidas

6.2.1 Eliminación del gen *pta* en *E. coli* MG1655

El gen *pta* se eliminó del cromosoma de *E. coli* mediante transducción por fagos a partir de un lisado de la cepa de la colección de Keio ($\Delta pta::FRT-Km-FRT$). Se seleccionaron las candidatas que mostraron el fenotipo de resistencia a kanamicina después de la transducción, a partir de estas se amplificó la región correspondiente al gen *pta* usando oligonucleótidos externos a ésta (Fw-*pta* y Rv-*pta*). Si la recombinación funciona de la manera deseada, lo que se amplifica es el casete de resistencia a kanamicina en lugar del gen *pta* nativo de *E. coli*. También se amplificó una región interna mediante el uso de un oligonucleótido externo con uno de los oligonucleótidos internos al casete de kanamicina (k1 y k2). Como control se tomó la cepa silvestre MG1655 y se utilizaron los mismos oligonucleótidos mencionados anteriormente.

La Figura 10 muestra la separación de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa. En esta figura, el carril 4 muestra que la cepa obtenida por transducción con fagos tiene el casete de kanamicina en la región donde estaba el gen *pta* con un tamaño de 1525 pb. El carril 5 corresponde a la banda obtenida a partir de un oligonucleótido interno k1 y el oligonucleótido externo Fw-*pta*, corroborando así que el casete de resistencia a kanamicina se encuentra en la región deseada.

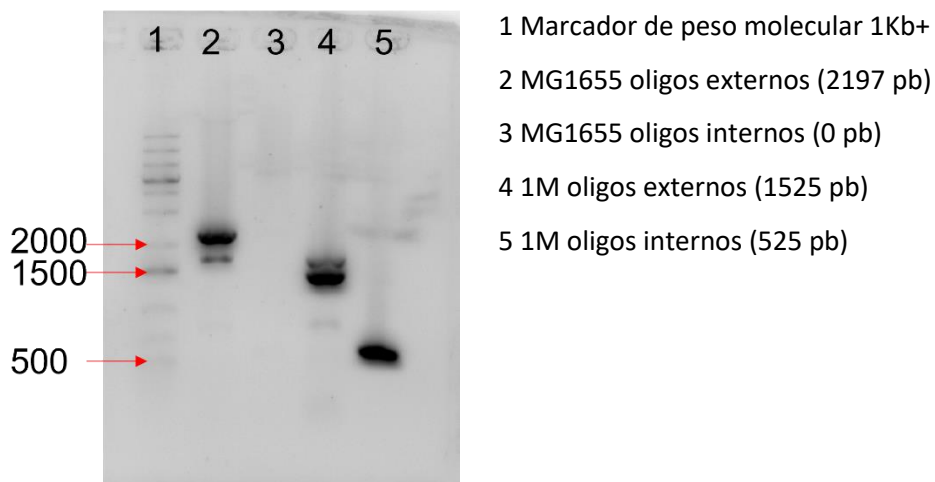


Figura 10. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen *pta* en la cepa *E. coli* MG1655. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Producto amplificado por los oligos *Fw-pta* y *Rv-pta* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre (control del tamaño de la región nativa), 3) Producto amplificado por los oligos *Fw-pta* y *k1* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre (control negativo), 4) Producto amplificado por los oligos *Fw-pta* y *Rv-pta* del DNA genómico de la cepa 1M, 5) Producto amplificado por los oligos *Fw-pta* y *k1* del DNA genómico de la cepa 1M.

Posteriormente, se eliminó el casete de resistencia a kanamicina para poder realizar la siguiente deleción genética. Esta eliminación se llevó a cabo por medio del plásmido pCP20, que expresa la enzima flipasa y reconoce los sitios FRT, los cuales flanquean al gen de kanamicina. Una vez eliminado este casete, se procedió con la siguiente eliminación.

6.2.2 Eliminación del gen *frdA* en *E. coli* MG1655 Δ *pta*

En condiciones anaerobias el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se bifurca en una rama oxidativa y en una rama reductora (Vuoristo *et al.*, 2016). La rama oxidativa comienza con la formación de oxalacetato a partir de fosfoenolpiruvato, seguido de la formación de malato, fumarato y finalmente succinato. Se optó por eliminar la producción de succinato con la mitigación de la expresión de la enzima encargada de la formación de fumarato a succinato *frdA*, ya que los metabolitos antes mencionados son necesarios para la producción de intermediarios que puedan ser requeridos por la célula, por ejemplo, aminoácidos.

El gen *frdA* se eliminó de igual manera por transducción con fagos, pero en este caso se utilizó la cepa de la colección de keio $\Delta frdA::FRT-Km-FRT$. Se seleccionaron dos candidatas que mostraron el fenotipo de resistencia a kanamicina, de las cuales se les amplificó por PCR la región correspondiente al gen *frdA* del genoma de *E. coli* utilizando los oligonucleótidos Fw-*frdA* y Rv-*frdA*. También se amplificaron las regiones comprendidas entre Fw-*frdA* y k1, así como un control utilizando la cepa silvestre MG1655.

La Figura 11 muestra la resolución de los productos obtenidos por PCR por electroforesis en gel de agarosa, donde en el carril 2 encontramos el control correspondiente a la cepa silvestre MG1655 que contiene integro el gen *frdA*. En los carriles 3 y 5 se muestra la amplificación correspondiente a la misma región antes mencionada de las mutantes y se observa efectivamente que hay un cambio en el tamaño del amplicón respecto al control, y también los carriles 4 y 6 muestran la banda amplificada a partir de uno de los oligonucleótidos internos, por lo que confirmamos que en lugar del gen *frdA*, las candidatas contienen el casete de kanamicina. Se seleccionó la mutante correspondiente a los carriles 5 y 6.

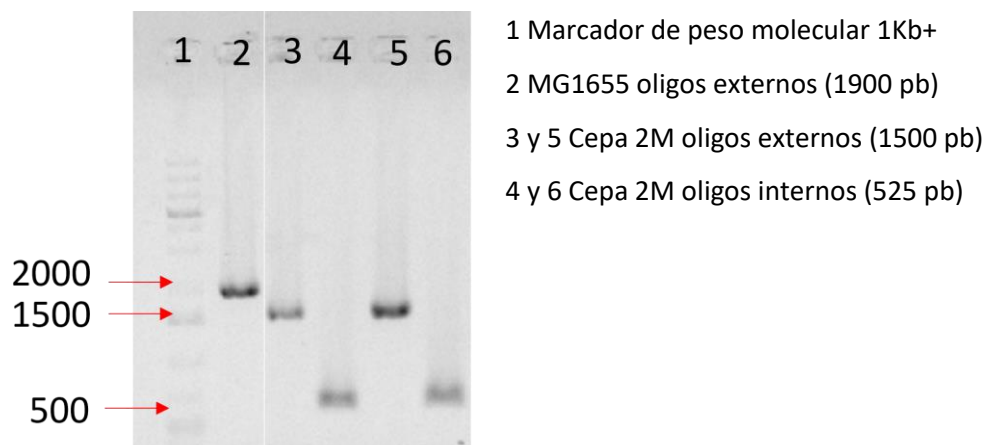


Figura 11. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen *frdA* en la cepa 1M. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Producto amplificado por los oligos Fw-*frdA* y Rv-*frdA* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre (control del tamaño de la región nativa), 3) y 5) Producto amplificado por los oligos Fw-*frdA* y Rv-*frdA* del DNA genómico de la cepa 2M, 4) y 6) Producto amplificado por los oligos Fw-*frdA* y k1 del DNA genómico de la cepa 2M.

Finalmente se eliminó el casete de kanamicina de la doble mutante utilizando el plásmido pCP20. Se confirmó la eliminación del casete por una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos

externos al gen *frdA* y de acuerdo con la Figura 12, en el carril 3 solo queda la cicatriz correspondiente de los sitios FRT que es de 75 pb. De igual manera se utilizó un control con la cepa silvestre.

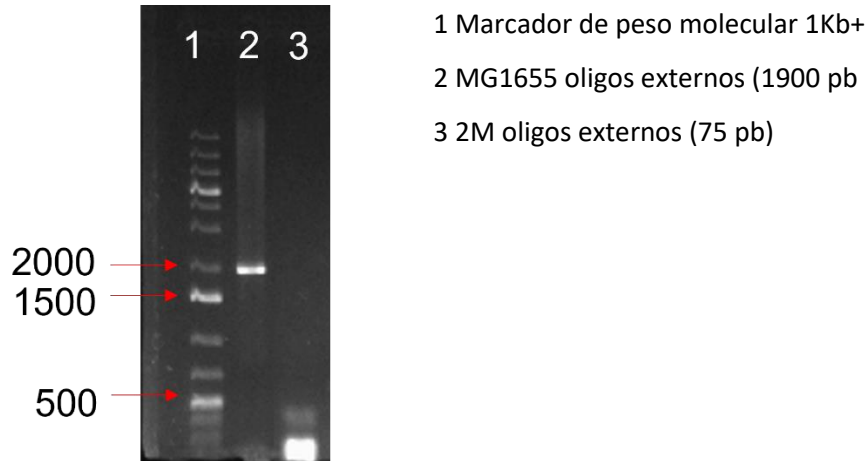


Figura 12. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del casete de kanamicina de la cepa 2M. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Producto amplificado por los oligos *Fw-pta* y *Rv-pta* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre (control del tamaño de la región nativa), 3) Producto amplificado por los oligos *Fw-pta* y *Rv-pta* del DNA genómico de la cepa 2M después de transformar y curar a la cepa con el plásmido pCP20.

6.2.3 Crecimiento y productos de fermentación por las cepas *E. coli* MG1655 Δ *pta* y MG1655 Δ *pta* Δ *frdA* utilizando glicerol

Las mutantes obtenidas en este trabajo a partir de la cepa MG1655 de *E. coli* se evaluaron en minifermentadores con las mismas condiciones de cultivo previamente mencionadas. Sin embargo, la generación del inóculo se realizó de dos maneras diferentes; con preinóculo y sin preinóculo (descrito en metodología). Lo anterior para evaluar si la cepa se comportaba de la misma manera en ambas condiciones. En la Figura 13 se observa la cinética de crecimiento a partir de un preinóculo mientras que la Figura 14 muestra el comportamiento cinético de las mutantes partiendo solamente de un inóculo. Ambas figuras muestran que la realización de un preinóculo permite a las mutantes adaptarse a las condiciones de cultivo, evitando así la formación de una fase lag en los minifermentadores. Otra diferencia importante es la densidad óptica alcanzada, en ambos casos no se alcanzó la máxima densidad óptica de la cepa silvestre

(1.3 DO_{600nm}). Sin embargo, la densidad óptica de las cepas 1M y 2M fue mayor sin la generación de un preinóculo (1 DO_{600nm} y 0.8 DO_{600nm} respectivamente).

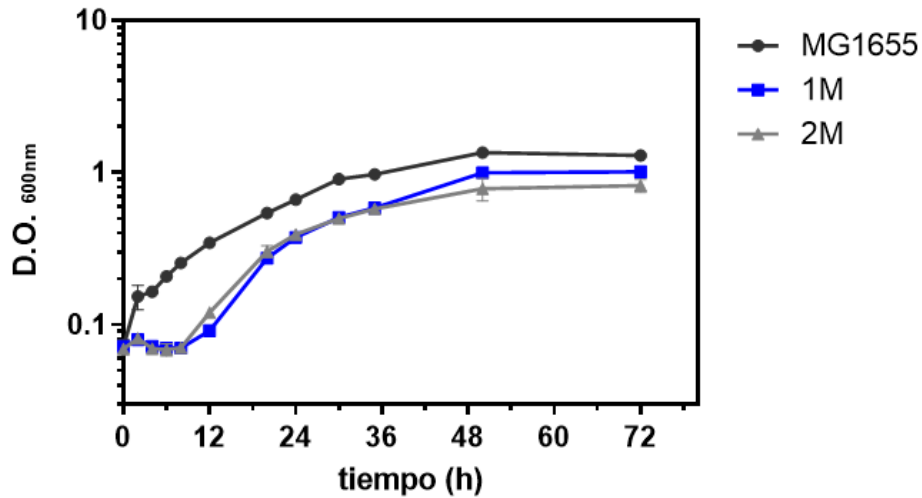


Figura 13. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, 1M y 2M sin generación de preinóculo. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre MG1655 (color negro), 1M (color azul) y 2M (color gris) representadas con el logaritmo de la D.O._{600nm} a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona calculando una μ de 0.086 h^{-1} , 0.084 h^{-1} y 0.085 h^{-1} respectivamente. En las cepas 1 M y 2M hay una fase de latencia durante casi 12 horas.

Por otro lado, la μ también fue diferente en ambos casos. Para el caso de 1M con preinóculo fue de 0.092 h^{-1} mientras que sin preinóculo fue 0.084 h^{-1} y para la cepa 2M con preinóculo fue de 0.090 h^{-1} a diferencia de 0.085 h^{-1} sin preinóculo. La diferencia entre ambas μ es mínima, pero se optó por llevar a cabo los análisis con las cinéticas con preinóculo, lo anterior para eliminar la fase de latencia.

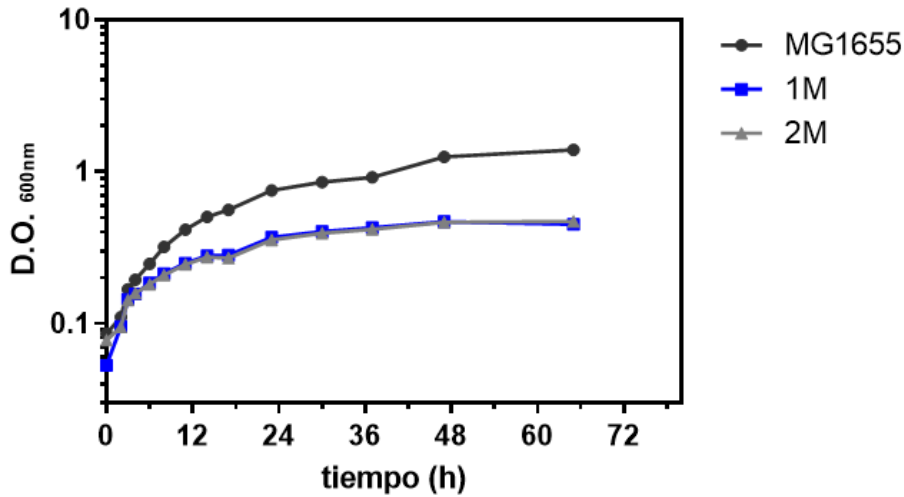
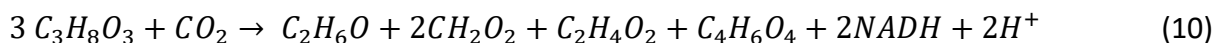


Figura 14. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, 1M y 2M a partir de preinóculo. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre MG1655 (color negro), 1M (color azul) y 2M (color gris) representadas con el logaritmo de la D.O.600nm a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona calculando una μ de 0.086 h^{-1} , 0.092 h^{-1} y 0.090 h^{-1} respectivamente.

La Figura 15 muestra el perfil de metabolitos durante la fermentación de la cepa 1M así como el glicerol residual. A diferencia de la cepa silvestre que lograba casi el consumo total de la fuente de carbono, esta mutante dejó un remanente de glicerol de casi 4 g/L después de 72 h de fermentación, lo que indica un consumo de la fuente de carbono más lento respecto a la cepa silvestre. En cuanto a los metabolitos, se observa que el perfil de los metabolitos cambia al eliminar una ruta metabólica. A diferencia de lo esperado, se produce lactato como producto mayoritario, seguido de etanol, formiato y succinato. Debido a la eliminación del gen *pta*, no se observa formación de acetato. La vía de formación de acetato proporciona a la célula una molécula de ATP por la enzima codificada por el gen *ackA* que tiene como sustrato el acetil fosfato y como producto el acetato. El hecho de que no se produzca una molécula de ATP afecta a la célula en su crecimiento y velocidad de consumo de la fuente de carbono.

El balance de los metabolitos producidos en el metabolismo de *E. coli* silvestre queda de la siguiente manera:



Existe un desbalance redox, ya que dentro de los productos encontramos equivalentes reductores NADH que no se regeneran debido a la producción de acetato como se explicó en la sección anterior. Las moléculas de ATP generadas corresponden a la vía de acetato, así como a la de producción de succinato, por lo que la eliminación de ambas vías elimina también la producción de ATP.

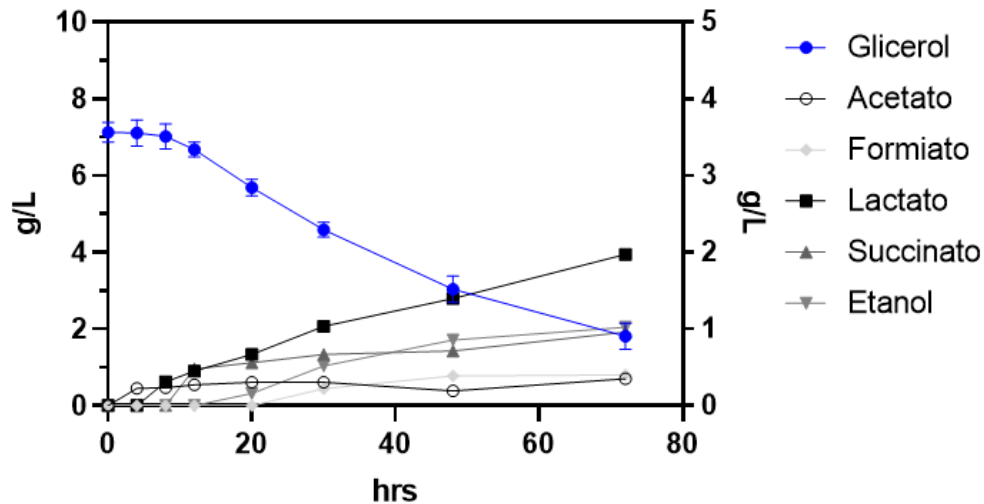


Figura 15. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa 1M. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo, mientras que los metabolitos cuantificados en g/L (etanol, formiato, acetato y succinato) tienen su eje del lado derecho.

Por otro lado, el lactato no estaba presente dentro de los metabolitos producidos por la cepa silvestre bajo las mismas condiciones de fermentación, a diferencia del caso de la mutante MG1655 Δpta , donde el lactato es el producto dominante de la fermentación. La producción de lactato genera un desbalance redox a partir de glicerol como fuente de carbono, como podemos ver en la reacción anterior, por lo que no era esperada la obtención de lactato como producto mayoritario. Dado lo anterior, una posible explicación de su producción podría ser por la contribución del oxígeno disuelto en el medio en la oxidación de los equivalentes reductores NADH obteniendo así el balance redox (Zhang et al., 2010). Sin embargo, el oxígeno disuelto en el medio al inicio del cultivo a 37°C es de 7 ppm (7 mg/L) que corresponde a 0.22 mmol/L y la velocidad específica de consumo de oxígeno por *E. coli* es de entre 12 y 15 mmol_{O2}/g_{DCW}h. Si al inicio del cultivo se tienen 0.05 DO_{600nm} de células, se metabolizarían 0.258 mmol_{O2} en una hora

(recordando que 1 DO_{600nm} equivale a 0.43 g_{DCW}/L), por lo que el oxígeno presente en el cabezal de los reactores y en el medio se consumiría en las primeras dos horas máximo (Martínez García, 2020). Lo anterior está respaldado en el laboratorio por ensayos con resazurina, el cual es un indicador redox que pierde la coloración azul cuando está en un ambiente anaerobio. Esta coloración se pierde después de una hora de cultivo en los minifermentadores.

Otra explicación puede ser una acumulación de piruvato y por lo tanto de equivalentes reductores, lo que forzaría al metabolismo a un consumo de los metabolitos anteriores siendo la producción de lactato la vía inmediata. El piruvato puede irse hacia la formación de lactato o de acetil-CoA, lo cual está mediado por las enzimas LdhA y PflB respectivamente. La afinidad (Km) de estas enzimas por piruvato es de 7.2 mM para LDH (pH 7.5 y 23°C) y 2 mM para PFL (pH 7.4-7.8 y 30°C) (Knappe *et al.*, 1969; Tarmy y Kaplan, 1968), lo que indica una conversión preferencial de piruvato a acetil-CoA. La inducción de la transcripción de *pflB* involucra la unión de dos factores de transcripción (FNR y ArcB), los cuales están regulados por O₂ y el balance redox (relación entre NADH/NAD⁺) en el medio. Por el contrario, *ldhA* no es regulado por FNR, solo por el sistema ArcB y otros genes involucrados en el control del metabolismo de carbohidratos (*csrAB* y *mfc*). La afinidad de la enzima LDH por piruvato se ve afectado por el pH, donde a pH básico el valor de Km aumenta. Por lo que el pH utilizado en este trabajo podría estar beneficiando la producción de lactato.

La Figura 16 muestra el perfil de metabolitos de la cepa 2M en las condiciones de fermentación mencionadas. El consumo de glicerol de la doble mutante tampoco fue eficiente comparado con la cepa silvestre, dejando sin consumir 4.8 g/L de glicerol después de 72 h de fermentación. En cuanto a los metabolitos, el perfil de producción es similar a los de la mutante simple donde también se observa como producto principal el lactato. La producción de etanol y formiato disminuyó respecto a la mutante simple, lo que se explica por la menor cantidad de glicerol consumido. Con respecto al objetivo de la eliminación, podemos concluir que sí se cumplió ya que se logró la eliminación de la producción de succinato.

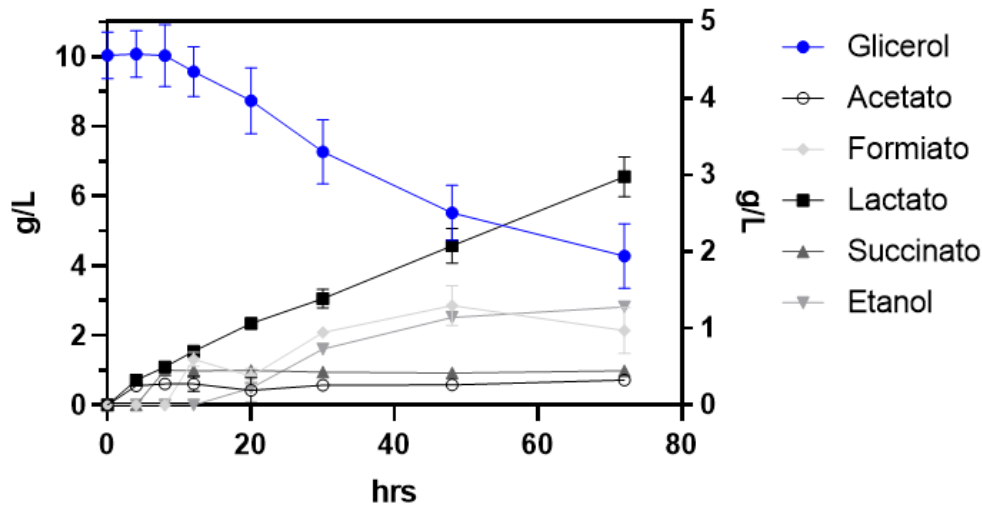


Figura 16. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa 2M. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo, mientras que los metabolitos cuantificados en g/L (etanol, formiato, acetato y succinato) tienen su eje del lado derecho.

Balance general de la cepa 1M:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 5.32 | → | 1.03 | + | 0.39 | + | 0.95 | + | 0.34 | + | 0.86 | + | 0.04 | + | 1.99 | 5.60 |
| mmoles | 57.77 | → | 22.36 | + | 8.47 | + | 8.04 | + | 5.66 | + | 19.55 | + | 19.55 | + | 22.09 | 105.73 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas, con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.26; Etanol, 0.01; Formiato, 0.04; Succinato, 0.04; Acetato, 0.04; Lactato, 0.07.

Balance general de la cepa 2M:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 5.76 | → | 1.28 | + | 0.97 | + | 0.45 | + | 0.33 | + | 0.53 | + | 0.02 | + | 2.98 | 6.56 |
| mmoles | 62.56 | → | 27.81 | + | 21.15 | + | 3.81 | + | 5.42 | + | 12.07 | + | 12.07 | + | 33.07 | 115.40 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas, con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.67; Etanol, 0.07; Formiato, 0.30; Succinato, 0.03; Acetato, 0.01; Lactato, 0.26.

6.2.4 Eliminación del gen *ldhA* del cromosoma de *E. coli* para reducir la producción de lactato

Las modificaciones realizadas al cromosoma de *E. coli* evitaron que el flujo de carbono y electrones se dirija hacia acetato y succinato, los cuales son productos del metabolismo de *E. coli*.

Sin embargo, los productos de interés para este proyecto no fueron favorecidos ya que predominó la producción de lactato (Figura 16). Dado lo anterior, se optó por eliminar el gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa (*ldhA*). El gen *ldhA* también se eliminó por transducción con fagos, se utilizó la cepa de la colección de keio $\Delta ldhA::FRT-Km-FRT$ como donadora y como cepa aceptora la cepa 2M.

La Figura 17 muestra el gel de electroforesis obtenido después de la reacción de PCR para comprobar la correcta eliminación del gen *ldhA* del cromosoma de *E. coli*. En los carriles 2, 4 y 6 se muestra la amplificación del cromosoma de la cepa silvestre MG1655 con los oligos que amplifican los genes *pta*, *frdA* y *ldhA*, respectivamente, mientras que en los carriles 3, 5 y 7 se amplificaron las mismas regiones para la cepa mutante generada denominada 3M de manera que se confirma la correcta eliminación de *ldhA* y que no se alteraron las mutaciones anteriores.

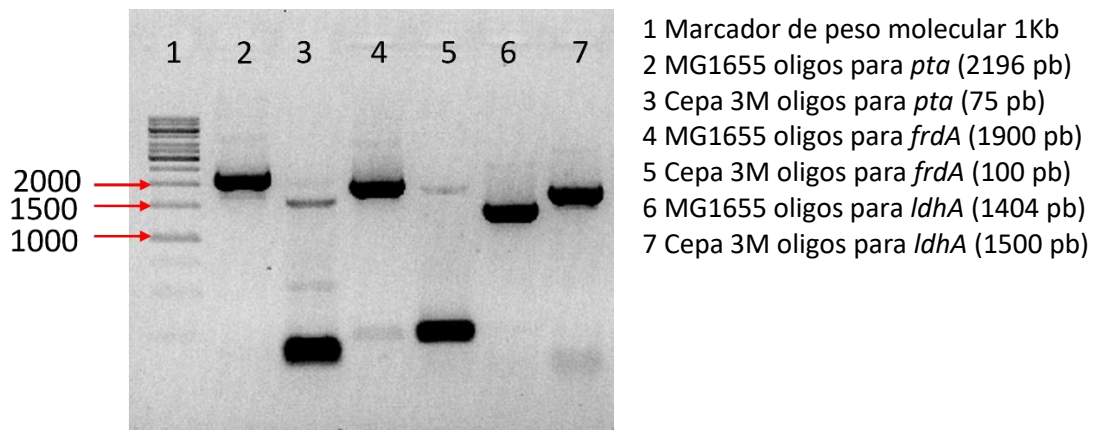


Figura 17. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen *ldhA* y las eliminaciones previas en la cepa 3M. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Producto amplificado por los oligos Fw-*pta* y Rv-*pta* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre, 3) Producto amplificado por los oligos Fw-*pta* y Rv-*pta* del DNA genómico de la cepa 3M, 4) Producto amplificado por los oligos Fw-*frdA* y Rv-*frdA* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre, 5) Producto amplificado por los oligos Fw-*frdA* y Rv-*frdA* del DNA genómico de la cepa 3M, 6)) Producto amplificado por los oligos F-*ldhA* y R-*ldhA* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre y 7) Producto amplificado por los oligos F-*ldhA* y R-*ldhA* del DNA genómico de la cepa 3M.

Posteriormente se eliminó el casete de resistencia a kanamicina, de acuerdo con lo descrito en la metodología. La Figura 18 muestra en el carril 7 que solo queda la cicatriz de los sitios FRT comparado con el control que pertenece al carril 4.

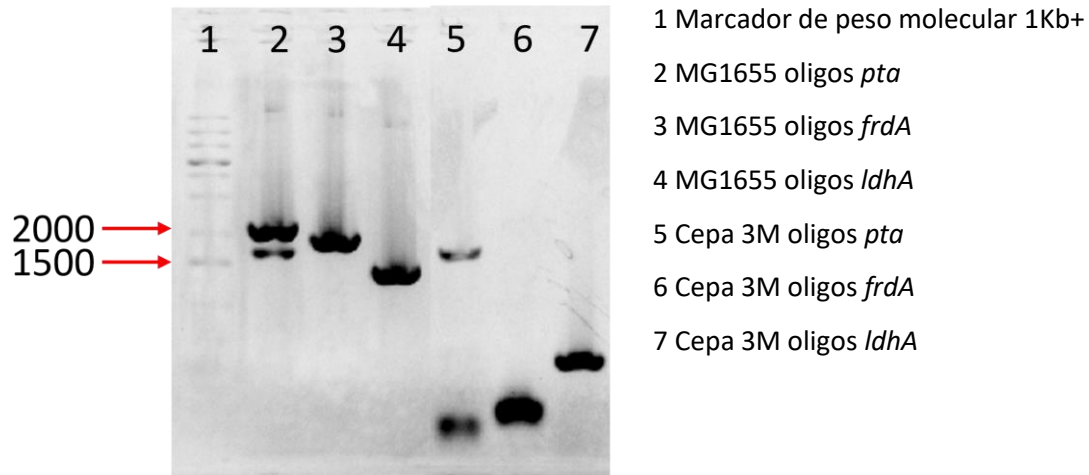


Figura 18. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del casete de kanamicina en la cepa 3M. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2), 3) y 4) Producto amplificado por los oligos Fw-*pta* y Rv-*pta*, Fw-*frdA* y Rv-*frdA* y F-*ldhA* y R-*ldhA* del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre respectivamente, 5), 6) y 7) Producto amplificado por los oligos Fw-*pta* y Rv-*pta*, Fw-*frdA* y Rv-*frdA* y F-*ldhA* y R-*ldhA* del DNA genómico de la cepa 3M.

6.2.5 Crecimiento y productos de fermentación de la cepa MG1655 $\Delta pta \Delta frdA \Delta ldhA$ utilizando glicerol

La cepa 3M se evaluó en minifermentadores, determinando la cinética de crecimiento y el perfil de los metabolitos producidos. En la Figura 19 se muestra la comparación de las mutantes y la cepa silvestre. El comportamiento de las mutantes es muy similar en el gráfico, sin embargo, el cálculo de la μ resultó ser diferente. La μ para el caso de la 3M es de 0.1083 h^{-1} , la cual es ligeramente mayor a las mutantes anteriores. Esto puede deberse al desbalance redox que genera la producción de lactato (sección 6.2.3), por lo que la tasa de crecimiento se ve favorecida al existir la regeneración de ambos equivalentes reductores producidos por la asimilación de glicerol a piruvato. También hay una ligera variación en la densidad óptica máxima alcanzada, la cual fue de $0.75 \text{ DO}_{600\text{nm}}$.

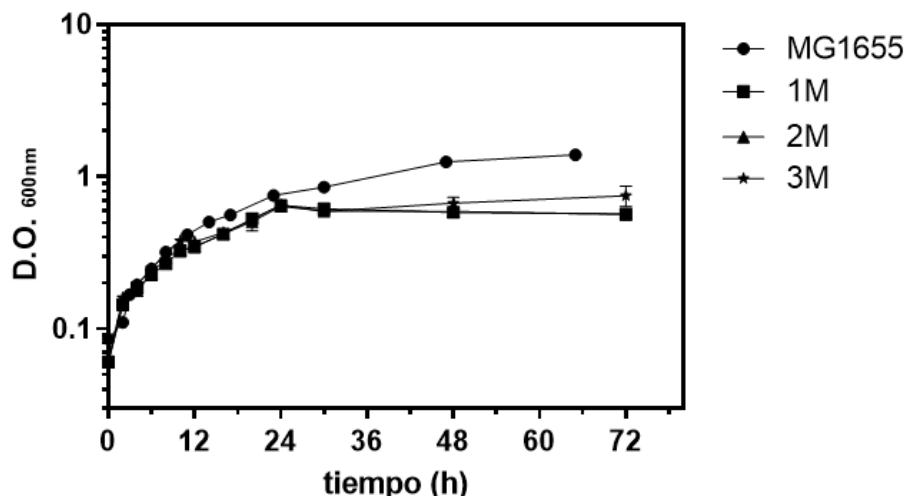


Figura 19. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, 1M, 2M y 3M. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre MG1655 (círculo), 1M (cuadrado), 2M (triángulo) y 3M (estrella) representadas con el logaritmo natural de D.O._{600nm} a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona calculando una μ de 0.086 h⁻¹, 0.092 h⁻¹, 0.090 h⁻¹ y 0.108 h⁻¹ respectivamente.

Por otra parte, el perfil de los metabolitos y el consumo de glicerol de la 3M se describe en la Figura 20. Para el caso de esta mutante el consumo de glicerol fue de solo 2.87 g en 72 horas, casi 3 gramos menos consumidos respecto a las mutantes anteriores, lo que indica la baja eficiencia de consumo de esta fuente de carbono. En cuanto al perfil de metabolitos, la eliminación de *ldhA* sí funcionó para evitar la producción de lactato, ya que la enzima Ldh se encarga de la conversión de piruvato a lactato. Dado lo anterior, los metabolitos principales fueron el etanol y el formiato. En este caso los gramos totales producidos fueron 3.29 g respecto a 2.87 g lo que corresponde a un excedente del 14.62%, el cual se puede atribuir al error experimental de acuerdo con las desviaciones estándar obtenidas.

Balance general de la cepa 3M:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|-------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 2.87 | → | 0.77 | + | 1.07 | + | 0.59 | + | 0.50 | + | 0.08 | + | 0.00 | + | 0.29 | 3.29 |
| mmoles | 31.21 | → | 16.68 | + | 23.23 | + | 4.96 | + | 8.31 | + | 1.77 | + | 1.77 | + | 0.00 | 56.71 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.33; Etanol, 0.03; Formiato, 0.35; Succinato, 0.006; Acetato, 0.02; Lactato, 0.02.

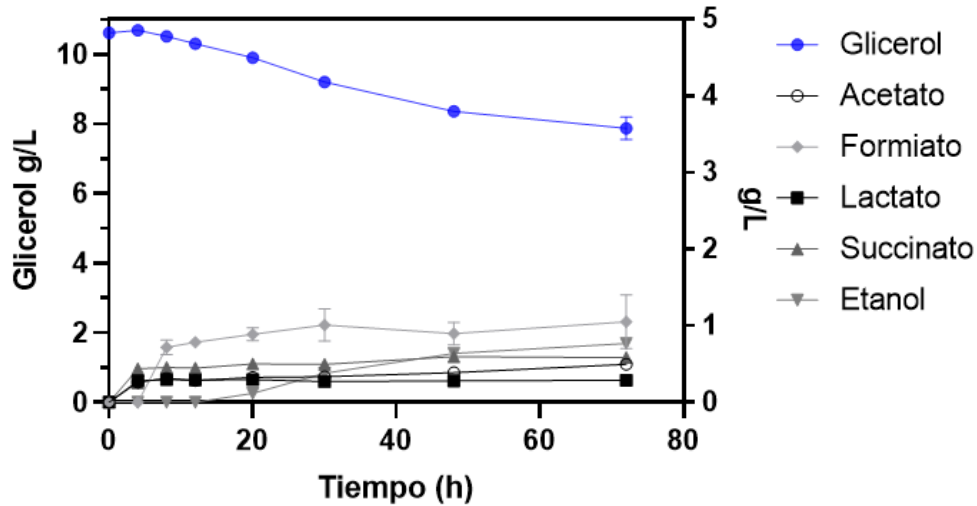


Figura 20. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa 3M. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo, mientras que los metabolitos cuantificados en g/L (etanol, formiato, acetato y succinato) tienen su eje del lado derecho.

6.3 Evaluación de cepas expresando *gldA* y *dhaKML* en vector

Las cepas de *E. coli* consumen de manera lenta el glicerol, lo cual se confirma con la evaluación de las mutantes generadas. Una estrategia que se planteó para mejorar la velocidad de consumo del glicerol es la sobreexpresión de los genes que codifican las enzimas encargadas de asimilar las moléculas de glicerol. El glicerol ingresa a las células de *E. coli* por difusión facilitada por el facilitador GlpF, después es convertido a dihidroxiacetona en condiciones de anaerobiosis por la glicerol deshidrogenasa (GldA) y finalmente por la dihidroxiacetona cinasa (DhaK) se convierte en dihidroxiacetona fosfato siguiendo con la vía de *Embden-Meyerhof-Parnas* (Figura 5). Los genes que codifican para la asimilación de glicerol en anaerobiosis son *gldA* y *dhaK* que codifican para las enzimas antes mencionadas, por lo que aumentar el número de copias de estos genes en la célula podría mejorar la velocidad de conversión de glicerol en piruvato y por lo tanto en los productos de fermentación.

6.3.1 Comprobación de vectores pZSblank, pZSgldA y pZSKLMgldA por enzimas de restricción

El grupo del Dr. González (Yazdani y Gonzalez, 2008) generó tres vectores; pZSblank como plásmido de control de carga metabólica, pZSgldA conteniendo una copia de *gldA* y pZSKLMgldA conteniendo una copia de *gldA* y una del operón *dhaKLM* nativo de *E. coli* (los mapas de los vectores se encuentran en la sección de Anexos). Estos vectores se solicitaron para probarlos en las cepas de este trabajo.

Los vectores solicitados se comprobaron utilizando enzimas de restricción. En la Figura 21 se muestra el patrón de corte utilizando las enzimas PstI y SmaI en los vectores pZSblank y pZSgldA. El vector pZSblank tiene un tamaño de 4230 pb y presenta un sitio de corte para SmaI (carril 2 de la Figura 21), mientras que no presenta sitio de corte para PstI a diferencia de pZSgldA (carril 4). El tamaño del vector pZSgldA es de 5346 pb, lo cual se comprobó con la enzima PstI en el carril 5 del gel de electroforesis.

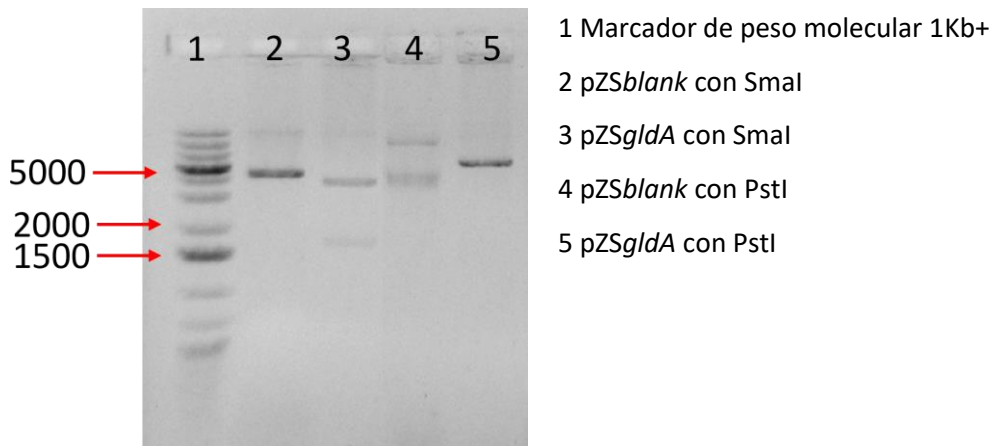


Figura 21. Gel de electroforesis para la comprobación de los vectores pZSblank y pZSgldA utilizando enzimas de restricción. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Vector pZSblank que presenta un solo sitio de corte con la enzima SmaI, 3) Vector pZSgldA que presenta dos sitios de corte con la enzima SmaI, 4) Vector pZSblank que no contiene sitio de corte con la enzima PstI (control negativo), 5) Vector pZSgldA que presenta un sitio de corte con la enzima PstI.

La Figura 22 muestra la comprobación del vector pZSKLMgldA, el cual tiene un tamaño de 8487 pb (carriles 2 y 3) mostrando un patrón de restricción generado por el corte con SmaI y con PstI respectivamente, así como la doble digestión mostrando la comprobación de corte por PstI y un

sitio XhoI. Los plásmidos antes descritos son de bajo número de copias y se construyeron a partir del plásmido pSC101.

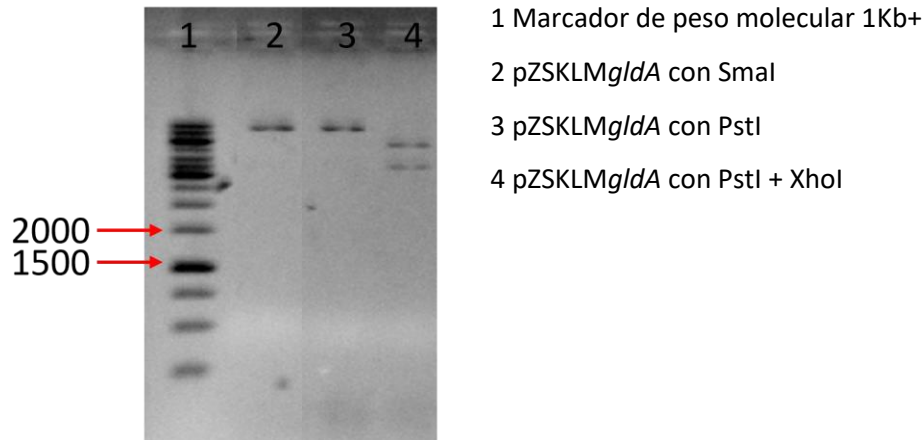


Figura 22. Gel de electroforesis para la comprobación del vector pZSKLMgldA utilizando enzimas de restricción. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Vector pZSKLMgldA que presenta un solo sitio de corte con la enzima SmaI, 3) Vector pZSKLMgldA que presenta un sitio de corte con la enzima PstI, 4) Vector pZSKLMgldA con las enzimas PstI y XhoI por doble digestión generando dos sitios de corte.

6.3.2 Evaluación de cepas transformadas con plásmido pZSKLMgldA

El plásmido pZSKLMgldA se utilizó para transformar las cepas MG1655 y 3M; primero se generaron células electrocompetentes y se transformaron con 50 ng a 2500V recuperando durante 2 horas. El casete de resistencia de cloranfenicol presente en los plásmidos se utilizó como factor de selección para plaquear las células. Las cepas que se obtuvieron se crecieron en LB líquido y se realizó una miniprep de lisis alcalina para comprobar la correcta transformación con el plásmido, una vez que se comprobó por digestión el patrón de corte se procedió a evaluar las cepas en minifermentadores.

La Figura 23 muestra la cinética de crecimiento de las cepas MG1655 y 3M sin plásmido y transformadas con el plásmido pZSKLMgldA. La cinética de crecimiento es muy similar entre las cepas, sin embargo, calculando las μ sí presentan ligera diferencia. En el caso de la cepa silvestre, el plásmido pZSKLMgldA no presentó una ventaja comparada con la silvestre sin transformar. En cuanto a μ , fue de 0.10 h^{-1} para la MG1655 pZSKLMgldA a diferencia de 0.086 h^{-1} calculado

anteriormente para la cepa silvestre. Sin embargo, la cantidad de glicerol consumido fue mayor en la cepa transformada (7.56 g en 72 horas) comparada con la silvestre (6.86 g en 72 horas). Otra diferencia entre estas dos cepas es la densidad óptica máxima alcanzada, la cual fue mayor para la cepa sin plásmido (1.4 DO_{600nm}) mientras que para la cepa con el plásmido fue de 1.02 DO_{600nm}.

El perfil de metabolitos de la cepa silvestre transformada no presentó variaciones en cuanto a las proporciones producidas, ya que al igual que en la cepa silvestre el metabolito principal fue el etanol, seguido del formiato, succinato y acetato, sin presencia de lactato dentro de los metabolitos. Los rendimientos de producción de etanol y consumo volumétrico son muy similares en ambas cepas (Tabla 8, página 81). Se realizó el balance de materia de los metabolitos producidos obteniendo lo siguiente:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 7.56 | → | 3.30 | + | 1.37 | + | 1.15 | + | 0.70 | + | 2.36 | + | 0.11 | + | 0.05 | 9.03 |
| mmoles | 82.06 | → | 71.56 | + | 29.69 | + | 9.77 | + | 11.70 | + | 53.56 | + | 53.56 | + | 0.52 | 230.36 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.34; Etanol, 0.65; Formiato, 0.69; Succinato, 0.04; Acetato, 0.42; Lactato, 0.03.

En el caso anterior la suma de metabolitos es de 9.03 g, lo que excede la cantidad de glicerol consumido. Sin embargo, analizando las desviaciones estándar, el excedente de 19% podría explicarse por el error experimental.

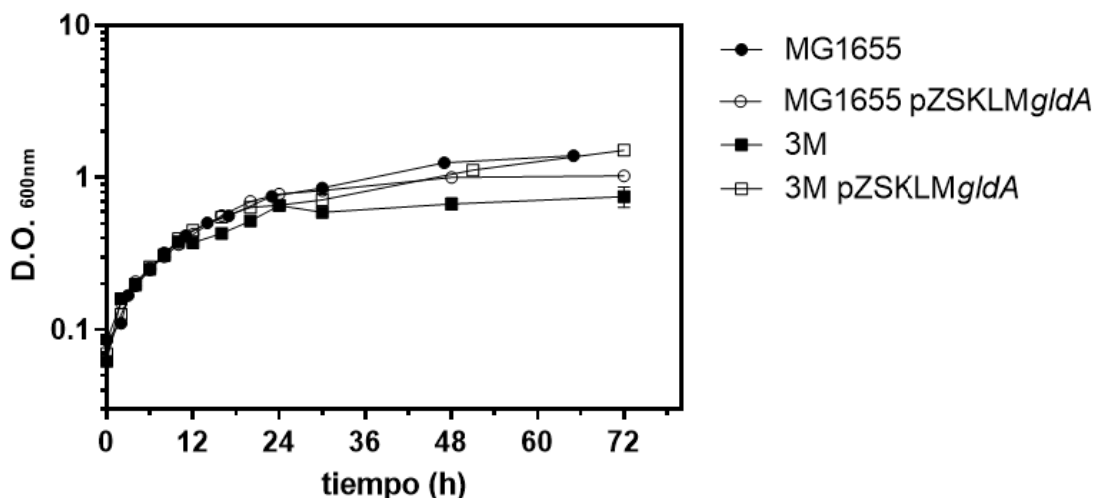


Figura 23. Cinética de crecimiento de las cepas silvestre, silvestre con pZSKLMgldA, 3M y 3M con pZSKLMgldA. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre MG1655 (círculo cerrado), MG1655 pZSKLMgldA (círculo abierto), 3M (cuadrado cerrado) y 3M pZSKLMgldA (cuadrado abierto) representadas con el logaritmo de D.O._{600nm} a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona calculando una μ de 0.086 h⁻¹, 0.100 h⁻¹, 0.108 h⁻¹ y 0.149 h⁻¹ respectivamente.

La triple mutante (3M) evaluada con plásmido y sin plásmido presentó una diferencia significativa en la μ y en la densidad óptica alcanzada. Para el caso de la 3M sin plásmido la μ fue de 0.108 h⁻¹ como se describió anteriormente y alcanzó una densidad de 0.75 DO_{600nm}. mientras que la mutante con el plásmido presentó una μ de 0.149 h⁻¹ (37% más respecto a la cepa 3M sin el plásmido) y alcanzó una densidad óptica de 1.51 DO_{600nm} en 72 horas, es decir del doble. Otro aspecto que fue significativo entre ambas cepas fue la cantidad de glicerol consumido, mientras que la cepa sin plásmido consumió 2.87 g, la cepa transformada consumió 7.34 g en el mismo tiempo. Lo anterior refleja la ventaja que ofrece la sobreexpresión de los genes encargados de la asimilación del glicerol.

De igual manera, la transformación del plásmido no afectó el perfil de metabolitos, ya que principalmente produce etanol y formiato, mientras que el acetato, succinato y lactato son despreciables. Al igual que en los casos anteriores se realizó el balance de materia de la cepa 3M pZSKLMgldA quedando de la siguiente manera:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|-----------------|---|----------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO ₂ | + | H ₂ | + | Lactato | Total |
| g/L | 7.34 | → | 3.53 | + | 1.39 | + | 0.25 | + | 0.20 | + | 2.19 | + | 0.10 | + | 0.03 | 7.70 |
| mmoles | 79.74 | → | 76.67 | + | 30.21 | + | 2.13 | + | 3.36 | + | 49.81 | + | 49.81 | + | 0.38 | 212.37 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.18; Etanol, 0.29; Formiato, 0.10; Succinato, 0.01; Acetato, 0.05; Lactato, 0.01.

En este caso, la suma de los metabolitos producidos corresponde a 7.70 g mientras que el glicerol consumido fue de 7.34 g, con menores desviaciones estándar en el cálculo de metabolitos respecto a los balances anteriores. Lo cual se refleja en un menor porcentaje de excedente (4.90%).

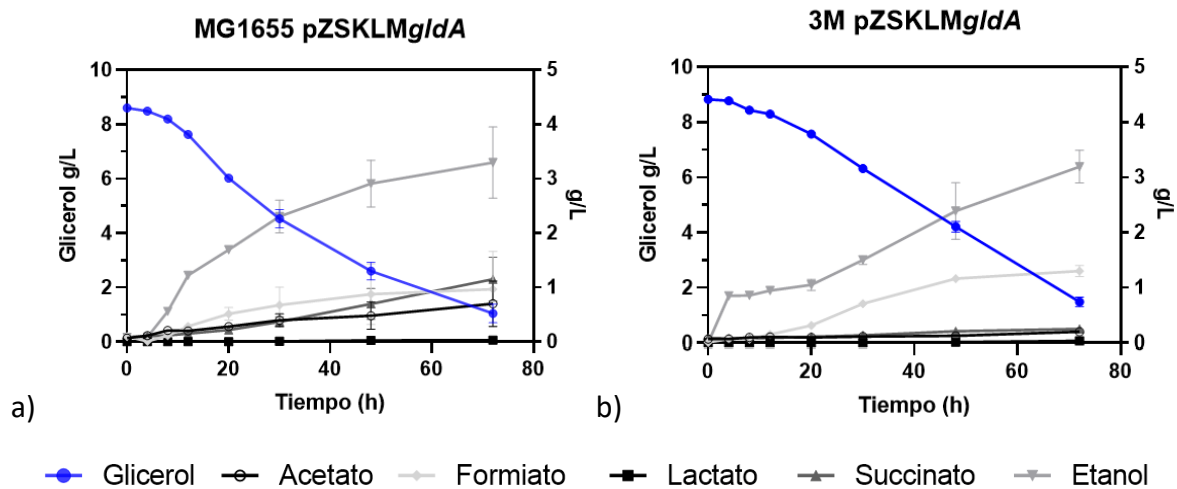


Figura 24. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa a) MG1655 pZSKLMgldA y b) 3M pZSKLMgldA. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo, mientras que los metabolitos cuantificados en g/L (etanol, formiato, acetato y succinato) tienen su eje del lado derecho.

La producción de etanol se ve favorecida en la cepa MG1655 con el plásmido, sin embargo, el rendimiento $Y_{P/S}$ es bajo debido a que no presenta la eliminación de las vías que producen acetato y succinato. Lo anterior se puede explicar por el aumento en la asimilación del glicerol que a su vez aumenta la producción de equivalentes reductores, los cuales son tóxicos para la célula, por lo que una manera rápida de regenerar esos equivalentes reductores es con la producción de etanol y lactato, este último no estaba presente dentro del perfil metabólico de la cepa silvestre sin el plásmido

6.4 Evaluación de la cepa *E. coli* SY03

La cepa SY03 (Yazdani y Gonzalez, 2008) presenta dos de las mismas mutaciones que la cepa generada en este proyecto (2M). La cepa SY03 fue solicitada al grupo del Dr. González, como control, para evaluarse bajo las mismas condiciones que las mutantes generadas en este proyecto. La Figura 25 muestra la cinética de crecimiento de la cepa SY03 comparada con la análoga que se generó en este trabajo, así como la cepa SY03 transformada con el vector pZSKLMgIdA. En la gráfica se observa una diferencia significativa entre la cepa SY03 y la cepa 2M, donde la cepa SY03 presenta una mayor μ , así como una mayor densidad óptica alcanzada. La μ de la cepa SY03 es de 0.098 h^{-1} mientras que de la 2M es de 0.090 h^{-1} , a pesar de presentar el mismo fondo genético (sección 6.4.1) y ser evaluadas en las mismas condiciones de cultivo. En el trabajo de Yazdani y González (2008) no reportan la μ de la cepa SY03, sin embargo, reportan el rendimiento de la producción de metabolitos donde logran la producción de 1.01 mmol de etanol y 1.02 mmol de H_2 por cada mmol de glicerol consumido. Lo anterior indica la máxima producción teórica por lo que no existe presencia de co-productos como es el lactato, el cual fue el producto predominante en la fermentación de la cepa 2M.

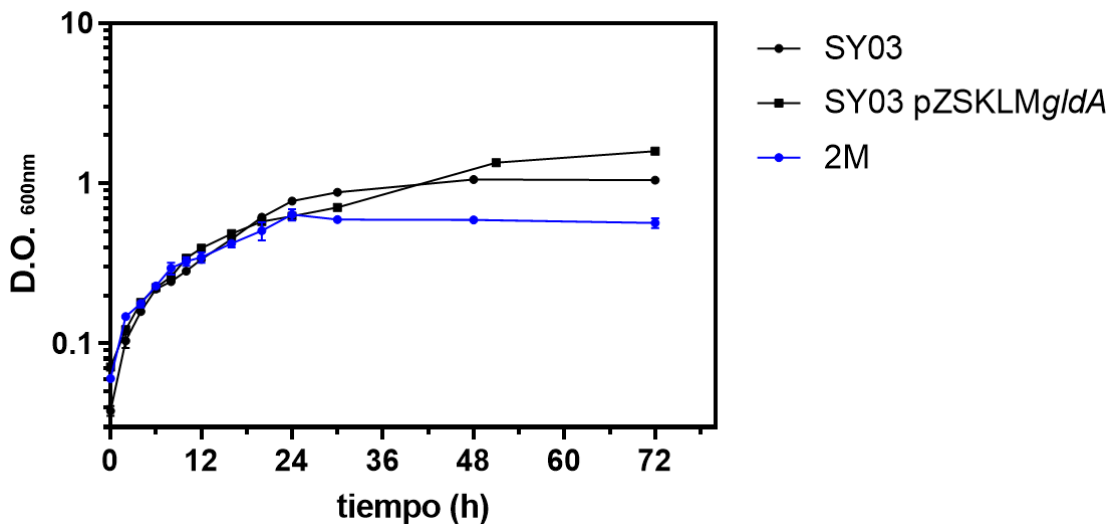


Figura 25. Cinética de crecimiento de las cepas 2M, SY03 y SY03 pZSKLMgIdA. Cinética de crecimiento de la cepa 2M (color azul), SY03 (círculo negro) y SY03 pZSKLMgIdA (cuadrado negro) representadas con el logaritmo de D.O._{600nm} a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona calculando una μ de 0.090 h^{-1} , 0.098 h^{-1} y 0.113 h^{-1} respectivamente.

La cepa SY03 se transformó con el plásmido pZSKLM*gldA* para ser evaluada en los minifermentadores presentando una cinética de crecimiento similar a la cepa SY03 sin el plásmido (Figura 25). La μ de la cepa SY03 con el plásmido fue de 0.113 h^{-1} y alcanzó una densidad óptica de $1.4 \text{ DO}_{600\text{nm}}$, la cual es mayor a la cepa sin el plásmido. Los metabolitos producidos también se cuantificaron, obteniendo un perfil de producción similar al de la cepa SY03 sin el plásmido, con una diferencia notoria en el aumento de la conversión de formiato en CO_2 e H_2 para el caso de la cepa con el plásmido.

Para ambas mutantes se realizaron los balances de materia:

SY03

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|---------------|---|--------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO_2 | + | H_2 | + | Lactato | Total |
| g/L | 8.75 | → | 3.11 | + | 1.10 | + | 0.25 | + | 0.09 | + | 1.99 | + | 0.09 | + | 1.45 | 8.09 |
| mmoles | 94.99 | → | 67.60 | + | 23.93 | + | 2.13 | + | 1.52 | + | 45.20 | + | 45.20 | + | 16.10 | 201.68 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.12; Etanol, 0.47; Formiato, 0.01; Succinato, 0.07; Acetato, 0.01; Lactato, 0.55.

SY03 pZSKLM*gldA*

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|----------|---|--------|---|----------|---|-----------|---|---------|---|---------------|---|--------------|---|---------|--------|
| | Glicerol | → | Etanol | + | Formiato | + | Succinato | + | Acetato | + | CO_2 | + | H_2 | + | Lactato | Total |
| g/L | 8.48 | → | 3.76 | + | 0.30 | + | 0.26 | + | 0.23 | + | 3.48 | + | 0.16 | + | 0.65 | 8.85 |
| mmoles | 92.08 | → | 81.71 | + | 6.41 | + | 2.20 | + | 3.87 | + | 79.17 | + | 79.17 | + | 7.22 | 259.75 |

*Los datos corresponden al promedio de tres réplicas con las siguientes desviaciones estándar; Glicerol, 0.16; Etanol, 0.21; Formiato, 0.01; Succinato, 0.03; Acetato, 0.01; Lactato, 0.12.

La Figura 26 muestra el perfil de metabolitos de la cepa SY03, el cual es diferente respecto a la 2M. En el caso de la SY03 el producto predominante fue el etanol, seguido de lactato, formiato y acetato y succinato. Por otro lado, la cepa 2M presenta un perfil de metabolitos diferente (Figura 16). Dado lo anterior se comprobó el fondo genético de la cepa SY03 como se describe en la siguiente sección, comprobándose que la cepa SY03 sí presenta eliminados los genes *pta* y *frdA*, sí pertenece a la cepa MG1655 y contiene el gen *ldhA*.

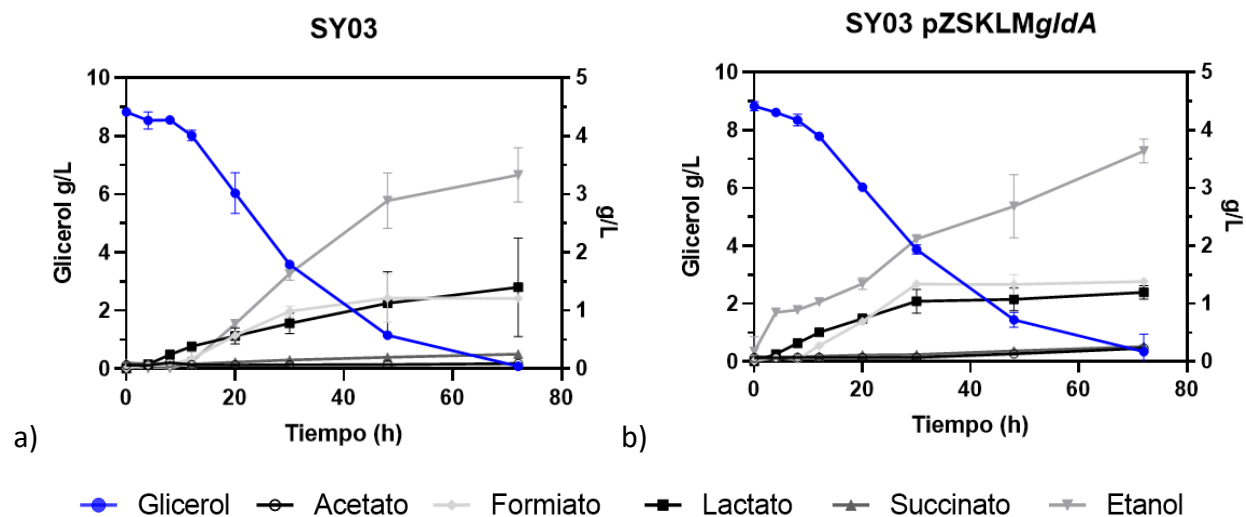


Figura 26. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de la cepa a) SY03 y b) SY03 pZSKLMgldA. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo, mientras que los metabolitos cuantificados en g/L (etanol, formiato, acetato y succinato) tienen su eje del lado derecho.

6.4.1 Comprobación de fondo genético de la cepa SY03

La cepa SY03 se corroboró mediante amplificaciones por PCR utilizando los mismos oligonucleótidos antes utilizados para comprobar las mutaciones realizadas en las cepas generadas en esta tesis (Figura 27). Además de la comprobación de las eliminaciones se comprobó que no tuviera eliminado el gen *ldhA* y que perteneciera a *E. coli* MG1655 utilizando los oligonucleótidos *csgC-ymdA*. Los controles utilizados fueron la cepa MG1655 silvestre y la 2M.

La cepa SY03 tiene las mismas eliminaciones que la cepa 2M, por lo que la diferencia de parámetros cinéticos y estequiométricos podría estar dada por otras regiones del genoma. Una explicación podría ser la forma en que realizaron las inactivaciones en ambas cepas (transducción con fagos), ya que este método no es tan preciso comparada con otras técnicas (inactivación por Datsenko, CRISPR, entre otras), dejando una “cicatriz” donde se realizó la mutación. Es necesario realizar la secuenciación de ambas cepas para comparar los cambios que pudieran tener y

encontrar una explicación para esta diferencia significativa en el crecimiento y en el perfil metabólico (resultados de secuenciación en Anexos).

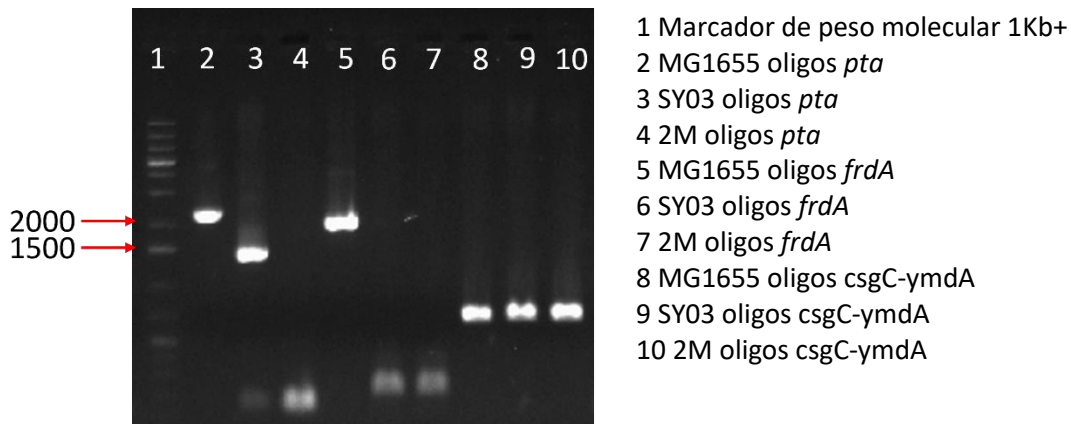


Figura 27. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación del fondo genético de la cepa SY03. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2), 3) y 4) Producto amplificado por los oligos Fw-*pta* y Rv-*pta* del DNA genómico de las cepas *E. coli* MG1655 silvestre, SY03 y 2M respectivamente, 5), 6) y 7) Producto amplificado por los oligos Fw-*frdA* y Rv-*frdA* del DNA genómico de las cepas *E. coli* MG1655 silvestre, SY03 y 2M respectivamente, 8), 9) y 10) Producto amplificado por los oligos *csgC* y *ymdA* del DNA genómico de las cepas *E. coli* MG1655 silvestre, SY03 y 2M respectivamente.

6.5 Construcción de un vector conteniendo el gen *dhaK* de *K. oxytoca* para reemplazar la enzima dihidroxiacetona cinasa nativa de *E. coli*

En trabajos anteriores se ha demostrado que la actividad enzimática de la dihidroxiacetona cinasa de *K. oxytoca* presenta mayor actividad respecto a la enzima nativa de *E. coli*. La principal diferencia entre estas dos enzimas es el cofactor utilizado; la enzima nativa de *E. coli* utiliza PEP (fosfoenolpiruvato) mientras que la de *K. oxytoca* utiliza ATP como donador del grupo fosfato. El hecho de utilizar PEP desvía el flujo metabólico de los productos de interés, ya que el PEP es un intermediario en el metabolismo ácido mixto de *E. coli* (Yu et al., 2019). Ambas enzimas son activas en condiciones anaerobias, sin embargo, su actividad no es la misma. Wang y colaboradores (2018) evaluaron la actividad de la enzima dihidroxiacetona cinasa (*dhaK*) de *E. coli* TG113 y la actividad de la de *K. oxytoca*. Para lo anterior usaron un plásmido que contenía el gen que codifica para la *dhaK* de *K. oxytoca* en la cepa *E. coli*, así como un plásmido blanco como control. La cepa que contenía el plásmido control presentaba una actividad de 0.1 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$

de proteína, lo que corresponde a la actividad de *dhaK* dependiente de PEP, mientras que la cepa que contenía el plásmido con la enzima *dhaK* dependiente de ATP de *K. oxytoca* presentaba una actividad de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, es decir 10 veces mayor actividad que la enzima nativa de *E. coli*. Lo anterior es útil ya que la asimilación del glicerol es por la enzima glicerol deshidrogenasa, la cual produce dihidroxiacetona (DHA). La DHA es tóxica en distintos organismos como *E. coli*, lo que podría estar afectando el crecimiento de *E. coli* en glicerol, por lo que una mayor eficiencia de conversión de DHA en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) podría mejorar la tasa de consumo de glicerol (Wang et al., 2018).

El plásmido denominado pLoxGentrc*dhaK* conteniendo el gen *dhaK* de *K. oxytoca*, se utilizó para transformar la cepa 3M. La transformación se realizó en cepas con el gen *dhaK* nativo eliminado para probar la eficiencia del gen de *K. oxytoca*. La construcción del plásmido se realizó utilizando otro plásmido (pLoxGentrc) generado en el laboratorio como se describe en las secciones posteriores.

6.5.1 Eliminación del gen *dhaK* del cromosoma de *E. coli*

El gen *dhaK* de *E. coli* se eliminó utilizando la metodología antes descrita de transducción por fagos. La Figura 28 muestra la comprobación de la nueva mutante obtenida, (3M Δ *dhaK*) tanto de las modificaciones previas como de la nueva eliminación. Como control se utilizó la cepa silvestre sin modificaciones y la cepa de Keio Δ *dhaK*, de modo que se tuviera un control positivo y uno negativo para la comprobación. Una vez que se construyó el vector, se utilizó para transformar la cepa 3M Δ *dhaK*.

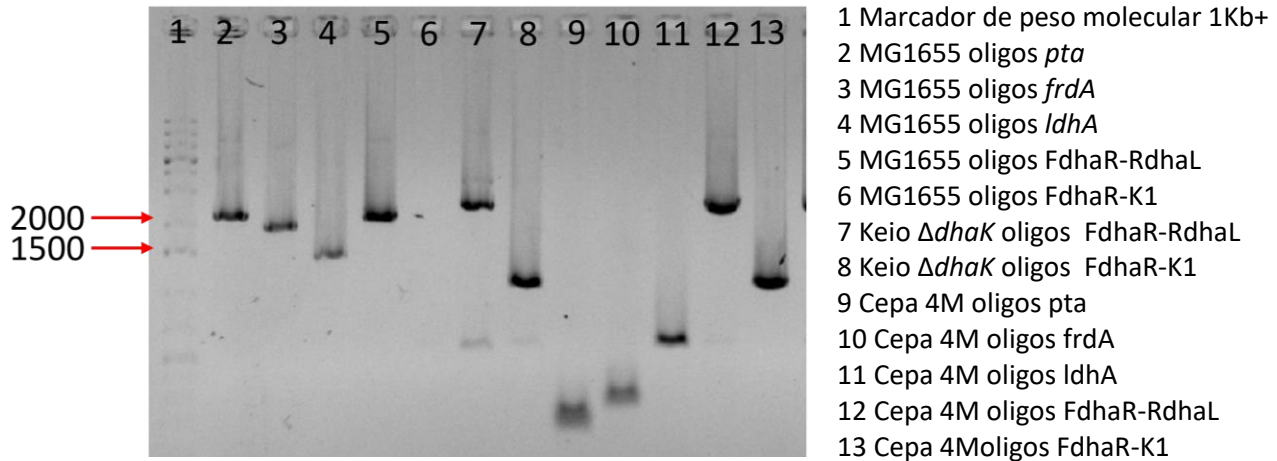


Figura 28. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la eliminación del gen *dhak* y las eliminaciones previas en la cepa 4M. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2), 3), 4), 5) y 6) Producto amplificado por los oligos Fw-*pta* y Rv-*pta*, Fw-*frdA* y Rv-*frdA*, F-*ldhA* y R-*ldhA*, FdhaR y RdhaL y FdhaR y K1 respectivamente del DNA genómico de la cepa *E. coli* MG1655 silvestre, 7) y 8) Producto amplificado por los oligos FdhaR y RdhaL y FdhaR y K1 respectivamente del DNA genómico de la cepa de la colección de Keio *E. coli* $\Delta dhak$, 9), 10), 11), 12) y 13) Producto amplificado por los oligos Fw-*pta* y Rv-*pta*, Fw-*frdA* y Rv-*frdA*, F-*ldhA* y R-*ldhA*, FdhaR y RdhaL y FdhaR y K1 respectivamente del DNA genómico de la cepa 4M.

6.5.2 Comprobación de vector pLoxGentrc

En el laboratorio se construyó el vector pLoxGentrc (Sabido et al., 2013), el cual deriva del pLoxGen4 con la inserción de un fragmento proveniente de pTrc99A, el plásmido pLoxGentrc contiene el gen que codifica para el represor *lacI*, el sitio múltiple de clonación (MCS) y los terminadores *rrnB*.

Antes de utilizar el vector para la integración del gen *dhak* de *K. oxytoca*, se comprobó por enzimas de digestión (Figura 29).

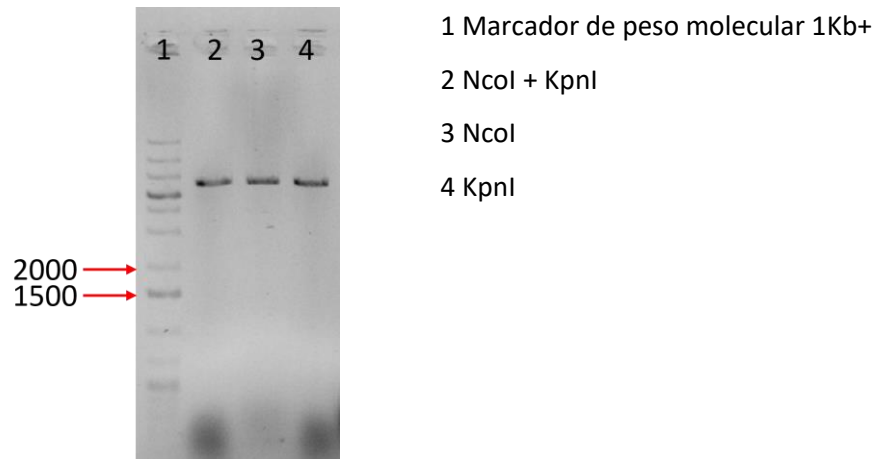


Figura 29. Gel de electroforesis para la comprobación del vector pLoxGentrc utilizando enzimas de restricción. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Vector pLoxGentrc linearizado con las enzimas NcoI y KpnI, 3) Vector pLoxGentrc que presenta un sitio de corte para la enzima NcoI, 4) Vector pLoxGentrc que presenta un solo sitio de corte para la enzima KpnI.

6.5.3 Clonación del gen *dhaK* de *Klebsiella oxytoca* en pLoxGentrc

El vector pLoxGentrc contiene un sitio múltiple de clonación, lo que permitió la clonación del gen *dhaK* de *K. oxytoca*. Primero, como lo indica el protocolo de CPEC (Quan y Tian, 2011), es necesario linealizar el vector, en este caso se realizó una doble digestión con las enzimas NcoI y KpnI (Figura 30.a). Lo anterior se modeló *in silico* para elaborar los oligonucleótidos con las homologías necesarias para el alineamiento de la reacción de CPEC, estos oligos fueron utilizados para amplificar el fragmento de *dhaK* de *K. oxytoca* (Figura 30.b). Una vez que se tuvieron los fragmentos se purificaron por columna y se cuantificaron para establecer las condiciones de reacción.

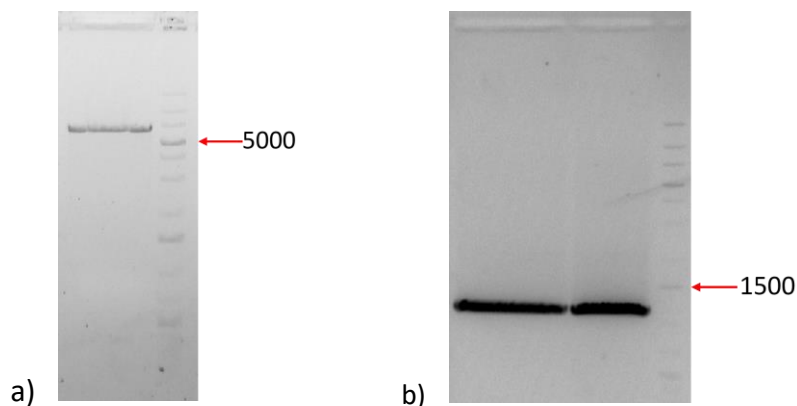


Figura 30. Gel de electroforesis para la comprobación del vector pLoxGentrc linearizado y del inserto dhak amplificado de *K. oxytoca*. a) Comprobación del vector linearizado pLoxGentrc con un tamaño de 6300 pb digerido por enzimas de restricción NcoI y KpnI b) Comprobación del gen *dhaK* amplificado del DNA genómico de *K. oxytoca* con un tamaño de 1200 pb por PCR.

La Tabla 7 muestra las condiciones de la reacción de CPEC realizada en el termociclador para la construcción del vector pLoxGentrcdhak. Posteriormente, se utilizaron 5 µL de cada reacción para transformar células DH5α electrocompetentes a 1800 V obteniendo una constante de tiempo de 3. Las células se recuperaron durante 2 h en medio SOC a 37 °C y se plaquearon 100 µL en placas con Gm₁₀Amp₁₀₀, dejando en incubación durante 24 h. La eficiencia de transformación fue baja, ya que solo se obtuvieron 5 colonias del total, donde solo una creció en medio líquido con los antibióticos respectivos.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la construcción de pLoxGentrcdhak

| CPEC (2 reacciones de 20 µL) | Condiciones de reacción | | | | |
|------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|--------|--------|
| | 1:1 (µL) | 2:1 (µL) | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
| Amortiguador | 4 | 4 | 100 °C | 2'00 | 1 |
| HF | | | | | |
| dNTPs | 0.4 | 0.4 | 94 °C | 30" | |
| Phusion | 0.2 | 0.2 | 62 °C | 1'00 | 15 |
| pLoxGentrc | 7 (100 ng) | 7 (100 ng) | 72 °C | 4'55" | |
| Inserto dhak | 0.7 (18 ng) | 0.7 (36 ng) | 72 °C | 10'00 | 1 |
| DMSO | 0.6 | 0.6 | 4 °C | ∞ | |
| H ₂ O | 7.1 | 7.1 | | | |

La colonia obtenida se dejó en cultivo para realizar miniprep de lisis alcalina y poder comprobar el plásmido por enzimas de digestión. La Figura 31 muestra el cambio de patrón de digestión entre el plásmido pLoxGentrc y el plásmido pLoxGentrcdhak, utilizando la enzima PstI, la cual corta dentro del gen *dhaK* de *K. oxytoca* y en el plásmido. En la figura se observan dos bandas, donde la sumatoria de tamaños debe corresponder al tamaño del vector construido *in silico*, el cual es de 7371 pb. En el carril 4 de la misma figura se observa solo una banda, la cual corresponde

al tamaño del vector pLoxGentrc, y no presenta la doble banda que pertenece al corte dentro de gen *dhaK*.

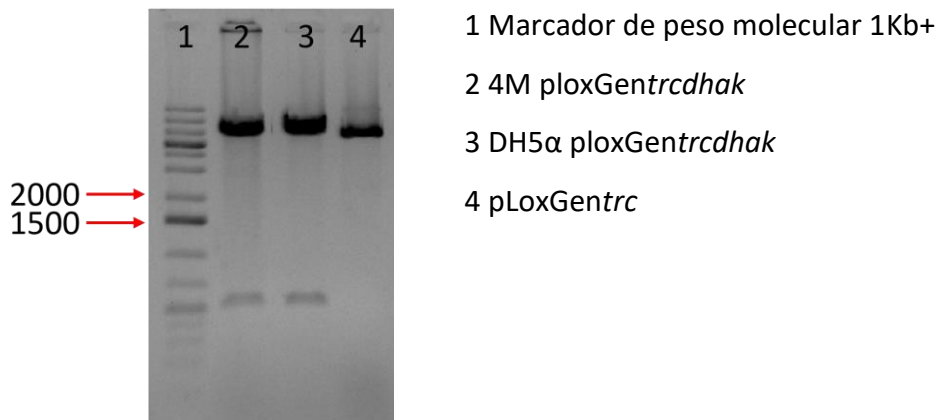


Figura 31. Gel de electroforesis para la comprobación del vector ploxGentrcdhaK por patrón de digestión utilizando la enzima de restricción PstI. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Vector ploxGentrcdhaK que presenta dos sitios de corte para la enzima PstI extraído de la cepa 4M, 3) Vector ploxGentrcdhaK que presenta dos sitios de corte para la enzima PstI extraído de la cepa DH5α, 4) Vector ploxGentrc con un solo sitio de corte para la enzima PstI.

6.5.4 Integración del gen *dhaK* en el cromosoma de *E. coli*

El vector pLoxGendhaK se utilizó para amplificar el gen *dhaK* de *K. oxytoca* junto con una resistencia a gentamicina utilizando oligonucleótidos (trcmelA/lacZfwd y trcmelA/lacZrvs) que contienen homólogas (45 pb) con la región del gen *lacZ* de *E. coli* obteniendo un fragmento de 3028 pb. Este fragmento se purificó y cuantificó por Nanodrop.

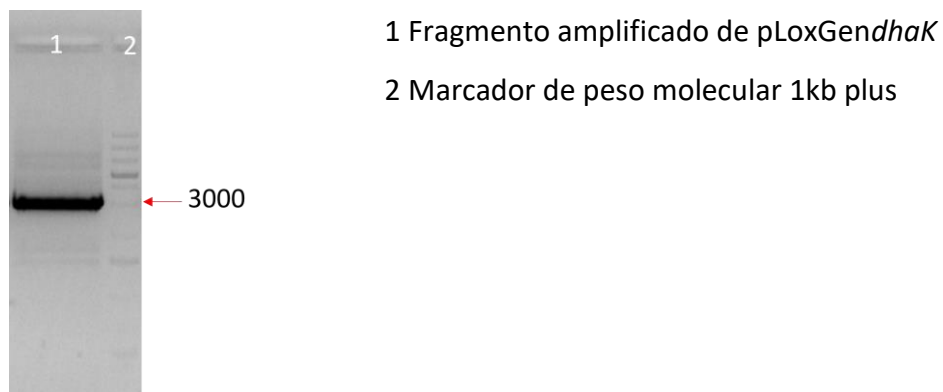


Figura 32. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación del fragmento amplificado que contiene el gen *dhaK* y el casete de gentamicina. 1) Producto amplificado de 3028 pb por los oligos trcmelA/lacZfwd y trcmelA/lacZrvs del vector pLoxGentrcdhaK 2) Marcador de peso molecular 1Kb+.

La cepa 4M se transformó con 200 ng del fragmento obtenido anteriormente, dejando recuperar las células por 4 horas después de la electroporación. En placas de LB con 33 µg/mL de X-Gal, 0.1 mM de IPTG, Km30 y Gm10 se plaquearon 100 µL de medio. En la Figura 33 se muestra la caja Petri con las colonias después de 24 horas en incubación a 37°C.



Figura 33. Caja Petri con las colonias obtenidas de la cepa 4M transformada con el gen *dhaK* de *K. oxytoca* después de 24 horas. Crecimiento en caja Petri con medio LB, 0.1 mM de IPTG, Km30, Gm10 y el reactivo X-Gal (33 µg/mL) después de 24 h en incubación a 37°C.

El reactivo X-Gal sirve como factor de selección, ya que este se descompone en un compuesto azul insoluble y no tóxico por acción de la β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*). Por lo que aquellas colonias blancas no contienen el gen *lacZ* y, por lo tanto, no expresan la enzima β -galactosidasa. De la caja Petri anterior se seleccionaron 10 colonias blancas para comprobar por PCR.

La comprobación de la cepa 4M *lacZ::dhaK* se realizó utilizando oligonucleótidos externos al gen de *lacZ* de *E. coli* (*lacIF* y *lacYR*) y con un oligonucleótido interno que reconociera una sección del gen de resistencia a gentamicina (*GenF*). En la Figura 34 se observan los productos amplificados de ambas PCR con los tamaños esperados tanto en el control como en la cepa mutante.

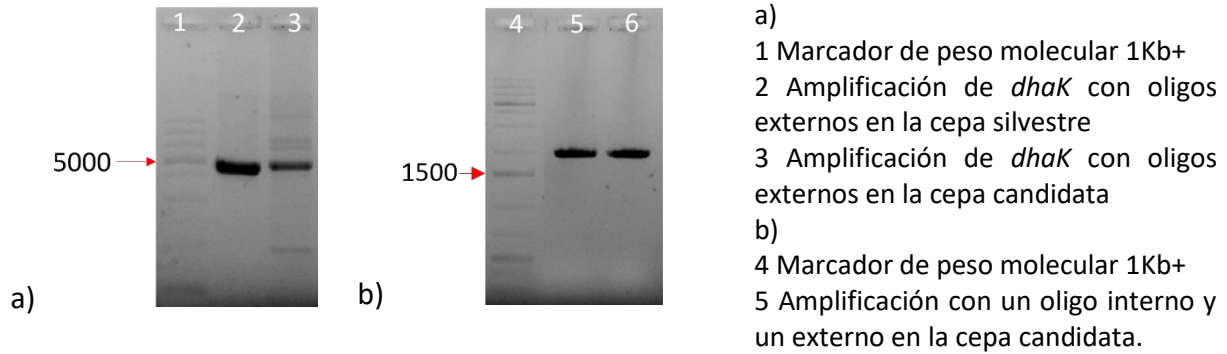


Figura 34. Gel de electroforesis de productos de PCR para la comprobación de la cepa 4M *lacZ::dhaK*. a) 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Producto amplificado por los oligos *lacIF* y *lacYR* del DNA genómico de la cepa silvestre, 3) Producto amplificado por los oligos *lacIF* y *lacYR* del DNA genómico de la cepa 4M *lacZ::dhaK*, b) 4) Marcador de peso molecular 1Kb+, 5) y 6)) Producto amplificado por los oligos *lacIF* y *GenF* del DNA genómico de la cepa 4M *lacZ::dhaK*.

6.5.5 Evaluación del gen *dhaK* de *K. oxytoca* en vector y cromosomalmente en la cepa 4M

Como se explicó anteriormente, para la asimilación del glicerol existen dos vías, una aerobia y una anaerobia. El gen *dhaK* opera dentro de la vía de anaerobiosis, por lo que aquellas mutantes deficientes del gen *dhaK* no tendrían crecimiento en condiciones de anaerobiosis. Por lo que se probaron las mutantes 4M y 4M pLoxGentrc*dhaK* en placas de glicerol en cámara de anaerobiosis a 37°C, esperando que la 4M no tuviera crecimiento dada la eliminación del gen *dhaK*, mientras que aquella transformada con el vector recobraría la capacidad de crecer en glicerol.

La vía aerobia está conformada por un transportador de glicerol, una cinasa y dos deshidrogenasas (Figura 4). Una de estas deshidrogenasas (G3P deshidrogenasa aeróbica codificada por el gen *glpD*) es esencial para el metabolismo de glicerol en condiciones de aerobiosis. En el caso de anaerobiosis, pero presencia de otros aceptores de electrones externos como puede ser el fumarato, participa la enzima G3P deshidrogenasa anaeróbica (codificada por *glpABC*). Sin embargo, en condiciones sin oxígeno y sin presencia de aceptores de electrones externos, resultan en la acumulación de G3P y por lo tanto en la inhibición de crecimiento celular (Gonzalez *et al.*, 2008; Hu y Wood, 2010). Por otro lado, en la vía fermentativa, la enzima glicerol deshidrogenasa se encuentra activa convirtiendo el glicerol en dihidroxiacetona. La acumulación

de este último compuesto resulta tóxico para la célula (Wang *et al.*, 2018), lo cual era lo esperado al carecer de la enzima dihidroxiacetona cinasa en condiciones anaeróbicas, sin embargo, tanto la cepa 4M como la 4M pLoxGentrcdhaK mostraron crecimiento en condiciones sin oxígeno y sin aceptores de electrones externos. El experimento anterior se realizó en placa utilizando 2 g/L de glicerol en medio mínimo mineral en condiciones sin oxígeno (cámara de anaerobiosis) a partir de 100 μ L de cultivo líquido a una densidad óptica de 0.1 DO_{600nm}. En el caso de la 4M sin plásmido no se esperaba crecimiento dado que carece de la enzima DhaK, encargada de convertir el DHA en DHAP utilizando ATP, y teniendo la vía aerobia inactiva. Dado lo anterior es necesario revisar la regulación genética o posible ruta del glicerol en condiciones sin oxígeno. Por otro lado, en la cepa 4M pLoxGentrcdhaK se esperaba que se restableciera el crecimiento de la cepa en condiciones sin oxígeno, para evaluar la funcionalidad de la enzima DhaK.

Las cepas generadas se evaluaron en minifermentadores como se describió previamente. La Figura 35 muestra la comparación de la cinética de crecimiento de las cepas mencionadas anteriormente, que, aunque presentan un patrón de crecimiento similar, podemos comparar mejor las μ en la Tabla 8. Las cepas que contienen el gen *dhaK* de *K. oxytoca* no representaron una ventaja en la biomasa máxima alcanzada, ni un patrón de crecimiento mayor a la cepa deficiente de la enzima DhaK (4M).

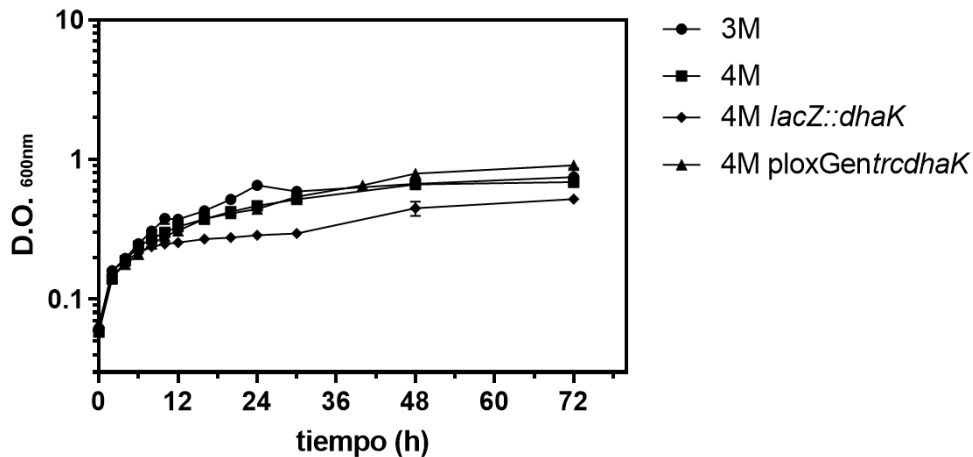
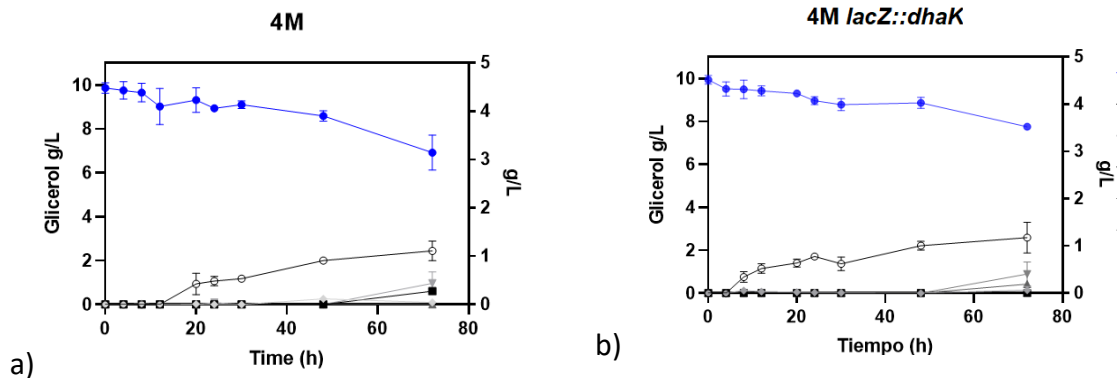


Figura 35. Cinética de crecimiento de las cepas 3M, 4M, 4M *lacZ::dhaK* y 4M *pLoxGentrcdhaK*. Cinética de crecimiento de la cepa 3M (círculo), 4M (cuadrado), 4M *lacZ::dhaK* (rombo) y 4M *pLoxGentrcdhaK* (triángulo) representadas con el logaritmo de la D.O.600nm a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona calculando una μ de 0.108 h⁻¹, 0.083 h⁻¹, 0.070 h⁻¹ y 0.0769 h⁻¹, respectivamente.

De las cepas anteriores, se analizó la producción de metabolitos, así como el consumo de la fuente de carbono (Figura 36). La cepa 4M consumió menos de 3 g de glicerol en 72 h de fermentación, que, aunque fue poco glicerol consumido, la vía principal de asimilación de glicerol en anaerobiosis no está presente en esta cepa. Lo anterior sugiere que el glicerol se metabolizó por la vía aerobia (GlpK-GlpD), dado que en condiciones de estrés como lo es una fuente de carbono que no está siendo metabolizada, se pueden activar ciertos genes que en condiciones normales no se estarían expresando. Por otro lado, en esta cepa, el metabolito principal fue el acetato, alcanzando más de un gramo a las 72 h, mientras que el etanol y el formato fue despreciable. La vía ack-pta de producción de acetato está eliminada en esta cepa, por lo que la única vía de producción de acetato es por *poxB*.

En trabajos anteriores se ha demostrado que la expresión de *poxB* se ve afectada por condiciones de estrés y limitación de nutrientes, como puede ser tener una fuente de carbono como glicerol (Martínez-Gómez *et al.*, 2012; Shimizu, 2013). En cuanto a las cepas 4M *lacZ::dhaK* y 4M *ploxGentrcdhaK* el perfil metabólico fue muy parecido a la 4M, lo que sugiere que la expresión del gen *dhaK* de *K. oxytoca* no está cumpliendo su función, ya que lo esperado sería que se restableciera el crecimiento y el perfil metabólico parecido con la cepa 3M.



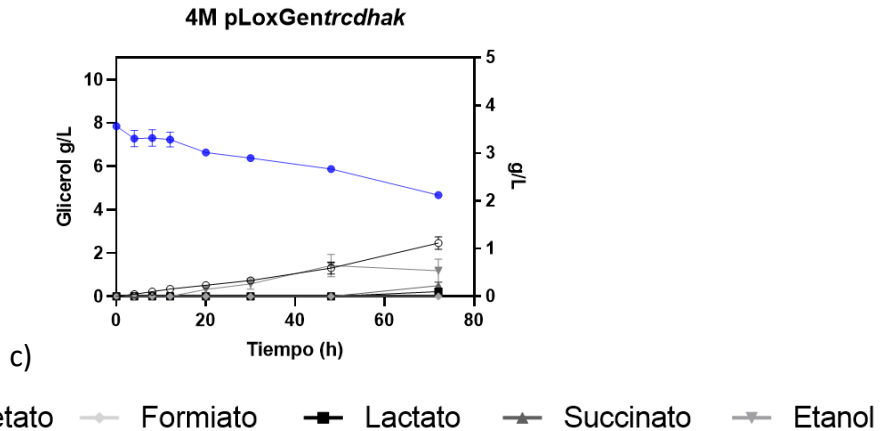


Figura 36. Consumo de glicerol y formación de productos de fermentación de las cepas 4M, 4M *lacZ::dhaK* y c) 4M pLoxGentrdhak. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo, mientras que los metabolitos cuantificados en g/L (etanol, formiato, acetato y succinato) tienen su eje del lado derecho.

6.5.6 Ensayo en microplaca a diferentes concentraciones de IPTG

De acuerdo con los resultados anteriores, la expresión del gen *dhaK* de *K. oxytoca* no es suficiente, por lo que se optó por hacer un barrido a diferentes concentraciones de IPTG para inducir el gen *dhaK*. Lo anterior, dado que la concentración que se usó en el ensayo anterior (0.1 mM) podía representar mucha carga metabólica o bien no ser suficiente.

En la Figura 37 se puede comparar las μ entre las cepas utilizando diferentes concentraciones de IPTG. En el caso de la cepa 4M plox*dhaK* la mejor μ se obtuvo con una concentración de 0.12 mM de IPTG aunque sin ser estadísticamente significativo, mientras que para la cepa 4M *lacZ::dhaK* la mayor μ se obtuvo sin IPTG y la diferencia entre la condición utilizada anteriormente de 0.1 mM sí resultó ser significativa.

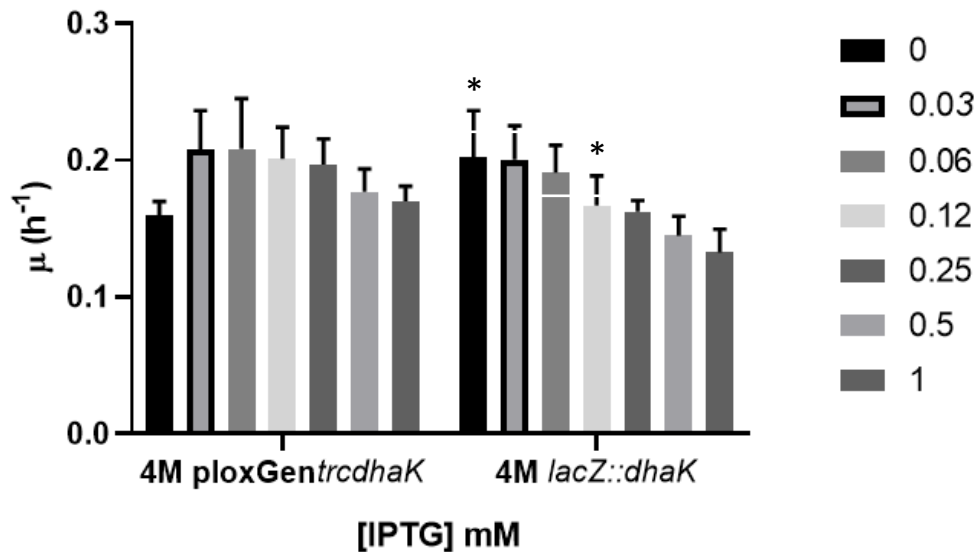


Figura 37. Diagrama de barras comparando las concentraciones de inducción con IPTG en las cepas 4M *lacZ::dhaK* y 4M *ploxGentrcdhaK*. Cepas evaluadas en microplaca con diferentes concentraciones de IPTG utilizadas al inicio de la fermentación. Los asteriscos indican diferencia significativa estadísticamente.

La cepa 4M *lacZ::dhaK* se evaluó nuevamente en los minifermentadores ahora sin inductor y utilizando las mismas condiciones con que se han evaluado las cepas. Sin embargo, en los minifermentadores la cinética de crecimiento fue muy similar a utilizar 0.1 mM de IPTG, la μ solo aumentó de 0.066 a 0.070 h⁻¹. El consumo de glicerol y la producción de metabolitos no presentó cambios significativos a la cepa evaluada anteriormente.

6.6 Evaluación de la actividad de la enzima DhaK de *E. coli* y de *K. oxytoca* expresada en la cepa 4M

La actividad enzimática de DhaK se evaluó como se describió anteriormente, para todas las cepas evaluadas se realizaron ensayos tanto con ATP y PEP como donador de grupo fosfato para evaluar la actividad de la enzima nativa de *E. coli* y la de *K. oxytoca*, la Tabla 7 y la Figura 38 muestran la comparación de las actividades calculadas en las distintas cepas. De acuerdo con la literatura, la enzima DhaK de *K. oxytoca* presenta diez veces mayor actividad que la nativa de *E. coli* (Wang et al., 2018), además de que utiliza ATP. Sin embargo, en este trabajo las actividades calculadas de *K. oxytoca* fueron despreciables, indicando que algo está ocurriendo con la enzima que no le permite desempeñar su actividad, ya sea desde errores en la expresión o en el plegamiento.

En este trabajo se confirma que la enzima DhaK nativa de *E. coli* solo utiliza PEP como donador del grupo fosfato. La cepa 4M no presenta actividad, ya que no contiene el gen en su genoma, por lo que los ensayos de actividad corroboraron la construcción de la cepa.

Comparando las actividades obtenidas de la cepa silvestre con la cepa 3M pZSKLMgldA, no se observa diferencia significativa entre ambas, sin embargo, el consumo de glicerol fue mayor en un 25% en el caso de la 3M con el vector. Lo anterior podría deberse a que no solo está sobre expresada la enzima DhaK sino también GldA, por lo que la actividad conjunta de ambas enzimas es lo que provoca el mayor consumo de glicerol.

Tabla 7. Comparación de la actividad enzimática entre DhaK de *E. coli* y de *K. oxytoca*

| Actividad de DHA cinasa, U/gDCW | | |
|---------------------------------|----------------|---------------|
| Cepa | PEP | ATP |
| MG1655 WT | 0.065 ± 0.008 | ND |
| 3M pZSKLMgldA | 0.074 ± 0.025 | ND |
| 4M | ND | ND |
| 4M pLox <i>dhaK</i> | 0.006 ± 0.001 | 0.015 ± 0.012 |
| 4M <i>lacZ::dhaK</i> | 0.003 ± 0.0004 | 0.010 ± 0.010 |

ND: No detectada

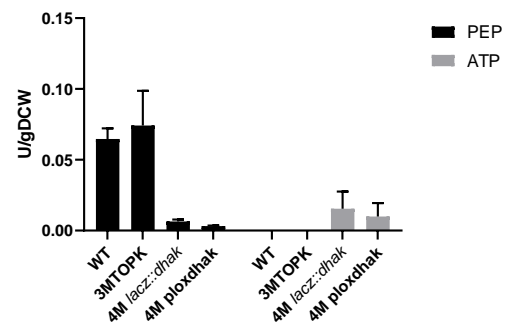


Figura 38. Comparación de la actividad de la enzima DhaK de *E. coli* y de *K. oxytoca*. Actividad enzimática en U/g_{DCW} de DhaK en las cepas silvestre, 3M pZSKLMgldA, 4M *lacZ::dhaK* y 4M plox*GentrcdhaK* utilizando ATP y PEP como cofactor en la reacción enzimática.

6.7 Generación de cepa carente de la vía aerobia del consumo de glicerol

Como se ha explicado anteriormente, la vía principal de consumo de glicerol en anaerobiosis es la ruta *gldA-dhaK*, sin embargo, la evaluación de la cepa 4M indica un consumo de glicerol cuando la ruta anaeróbica está eliminada. Dado lo anterior, se eliminó el gen *glpK* que corresponde a la ruta de asimilación en aerobiosis para saber si realmente el consumo de glicerol ocurría en este sentido.

En este caso el gen *glpK* se sustituyó por un casete de kanamicina utilizando la metodología de Datsenko. La cepa de Keio $\Delta glpK$ se utilizó para amplificar la región del gen de kanamicina con homologías de aproximadamente 1000 pb a los extremos de las secuencias adyacentes al gen *glpK* en *E. coli*. En la Figura 39 se observa el fragmento correspondiente amplificado, el cual se purificó por columna (*GeneJET PCR Purification Kit Thermo Scientific*) y fue utilizado posteriormente para transformar a la cepa 4M.

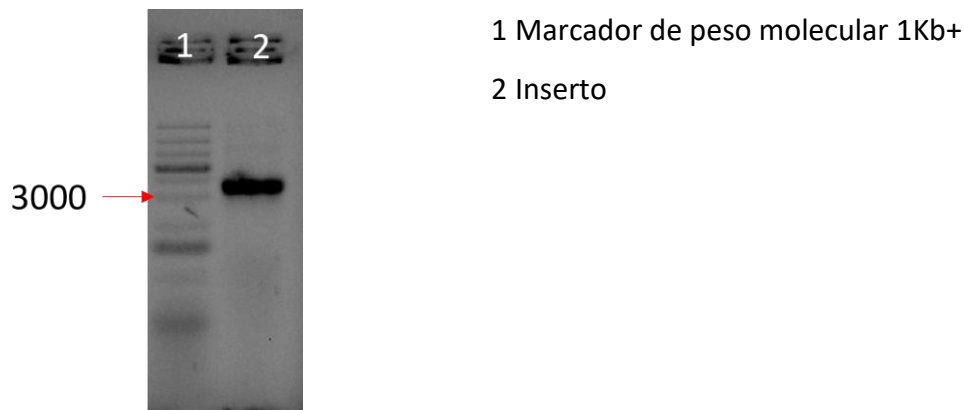


Figura 39. Gel de electroforesis para la comprobación del producto amplificado del casete de kanamicina de la cepa de Keio $\Delta glpK$. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Producto amplificado con los oligos *glpK*F y *glpK*R del DNA genómico de la cepa de Keio $\Delta glpK$. Este fragmento contiene el casete de kanamicina así como 1000 pb a cada extremo del casete con homologías a las regiones adyacentes del gen *dhaK* en *E. coli*.

La cepa 5M (4M $\Delta glpK$) se comprobó por PCR utilizando oligonucleótidos externos al gen *glpK* (*glpK*F y *glpK*R) así como oligonucleótidos internos que reconocieran el gen de kanamicina (K1 y K2). En la Figura 40 se observa el gel de comprobación de la cepa, donde se utilizó la cepa de Keio como control.

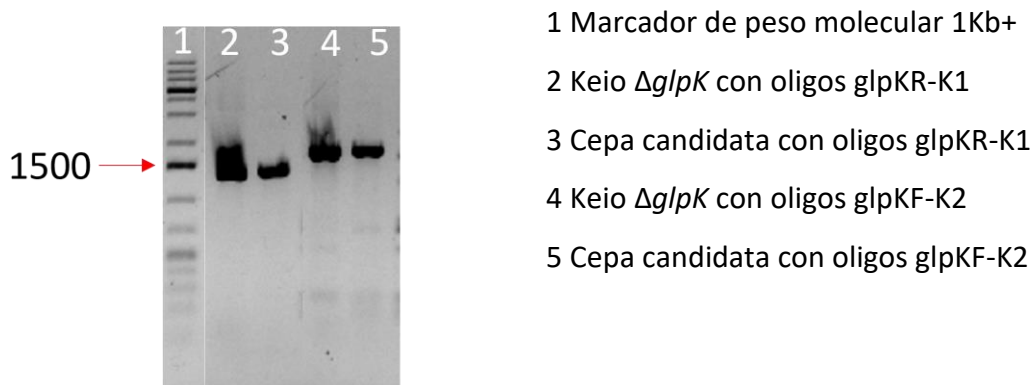


Figura 40. Gel de electroforesis para la comprobación de la cepa 5M. 1) Marcador de peso molecular 1Kb+, 2) Producto amplificado con los oligos glpKR y k1 del DNA genómico de la cepa de Keio $\Delta glpK$. 3) Producto amplificado con los oligos glpKR y k1 del DNA genómico de la cepa 5M 4) Producto amplificado con los oligos glpKF y k2 del DNA genómico de la cepa de Keio $\Delta glpK$ y 5) Producto amplificado con los oligos glpKF y k2 del DNA genómico de la cepa 5M.

La cepa 5M se evaluó en los minifermentadores bajo las mismas condiciones descritas. En la Figura 41 se muestra la cinética de crecimiento obtenida, la cual resulta comparable con la cepa 4M obteniendo una μ similar (0.0831 h^{-1} para la 4 M y 0.0828 h^{-1} para la cepa 5M). Comparando las μ de la cepa 4M y 5M, al ver que la diferencia no es significativa, se podría sugerir que el glicerol se consume por otra vía diferente a la eliminada, es decir la anaerobia (GlpK-GlpD), ya que no hay un efecto negativo en la μ y en la producción de biomasa de la cepa 5M (ver Tabla 8).

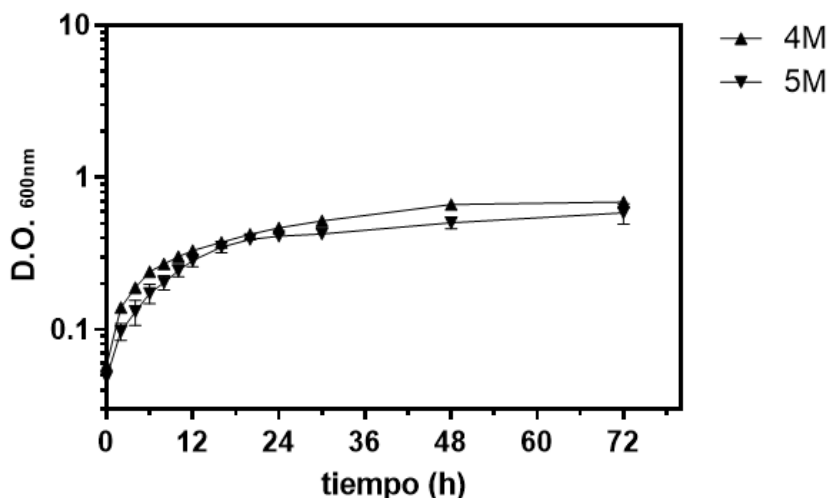


Figura 41. Cinética de crecimiento de las cepas 4M y 5M. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre 4M (triángulo) y 5M (triángulo invertido) representadas con el logaritmo de D.O._{600nm} a través del tiempo durante 72 horas creciendo con 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona calculando una μ de 0.0831 h^{-1} y

0.0828 h⁻¹ respectivamente. La desviación estándar se calculó para todos los puntos. Sin embargo, si la desviación es menor que el tamaño del símbolo, las barras no se muestran.

Sin embargo, la Figura 42 muestra que la cepa 5M no fue capaz de consumir glicerol, manteniendo la misma concentración inicial de glicerol a lo largo de la fermentación, por lo que se explica que la única entrada de glicerol en la cepa 4M es por la vía aerobia de asimilación de glicerol (GlpK-GlpD). Dado lo anterior, la μ y biomasa producida en el caso de la 5M se debe a la presencia de 2 g/L de triptona en el medio. No se encontró ninguna producción de algún metabolito, por lo que también puede inferirse que la triptona se utiliza específicamente para producción de biomasa y no para la producción de metabolitos.

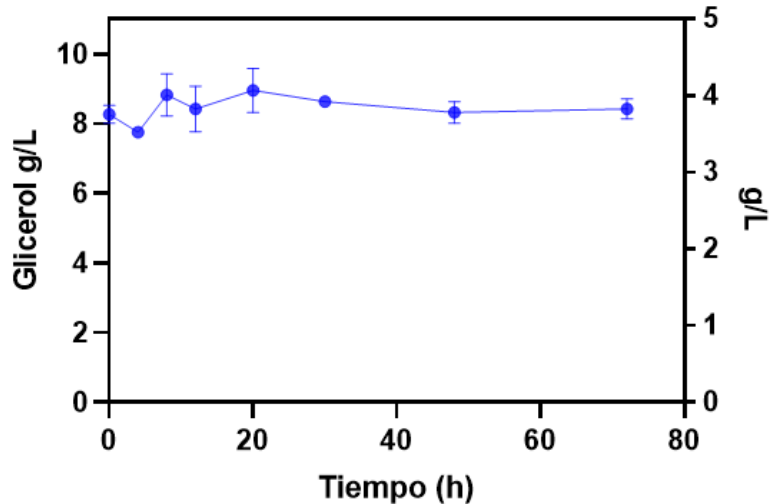


Figura 42. Consumo de glicerol de la cepa 5M. En azul se muestra el consumo de glicerol en g/L a través del tiempo teniendo su eje del lado izquierdo. La cuantificación de acetato, etanol, succinato y formiato también se realizó, sin embargo, no se detectó concentración de ningún metabolito a lo largo de la fermentación.

6.8 Ensayo en microplaca a diferentes concentraciones de triptona

De acuerdo con los resultados anteriores, se plantea que la triptona se utiliza principalmente para la producción de biomasa, por lo que se realizó un ensayo en microplaca a distintas concentraciones de triptona, para saber qué tanto se afectaba la μ de acuerdo con diferentes concentraciones de triptona en el medio. La Figura 43 muestra la comparación de las μ con

concentraciones de triptona desde 0 hasta 10 g/L para el caso de la cepa silvestre y la cepa 3M con el vector pZSKLMgIdA.

En ambas cepas, el no tener triptona en el medio afecta significativamente la μ . Para el caso de la cepa silvestre se observa un incremento en la μ mientras se incrementa gradualmente la concentración de triptona en el medio. Por otro lado, para la cepa 3M, la μ fue similar en las distintas concentraciones de triptona, lo que podría sugerir que se alcanza la mayor producción de biomasa posible. Dado lo anterior, surge la pregunta de cuánta triptona es la mínima necesaria para impulsar el crecimiento de la cepa.

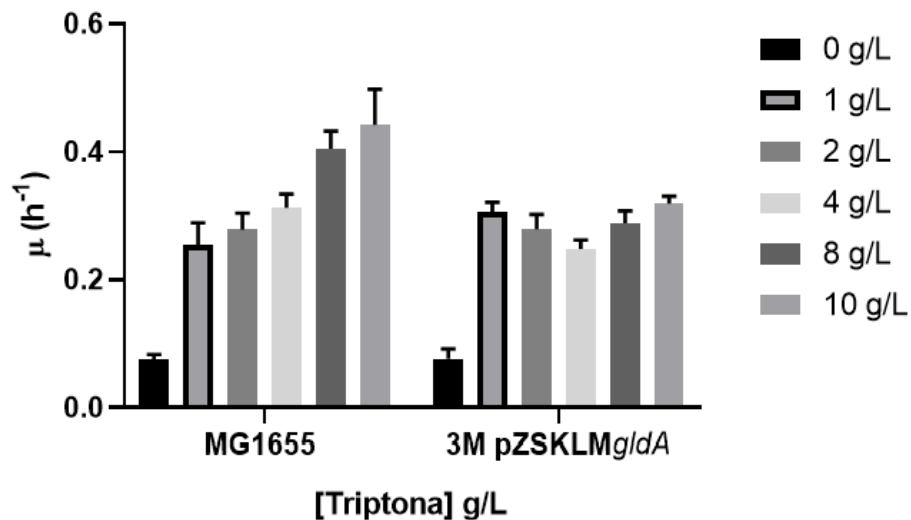


Figura 43. Diagrama de barras comparando la μ en las cepas silvestre y 3M pZSKLMgIdA a diferentes concentraciones de triptona en el medio. Las cepas se evaluaron en microplaca con diferentes concentraciones de triptona en el medio desde 0 hasta 10 g/L con 10 g/L de glicerol. En la cepa silvestre existe diferencia significativa con 8 y 10 g/L de triptona respecto a las demás concentraciones, mientras que en la cepa 3M pZSKLMgIdA no existe diferencia significativa entre las concentraciones utilizadas.

Lo anterior confirma que la biomasa alcanzada por la cepa 5M corresponde al consumo de triptona presente en el medio.

6.9 Comparación de mutantes obtenidas de *E. coli*

La Tabla 8 muestra la comparación de los parámetros calculados para las mutantes obtenidas en este trabajo. En el caso de las cepas 3M y SY03 con el plásmido pZSKLM*gldA*, presentaron un μ mayor a las cepas sin el plásmido, sin embargo, la cepa silvestre con el plásmido no presentó una mejora en el μ y tampoco en los demás parámetros. La cepa que presentó mejor rendimiento de producción de etanol fue la cepa 3M con el plásmido pZSKLM*gldA* seguido de la cepa SY03 pZSKLM*gldA*, sin embargo, la que presentó un mayor consumo volumétrico de glicerol fue la cepa SY03.

Tabla 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de las mutantes generadas en este trabajo

| Cepa | μ (h^{-1}) | $Y_{X/S}$ (g_{DCW}/g_{Gly}) | $Y_{P/S}$ (g_{EtOH}/g_{Gly}) | Q_S (g/L h) |
|------------------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------|
| MG1655 | 0.086 ± 0.014 | 0.086 ± 0.012 | 0.341 ± 0.073 | 0.095 ± 0.015 |
| MG1655 pZSKLM <i>gldA</i> | 0.100 ± 0.006 | 0.053 ± 0.000 | 0.329 ± 0.096 | 0.105 ± 0.005 |
| 2M | 0.090 ± 0.006 | 0.038 ± 0.002 | 0.223 ± 0.022 | 0.080 ± 0.004 |
| 3M | 0.108 ± 0.013 | 0.103 ± 0.004 | 0.271 ± 0.042 | 0.040 ± 0.017 |
| 4M | 0.083 ± 0.002 | 0.095 ± 0.021 | 0.165 ± 0.103 | 0.027 ± 0.005 |
| 5M | 0.083 ± 0.017 | - | - | - |
| 3M pZSKLM <i>gldA</i> | 0.149 ± 0.002 | 0.080 ± 0.004 | 0.412 ± 0.003 | 0.108 ± 0.011 |
| 4M <i>lacZ::dhaK</i> | 0.070 ± 0.008 | 0.101 ± 0.040 | 0.180 ± 0.001 | 0.030 ± 0.010 |
| 4M pLoxGentrcd <i>haK</i> | 0.077 ± 0.003 | 0.135 ± 0.027 | 0.221 ± 0.027 | 0.043 ± 0.003 |
| SY03 | 0.098 ± 0.009 | 0.050 ± 0.004 | 0.357 ± 0.095 | 0.122 ± 0.002 |
| SY03 pZSKLM <i>gldA</i> | 0.113 ± 0.011 | 0.067 ± 0.011 | 0.385 ± 0.067 | 0.118 ± 0.010 |

μ , velocidad específica de crecimiento calculada en la fase exponencial; $Y_{X/S}$, rendimiento biomasa/sustrato; $Y_{P/S}$, rendimiento producto/sustrato; Q_S , consumo volumétrico de glicerol

En cuanto al consumo volumétrico, la cepa 3M con el vector pZSKLM*gldA* presenta un consumo volumétrico 3 veces mayor respecto a la cepa 3M sin el plásmido, lo que sugiere que ambos genes (*gldA* y *dhaKLM*) son importantes en la asimilación y metabolismo del glicerol en anaerobiosis, como confirmamos con la construcción de la cepa 5M. Lo anterior también se ve reflejado en la cantidad de glicerol consumido después de 72 h en los minifermentadores, la cual fue mayor en

la cepa 3M con el plásmido por más de dos veces el consumo de la cepa sin plásmido, lo que también resultó en una mayor densidad celular.

6.10 Modelamiento a escala genómica

La Figura 44 muestra el flujo en porcentaje de las reacciones que conforman una parte del metabolismo de *E. coli* de la cepa silvestre y de las mutantes 2M y 3M pZSKLM*gldA*. El propósito de utilizar el modelo para la evaluación de las cepas es entender la variación de los flujos de las mutantes construidas respecto a la cepa silvestre, ya que el perfil metabólico cambia considerablemente. Lo que encontramos dentro de las soluciones del modelo, es que sugiere la producción de lactato cuando se eliminan los genes *pta* y *frdA* al alterar el poder reductor obtenido y la producción de ATP. Sin embargo, la compensación en el consumo del poder reductor generado en las primeras reacciones del metabolismo no está claro dentro del esquema presentado en la figura. La única ruta de consumo de NADH + H⁺ directa a partir de piruvato es la obtención de lactato que, aunque también se cuenta con la ruta de obtención de etanol consumiendo el doble de equivalentes reductores, el modelo sugiere que la conversión de piruvato a lactato es preferible respecto a la conversión a acetil-CoA. Lo anterior se ve reflejado en los valores de flujo de la Figura 44 para la cepa 2M.

En cuanto a la cepa 3M, al eliminar el gen *ldhA*, se restablece la producción mayoritaria de etanol, donde el modelo sugiere de igual manera un mayor flujo hacia la producción de H₂ y CO₂, concluyendo que las condiciones son favorables para la conversión del formiato en los componentes previamente mencionados.

Por otro lado, el flujo hacia gluconeogénesis es mínimo y se mantiene sin cambios significativos en las mutantes. Sin embargo, la cepa que presenta una mayor proporción del flujo total hacia la ruta gluconeogénica (mediante FBA) es la 3M, la cual también presenta una mayor producción de biomasa. Dado que el medio utilizado para estos cultivos contiene 10 g/L de glicerol y 2 g/L de triptona no se puede realizar la validación del modelo por la producción de biomasa total, ya que el modelo no contempla la entrada de dos fuentes de carbono y energía, y como se vio en experimentos presentados anteriormente, la triptona aporta la mayor parte de flujo de carbono

y energía hacia la μ (producción de biomasa) asumiendo que el glicerol se utiliza principalmente para la formación de metabolitos precursores del metabolismo central del carbono (como PEP, piruvato y acetil-CoA) y productos de fermentación.

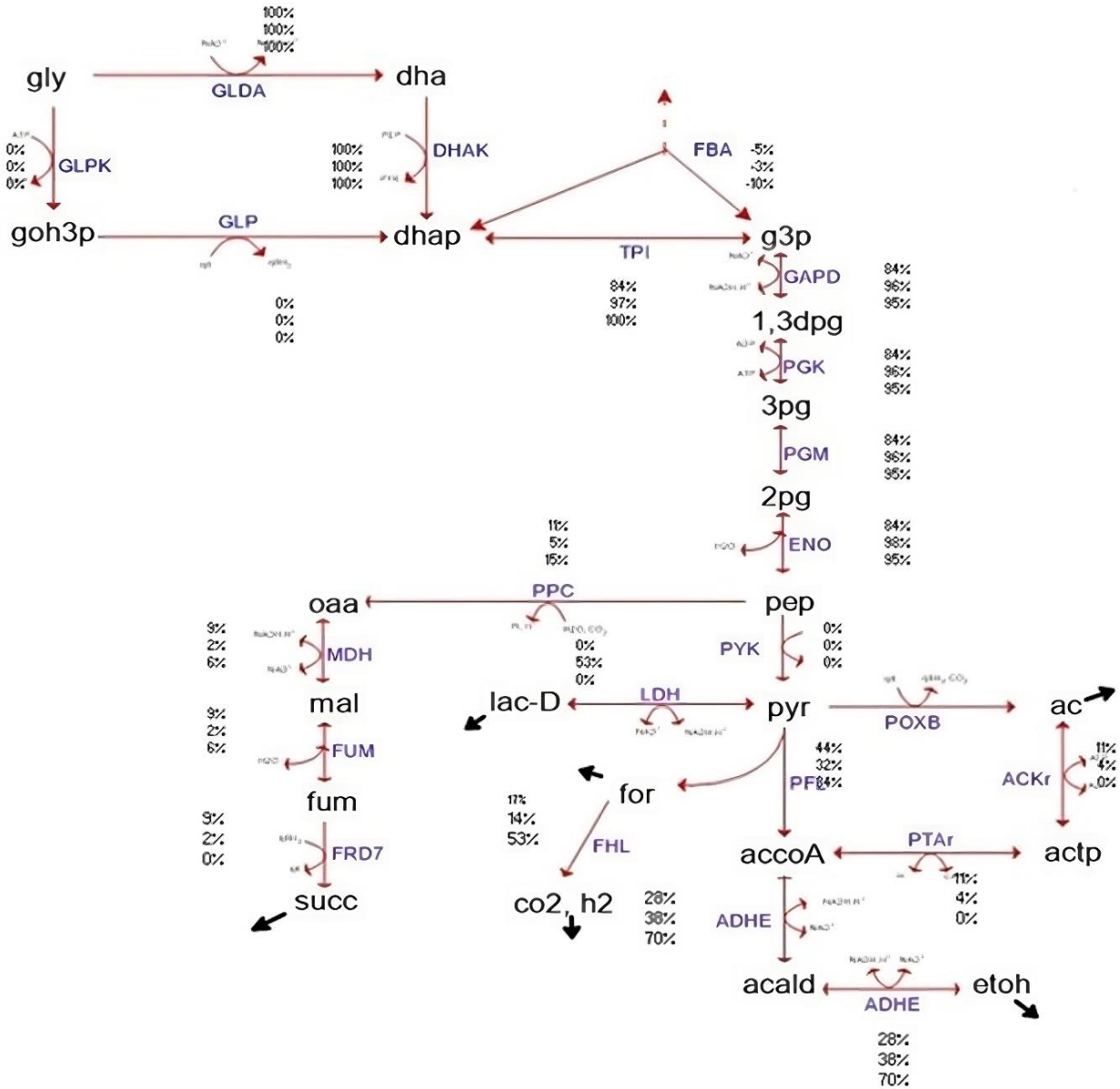


Figura 44. Esquema del metabolismo de *E. coli* mostrando el porcentaje de flujo de carbono de cada reacción en las cepas silvestre (MG1655), 2M y 3M pZSKLMgldA. En las reacciones que se muestran en el esquema se muestra el porcentaje del flujo de carbono en la cepa silvestre, 2M y 3M pZSKLMgldA en orden descendente.

Otra razón de utilizar los modelos a escala genómica en este proyecto fue para resolver el aporte que tendría el intercambio del gen *dhaK* de *E. coli* por el de *K. oxytoca*. Como se explicó anteriormente, la diferencia entre el gen de ambas cepas es que la proteína que expresa el gen de *E. coli* es dependiente de PEP para fosforilar el sustrato (dihidroxiacetona), mientras que el de *K. oxytoca* es dependiente de ATP, por lo que podría favorecer el flujo al no depender de la disponibilidad de PEP, el cual es utilizado en diferentes partes del metabolismo de *E. coli*. Además de lo anterior, la actividad enzimática reportada en anaerobiosis es casi 10 veces mayor para la enzima expresada por el gen de *K. oxytoca*. Aunque en este trabajo no se observó una ventaja de la enzima DhaK de *K. oxytoca* de acuerdo a lo obtenido en los ensayos de actividad enzimática, una forma de corroborar el beneficio que proporciona el intercambio de enzima dependiente de PEP por ATP, es utilizar los modelos a escala genómica.

función objetivo la producción de biomasa a partir de glicerol. El modelo sugiere que la relación de flujos permanece constante en el metabolismo glucolítico, pero aumenta hacia la gluconeogénesis (obteniendo una mayor producción de biomasa) y en la formación de los metabolitos de interés. Lo anterior sugiere que podría ser beneficioso en este sistema el uso de la enzima dependiente de ATP, sin embargo, tendría que comprobarse experimentalmente.

7. Conclusiones

- *E. coli* MG1655 es capaz de consumir glicerol como única fuente de carbono para la producción de etanol, hidrógeno y CO₂ como principales metabolitos de fermentación, sin embargo, debido a la baja velocidad de consumo y/o metabolismo del glicerol, no se alcanza el consumo total de la fuente de carbono en las condiciones descritas después de 72 h y por lo tanto las productividades no son competitivas comparada con otros procesos para la producción de productos de fermentación a partir de azúcares como la glucosa.
- La producción de lactato se ve favorecida al eliminar las rutas metabólicas relacionadas con la producción de acetato y succinato (Cepas 1M y 2M), ya que la producción de lactato produce un equivalente reductor de manera inmediata comparada con la producción de etanol. Lo anterior genera un desbalance redox, es decir un exceso de NADH, que es tóxico para la célula afectando distintos procesos celulares.
- La eliminación de los genes *pta* y *frdA*, de las vías de producción de acetato y succinato, afecta la velocidad de consumo de glicerol, debido a que se evita la producción de 2 moléculas de ATP que son útiles en el crecimiento celular.
- La eliminación del gen *ldhA* reduce significativamente la producción de lactato en la cepa 3M, la cual presenta 20% mayor μ que las dos cepas previamente modificadas (MG1655 Δ *pta* y MG1655 Δ *pta* Δ *frdA*), lo que sugiere que se restablece el balance redox.
- La expresión de los genes *gldA* y *dhaK* en vector (pZSKLM*gldA*) mejora la μ (+30%) y la cantidad de glicerol (+60%) consumido en la cepa 3M provocando un mayor flujo de glicerol hacia dihidroxiacetona fosfato, ya que codifican para las enzimas encargadas de la asimilación del glicerol en anaerobiosis.
- Las cepas SY03 (MG1655 Δ *frdA* Δ *pta*::Km^R; Yazdani y Gonzalez, 2008) y 2M (MG1655 Δ *pta* Δ *frdA*) tienen el mismo fondo genético. Sin embargo, su cinética de crecimiento y el perfil metabólico son distintos, por lo que en este trabajo no fueron replicables los resultados obtenidos por el grupo de Gonzalez. La secuenciación de ambas cepas mostraría las posibles diferencias genéticas que expliquen el distinto comportamiento entre cada una (resultados de secuenciación en Anexos), posteriormente podrían realizarse análisis transcripcionales para comprender las diferencias de expresión génica en las cepas.

- El consumo de glicerol en condiciones anaerobias ocurre por la vía GldA-DhaK, la cual al sobreexpresarse en vector en la cepa 3M presenta una tasa de consumo dos veces mayor. Por otro lado, cuando la vía GldA-DhaK se interrumpe, el flujo de glicerol hacia piruvato ocurre por GlpK-GlpD, la cual es una vía de uso preferencial en aerobiosis.
- La suplementación del medio con triptona es necesaria para promover el crecimiento celular cuando se tiene una fuente de carbono como el glicerol.
- La enzima de *K. oxytoca* que se clonó en la cepa 4M no presenta una ventaja en el consumo de glicerol, lo anterior puede deberse: a errores en la clonación, que la enzima no se esté plegando correctamente o que el gen no se esté expresando.

8. Perspectivas

- En este trabajo se utilizó el modelo posterior a la parte experimental, sin embargo, se puede utilizar de manera inversa donde el modelo sirva para plantear hipótesis que se puedan comprobar experimentalmente. Ahora que aprendí del modelo y un poco de biología de sistemas, puedo realizar varias simulaciones de preguntas que surgen con los resultados. En ese aspecto, se sugiere modelar una ecuación de entrada de triptona donde sus componentes sean asimilados por la biomasa o dirigidos a metabolitos de interés. De igual manera, se podría estudiar a mayor profundidad el flujo de equivalentes reductores en *E. coli* consumiendo glicerol.
- Se propone que se estudie el metabolismo de la triptona y glicerol individualmente, tanto en simulaciones del modelo como experimentalmente, ya que puede existir un metabolito que no le esté proporcionando el glicerol a la cepa y que sea indispensable para el crecimiento de *E. coli*.
- En este trabajo se suplementó el medio con 2 g/L de triptona, sin embargo, es conveniente hacer evaluaciones a diferentes concentraciones mínimas de triptona para posteriormente utilizar la cantidad de triptona mínima necesaria sin perjudicar el crecimiento de *E. coli* o bien sustituir la triptona por un componente complejo usado en cultivos industriales de *E. coli* y que aporten una mayor variedad de micronutrientes, tales como el extracto de levadura lisada y el licor de maíz residual del proceso de maceración de este grano (corn steep liquor).
- Realizar la clonación del gen *dhaK* de *K. oxytoca* en *E. coli* resolviendo el problema descrito en este trabajo. Es necesario secuenciar el gen, así como comparar las secuencias del gen obtenido de la cepa *K. oxytoca* con otras enzimas DhaK de otros organismos que utilicen ATP como donador de grupo fosfato.
- Estudiar a fondo el metabolismo de glicerol desde su internalización y transporte celular, ya que el crecimiento lento podría deberse a los transportadores de glicerol. De igual manera es necesario probar diferentes concentraciones de glicerol en el medio y analizar el impacto que tiene en el crecimiento y la formación de productos.

- Desarrollar una estrategia de evolución adaptativa en glicerol con la cepa 3M analizando los cambios genéticos acumulados en la cepa que tenga una mejor μ en glicerol, así como mayor velocidad de consumo volumétrico y que a su vez produzca los metabolitos de interés en este trabajo. También podría realizarse evolución adaptativa sobre la cepa silvestre para mejorar la asimilación de glicerol y posteriormente realizar ingeniería metabólica para dirigir ese carbono hacia cualquier metabolito deseado.
- Generar una estrategia de cultivo donde la producción de biomasa y asimilación de glicerol no sea una limitante, lo anterior por un cultivo alimentado donde se genere cierta cantidad de biomasa en condiciones aerobias o cambiando la fuente de carbono a glucosa y posteriormente se utilice el glicerol en condiciones anaerobias para producir los metabolitos de interés.

9. Bibliografía

- Atilhan, S., Park, S., El-Halwagi, M. M., Atilhan, M., Moore, M., & Nielsen, R. B. (2021). Green hydrogen as an alternative fuel for the shipping industry. In *Current Opinion in Chemical Engineering* (Vol. 31, p. 100668). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2020.100668>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Blankschien, M. D., Clomburg, J. M., & Gonzalez, R. (2010). Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of succinate from glycerol. *Metabolic Engineering*, 12(5), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.06.002>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. In *Science* (Vol. 277, Issue 5331, pp. 1453–1462). Science. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Booth, I. R. (2005). Glycerol and Methylglyoxal Metabolism. *EcoSal Plus*, 1(2). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.3>
- Camacho Zaragoza, J. M. (2016). *Ingeniería de vías metabólicas para la biosíntesis de resveratrol en Escherichia coli*.
- Chávez Béjar, M. I. (2010). *Ingeniería de vías metabólicas para la producción de tirosina y melanina a partir de glucosa en Escherichia coli*.
- Chen, J., Zhang, B., Luo, L., Zhang, F., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Wang, X., & Lü, X. (2021). A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 149, p. 111370). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111370>
- Ciani, M. (2019). *Informe de biocombustibles, Abril 2019*.
- Costa, M. A. S., Cerri, B. C., & Ceccato-Antonini, S. R. (2018). Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate Lactobacillus fermentum from the fermentation process for fuel ethanol production. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 77–85. <https://doi.org/10.1111/lam.12819>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/PNAS.120163297>
- Dharmadi, Y., Murarka, A., & Gonzalez, R. (2006). Anaerobic fermentation of glycerol by Escherichia coli: A new platform for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(5), 821–829. <https://doi.org/10.1002/bit.21025>
- Dunn, J. B. (2019). Biofuel and bioproduct environmental sustainability analysis. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 57, pp. 88–93). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.008>
- Dunn, S. (2002). Hydrogen futures: Toward a sustainable energy system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(3), 235–264. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(01\)00131-8](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(01)00131-8)
- Durnin, G., Clomburg, J., Yeates, Z., Alvarez, P. J. J., Zygorakis, K., Campbell, P., & Gonzalez, R. (2009). Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in Escherichia coli. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(1), 148–161. <https://doi.org/10.1002/bit.22246>
- Gleizer, S., Ben-Nissan, R., Bar-On, Y. M., Antonovsky, N., Noor, E., Zohar, Y., Jona, G., Krieger, E., Shamshoum, M., Bar-Even, A., & Milo, R. (2019). Conversion of Escherichia coli to Generate All Biomass Carbon from CO₂. *Cell*, 179(6), 1255-1263.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.009>
- Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y., & Yazdani, S. S. (2008a). A new model for the anaerobic

- fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 10(5), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.05.001>
- Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y., & Yazdani, S. S. (2008b). A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 10(5), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.05.001>
- Gray, K. A., Zhao, L., & Emptage, M. (2006). Bioethanol. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 10, Issue 2, pp. 141–146). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.035>
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L., Mori, H., & Horiuchi, T. (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 2006.0007. <https://doi.org/10.1038/msb4100049>
- Hu, H., & Wood, T. K. (2010). An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 1033–1038. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.013>
- IEA-AMF. (2017). *Ethanol properties*. https://iea-amf.org/content/fuel_information/ethanol/e10/ethanol_properties
- Katryniok, B., Paul, S., Bellière-Baca, V., Rey, P., & Dumeignil, F. (2010). Glycerol dehydration to acrolein in the context of new uses of glycerol. *Green Chemistry*, 12(12), 2079–2098. <https://doi.org/10.1039/c0gc00307g>
- Knappe, J., Schacht, J., Möckel, W., Höpner, T., Vetter, H., & Edenharder, R. (1969). Pyruvate Formate-Lyase Reaction in *Escherichia coli* The Enzymatic System Converting and Inactive Form of the Lyase into the Catalytically Active Enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 11(2), 316–327. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00775.x>
- Kwang, B. Y., & Harrison, D. P. (2005). Low-pressure sorption-enhanced hydrogen production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(6), 1665–1669. <https://doi.org/10.1021/ie048883g>
- Li, Q., Wu, H., Li, Z., & Ye, Q. (2016). Enhanced succinate production from glycerol by engineered *Escherichia coli* strains. *Bioresource Technology*, 218, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.090>
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 69, Issue 6, pp. 627–642). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>
- Maeda, T., Sanchez-Torres, V., & Wood, T. K. (2007). Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), 879–890. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1217-0>
- Maeda, T., Tran, K. T., Yamasaki, R., & Wood, T. K. (2018). Current state and perspectives in hydrogen production by *Escherichia coli*: roles of hydrogenases in glucose or glycerol metabolism. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 102, Issue 5, pp. 2041–2050). <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8752-8>
- Martínez-Gómez, K., Flores, N., Castañeda, H. M., Martínez-Batallar, G., Hernández-Chávez, G., Ramírez, O. T., Gosset, G., Encarnación, S., & Bolivar, F. (2012). New insights into *Escherichia coli* metabolism: Carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-46>
- Martínez-Valenzuela, M. (2018). *Ingeniería metabólica en una de Escherichia coli no fermentativa para la producción de ácido succínico a partir de glucosa*. UNAM-IBt.
- Martínez Álvarez, J. A. (2019). *Modelación matemática y análisis de superficies de respuesta para una cepa de Escherichia coli modificada por ingeniería de vías metabólicas para la producción de ácido shikímico*.
- Martínez García, M. de los Á. (2020). *Ingeniería metabólica de Escherichia coli para la producción de ácido*

- succínico a partir de glicerol*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Meher, L. C., Vidya Sagar, D., & Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 10, Issue 3, pp. 248–268). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>
- Mendoza Flores, R. (2021). *Ingeniería de vías metabólicas para la producción de aminoshikimato en cepas de Escherichia coli PTS-*.
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=a+short+course+in+bacterial+genetics+miller&btnG=
- Monk, J. M., Koza, A., Campodonico, M. A., Machado, D., Seoane, J. M., Palsson, B. O., Herrgård, M. J., & Feist, A. M. (2016). Multi-omics Quantification of Species Variation of Escherichia coli Links Molecular Features with Strain Phenotypes. *Cell Systems*, 3(3), 238-251.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.08.013>
- Murarka, A., Dharmadi, Y., Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2008). Fermentative utilization of glycerol by Escherichia coli and its implications for the production of fuels and chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1124–1135. <https://doi.org/10.1128/AEM.02192-07>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 2, pp. 578–597). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., & Smith, D. F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, 119(3), 736–747. <https://doi.org/10.1128/jb.119.3.736-747.1974>
- Oh, Y. K., Hwang, K. R., Kim, C., Kim, J. R., & Lee, J. S. (2018). Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. In *Bioresource Technology* (Vol. 257, pp. 320–333). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.089>
- Orth, J. D., Conrad, T. M., Na, J., Lerman, J. A., Nam, H., Feist, A. M., & Palsson, B. (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of Escherichia coli metabolism-2011. *Molecular Systems Biology*, 7, 535. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.65>
- Pontrelli, S., Chiu, T. Y., Lan, E. I., Chen, F. Y. H., Chang, P., & Liao, J. C. (2018). Escherichia coli as a host for metabolic engineering. In *Metabolic Engineering* (Vol. 50, pp. 16–46). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>
- Quan, J., & Tian, J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nature Protocols*, 6(2), 242–251. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W. J., Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, C. L., Mielenz, J. R., Murphy, R., Templer, R., & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. In *Science* (Vol. 311, Issue 5760, pp. 484–489). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1114736>
- Rosales-Colunga, L. M., Razo-Flores, E., Ordoñez, L. G., Alatraste-Mondragón, F., & De León-Rodríguez, A. (2010). Hydrogen production by Escherichia coli $\Delta hycA \Delta lacI$ using cheese whey as substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(2), 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.097>
- Sabido, A., Martínez, L. M., de Anda, R., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2013). A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: Use for developing a genetically stable Escherichia coli melanin production strain. *Plasmid*, 69(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.04.005>
- Sanchez-Torres, V., Mohd Yusoff, M. Z., Nakano, C., Maeda, T., Ogawa, H. I., & Wood, T. K. (2013). Influence of Escherichia coli hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol. *International*

- Journal of Hydrogen Energy*, 38(10), 3905–3912. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.031>
- Shams Yazdani, S., & Gonzalez, R. (2008). Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*, 10(6), 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.08.005>
- Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2021). Principles and practice of designing microbial biocatalysts for fuel and chemical production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab016>
- Shimizu, K. (2013). Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites*, 4(1), 1–35. <https://doi.org/10.3390/metabo4010001>
- Srivastav, D., Singh, A. P., & Kumar, A. (2014). Fossil Fuels Running out: Third Generation Micro Algal Biofuels Showing Light of Hope. *OALib*, 01(03), 1–10. <https://doi.org/10.4236/oalib.1100707>
- Tan, H. W., Abdul Aziz, A. R., & Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 27, pp. 118–127). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.035>
- Tarmy, E. M., & Kaplan, N. O. (1968). Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* B. *Journal of Biological Chemistry*, 243(10), 2579–2586. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)93413-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)93413-7)
- Valle, A., Cantero, D., & Bolívar, J. (2019). Metabolic engineering for the optimization of hydrogen production in *Escherichia coli*: A review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 5, pp. 616–633). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.006>
- Vassilev, N., Malusa, E., Requena, A. R., Martos, V., López, A., Maksimovic, I., & Vassileva, M. (2017). Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(4–5), 735–743. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1810-2>
- Vuoristo, K. S., Mars, A. E., Sanders, J. P. M., Eggink, G., & Weusthuis, R. A. (2016). Metabolic Engineering of TCA Cycle for Production of Chemicals. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 34, Issue 3, pp. 191–197). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.11.002>
- Wang, L., Chauliac, D., Rhee, M. S., Panneerselvam, A., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2018). Fermentation of dihydroxyacetone by engineered *Escherichia coli* and *Klebsiella variicola* to products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(17), 4381–4386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801002115>
- Westbrook, A. W., Miscevic, D., Kilpatrick, S., Bruder, M. R., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2019). Strain engineering for microbial production of value-added chemicals and fuels from glycerol. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37, Issue 4, pp. 538–568). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.006>
- Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 213–219). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.05.002>
- Yoshida, A., Nishimura, T., Kawaguchi, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2006). Enhanced hydrogen production from glucose using ldh- and frd-inactivated *Escherichia coli* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(1), 67–72. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0456-9>
- Yu, Y., Zhu, X., Xu, H., & Zhang, X. (2019). Construction of an energy-conserving glycerol utilization pathways for improving anaerobic succinate production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 56, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.10.002>
- Zhang, X., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2010). Fermentation of glycerol to succinate by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2397–2401. <https://doi.org/10.1128/AEM.02902-09>

10. Anexos

Solución MC (1 mL)

| Componente | Concentración final |
|----------------------------------|-------------------------|
| 10 uL MgSO ₄ 1M | MgSO ₄ 10 mM |
| 5 uL CaCl ₂ 1M | CaCl ₂ 5mM |
| 985 uL de agua destilada estéril | - |

Preparación de medios utilizados

El medio Luria-Bertani se preparó siguiendo la composición de la siguiente tabla, donde el volumen final se ajustó a 1 L, se ajustó el pH a 7.00 y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120°C.

Medio Luria-Bertani LB

| Componente | Peso (g) |
|-----------------------|----------|
| Triptona | 10 |
| Extracto de levadura | 5 |
| Cloruro de sodio NaCl | 10 |

En este estudio se utilizó el medio mineral de Neidhardt (Neidhardt *et al.*, 1974) haciéndole algunas modificaciones y suplementado con 2 g/L de triptona, 5 mM selenito de sodio y 10 g/L de glicerol.

En la siguiente tabla se describen los componentes y las cantidades para preparar un litro del medio mínimo utilizado. Los ingredientes se mezclaron y se ajustó el pH a 7.2 o 6.3 según se especifique con NaOH 10 M. La mezcla se esteriliza por filtración con membrana de 0.2 micrones y se almacena a 4°C.

Medio mínimo MOPS

| Componente | Volumen (mL) |
|--|--------------|
| Mezcla MOPS 10X/Mezcla 10X | 100 |
| Na ₂ HPO ₄ 0.132 M | 10 |
| H ₂ O miliQ | 880 |
| Glicerol | 7.94 |

*La Mezcla MOPS 10X fue utilizada únicamente para el preinóculo mientras que la Mezcla 10X se utiliza para evaluación en minifermentadores.

La preparación de la Mezcla MOPS 10X se describe a continuación. Para preparar un litro se mezclan los ingredientes descritos y el pH se ajusta a 7.4.

Mezcla MOPS 10X

| Componente | Volumen (mL) |
|--|--------------|
| MOPS* | 100 |
| Tricina | 10 |
| FeSO ₄ *7H ₂ O | 880 |
| NH ₄ Cl 1.9 M | 10 |
| K ₂ SO ₄ 0.276 M | 10 |
| CaCl ₂ *2H ₂ O | 0.25 |
| MgCl ₂ 2.5 M | 2.1 |
| NaCl 5 M | 100 |
| Stock de micronutrientes** | 0.2 |

*No se agrega para la evaluación en minifermentadores

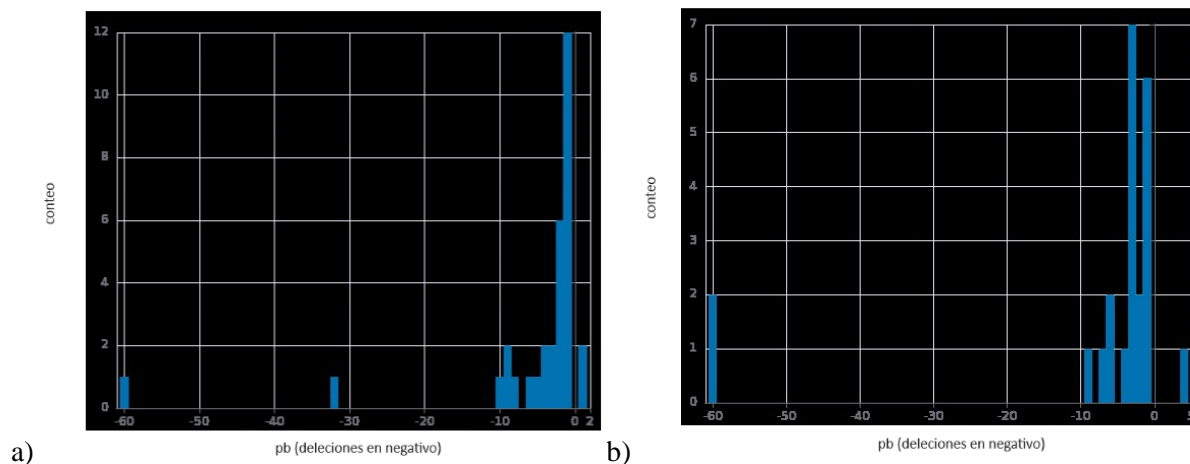
**Su preparación se describe en la siguiente tabla

Stock de micronutrientes (50 mL)

| Componente | Gramos | Concentración (M) |
|----------------------|--------|-------------------|
| Molibdato de amonio | 0.009 | 0.000146 |
| Ácido bórico | 0.062 | 0.020055 |
| Cloruro de cobalto | 0.018 | 0.001513 |
| Sulfato de cobre | 0.006 | 0.004806 |
| Cloruro de manganeso | 0.04 | 0.004042 |
| Sulfato de zinc | 0.007 | 0.000487 |

Resultados de secuenciación de las cepas 2M y SY03

Las muestras de ADN genómico se secuenciaron con la empresa SECOYA Labs, donde también se realizó el ensamble bioinformático tomando como genoma de referencia la cepa MG1655 anotado en el NCBI (GCF_904425475.1). Posteriormente, las secuencias se alinearon usando el servidor MAUVE para finalmente analizar las diferencias en el genoma.



La figura muestra las inserciones y deleciones de pares de base a lo largo de las secuencias genómicas analizadas (la a corresponde a la cepa 2M y la b a la cepa SY03) respecto al genoma de referencia.

Analizando las figuras, existen distintas variaciones en ambas secuencias por lo que ambas cepas se alinearon respecto al genoma de referencia para analizar los cambios. En la siguiente tabla se muestran los genes afectados por mutaciones en ambas cepas respecto al genoma de referencia.

| Cepa | Posición | Mutación | Gen | Función |
|------|--|---|--------------|--|
| 2M | 47583 | Inserción de TAA | <i>kefF</i> | Gen regulador del transporte de potasio mediado por KefC y de la quinona oxidoreductasa. |
| | 1523857 | Deleción de A | <i>ansP</i> | Transportador de L-asparagina. |
| SY03 | 257923 258345 1978579 1979001 | Inserción completa del gen en las posiciones anteriores | <i>insA1</i> | Secuencia corta de ADN que actúa como un elemento transponible. Es uno de los elementos de inserción más pequeños conocidos. |
| | 258741 | Deleción de 75 pb | <i>crl</i> | Es un factor de transcripción que estimula la asociación del factor σ con la ARN polimerasa, aumentando la tasa de |

| | | | | |
|---------|-----------------|---------------|--|--|
| | | | | transcripción de genes durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria a bajas temperaturas, y utiliza el indol como molécula efectora. |
| 2172990 | Inserción de CC | <i>gatC_1</i> | | Subunidad del sistema PTS transportadora específica de galactitol. |
| 3344169 | Sustitución C→A | <i>lptB*</i> | | Sistema de transporte de lipopolisacáridos. |
| 3559921 | Delección de G | <i>glpR</i> | | Represor del regulón de glicerol-3-fosfato en presencia de glucosa, su unión a ADN disminuye en presencia de glicerol. |
| 4309510 | Delección de A | <i>rbsA</i> | | Transportador tipo ABC de ribosa. Subunidad de unión a ATP. |

A demás de las variaciones reportadas en la tabla, se comprobó la eliminación de los genes *pta* y *frdA*, así como la presencia del gen *ldhA*.

La cepa SY03 contiene más variaciones respecto al genoma de referencia comparado con la cepa 2M generada en este trabajo. Uno de los cambios que podría estar generando una diferencia significativa en el comportamiento de la cepa es la mutación en el gen *glpR* donde el gen no presenta la secuencia completa por lo que no se une al ADN como represor. Aunque este represor, solo se une al ADN en presencia de glucosa, podría estar afectando la regulación de los genes asociados con el glicerol.

En la tabla, el asterisco representa que la mutación el gen no afecta el marco de lectura. El caso de la mutación puntual en el gen *lptB* genera un cambio de base de C→A sin afectar el marco de lectura del gen. Las demás mutaciones corresponden a inserción o eliminación de más de un par de base.

Mapas de vectores utilizados en este proyecto

