



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCÁTÁLISIS

INGENIERÍA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA LA
PRODUCCIÓN HOMOFERMENTATIVA DE L-LACTATO A
PARTIR DE XILOSA

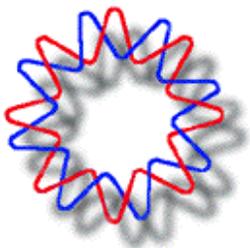
T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Q.A. LAURA JULIETA LEAL REYES



TUTOR: DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

CUERNAVACA, MORELOS

2010



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.

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

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT 207245 y los proyectos: EDO. DE MORELOS 2007-C01-80360 y Proinnova 2010; y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IN220908.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Leobardo Serrano Carreón	Instituto de Biotecnología - UNAM
Dra. Clarita Olvera Carranza	Instituto de Biotecnología - UNAM
Dr. Alfredo Martínez Jiménez	Instituto de Biotecnología - UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente	Dra. Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología UNAM
Secretario	Dr. Joel Osuna Quintero	Instituto de Biotecnología UNAM
Vocal	Dr. Jorge Luis Folch Mallol	Centro de Investigación en Biotecnología - UAEM
Suplente	Dr. Rafael Vázquez Duhalt	Instituto de Biotecnología UNAM
Suplente	Dr. Alfredo Martínez Jiménez	Instituto de Biotecnología UNAM

Querido Dios

*Gracias por permitirme disfrutar de este mundo.
Tu amor siempre lo he tenido, de él está lleno mi entorno.
No veo el viento pero lo siento cuando acaricia mi rostro o se enreda en mi pelo.
Así estás Tú, junto a mí en todo momento.*

A mi Madre Julia Reyes Vidal:

*Porque gracias a ti soy quien hoy soy.
Por contar con tu abrazo eterno, por enseñarme a ser valiente y perseverante en esta vida.
Por ser mi motor y mí impulso a seguir. Porque juntas encontramos la clave exacta para no
rendirnos y luchar hasta obtener lo que queremos y lo logramos, superamos la adversidad e
hicimos el sueño realidad. “Volvimos a caminar”*

A mi Padre Dr. Luis Gabriel Leal Díaz:

*Porque gracias a ti he podido llegar a culminar este sueño largamente acariciado.
Por brindarme siempre palabras de aliento y enseñarme a visualizar
las adversidades como un reto más a superar.
Por ser un ejemplo de constancia y dedicación en el ámbito profesional.*

A Q.A. Efraín Huerta Moncayo

*Por demostrarme que el sentimiento auténtico es el que prevalece, por tenerme siempre
presente. Por hacer de las vivencias compartidas momentos memorables, por mantener la
convivencia y seguirla acrecentando. Porque a tu lado se dibuja la mejor de mis sonrisas.*

A Dr. Martín Trujillo Figueroa

*Por brindarme su amistad durante este recorrido.
Por sus pláticas sobre la vida universitaria y lo que significa realizar un posgrado.
Por escucharme y darme siempre los mejores consejos, por sus valiosas enseñanzas.
Por su paciencia y el tiempo compartido.*

Agradecimientos

***A la Máxima Casa de Estudios y a la mejor Universidad de este país:
A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.***

*Por darme la oportunidad de convertirme en profesionista y
poder disfrutar de las experiencias que ello conlleva.*

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

*Por ser ese crisol científico que me acercó a la investigación, me otorgó apoyo incondicional
en todos los laboratorios a los que acudí y además me brindó amistades en esta etapa.*

Dra. Consuelo Vázquez Limón.

Por otorgar el plásmido plctE, fundamental en la realización de este proyecto.

Dr. Gerardo Huerta Beristáin.

*Gracias, por tu invaluable apoyo metodológico, por compartir conmigo no sólo
conocimientos sino también amistad.*

M en C. Gerogina Hernández Chávez.

Por su apoyo en la determinación de productos de fermentación mediante HPLC.

Técnico Laboratorista Mario Caro Bermúdez.

Por su valiosa colaboración en la unidad de fermentaciones.

A la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, SMBB.

*Por brindarme la beca para la asistencia al XIII Congreso Nacional de Biotecnología y
Bioingeniería. Acapulco Guerrero México. Junio 2009.*

**A mi Asesor:
Dr. Alfredo Martínez Jiménez**

Gracias por permitirme participar en este proyecto de ingeniería metabólica, brindarme su confianza y su apoyo, por la experiencia adquirida.

Al Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, así como sus sugerencias durante la realización del proyecto.

A mi comité tutorial:

Dra. Clarita Olvera Carranza, Dr. Leobardo Serrano Carreón y Dr. Alfredo Martínez J.

Por sus valiosas aportaciones y críticas que contribuyeron a la realización del proyecto y mi formación académica mediante los exámenes tutorales.

A los miembros del jurado:

**Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dr. Joel Osuna Quintero,
Dr. Jorge Luis Folch Mallol, Dr. Rafael Vázquez Duhalt y
Dr. Alfredo Martínez Jiménez**

Agradezco sus invaluable y certeros comentarios en la revisión de este proyecto.

A todos mis Profesores:

*Quienes me forjaron desde la niñez para poder llegar a culminar este objetivo.
Por haberme transmitido enseñanzas, conocimientos y vivencias.
De manera especial a aquellos que depositaron su confianza en mí y me apoyaron en las adversidades.*

A todos mis compañeros y amigos

Con quienes compartí experiencias inolvidables durante este trayecto.

A todas aquellas personas que a mi paso encontré y me brindaron su mano, me alentaron a continuar, me obsequiaron en una sonrisa la energía para seguir, de quienes hoy tengo su aprecio y confianza.

**A los miembros del laboratorio Bolívar-Gosset:
Al personal técnico académico y administrativo, en especial a:
C.D. Mercedes Enzaldo Cruz**

*Por tu dedicación y excelente disposición al trabajo del laboratorio.
Por tus palabras de aliento que me impulsaron a seguir adelante ante la adversidad, por escucharme y darme el mejor consejo. Por los detalles y por el tiempo que dedicaste a mí.*

A mis compañeros de laboratorio

En especial a I.B.Q. Inés Chávez Béjar, Dra. Montserrat Orenco Trejo, Dr. Víctor Balderas Hernández, Dr. Juan Carlos Sigala Alanís, Dr. Luis Caspeta Guadarrama por ser excelentes compañeros y amigos, por llevar una convivencia amena día a día.

A mis compañeros y amigos del IBT

*A Biól. Ariana Chávez Méndez, por ser una excelente colaboradora, por tu infinito apoyo, por compartir conmigo momentos alegres y difíciles, por tu incondicional amistad. Por hacer amenas las horas de clase y las libres, aquellas de estudio en el “Ariacnario”
Por considerarme siempre en la convivencia con el grupo del Dr. Alagón y a todos los integrantes del mismo.*

A Biól. Eleuterio Benites Zaragoza, M en C. Sara Centeno Leija, Ing. René Soto Martínez, por compartir este trayecto científico juntos, su apoyo, cariño y confianza en todo momento.

A mis entrañables amigas

A Q.F.B. Paola Mendoza Espinosa “Paolina” me congratulo de contar con tu amistad, que es motivo de celebración por siempre, gracias por acordarte de mí aún en la distancia. Compartir conmigo las oportunidades, nuestra amistad no conoce fronteras, sólo anchos horizontes.

A M en C. Olivia Zamora Martínez “Oli” gracias por las experiencias compartidas, las aventuras vividas, por dedicarme parte de tu tiempo y por todas tus atenciones que fortalecen nuestra amistad.

A Ing. Ind. Naimeth Ramos Tueme “Naim” en verdad gracias por anteponer nuestra amistad a la distancia, por no perder el contacto y por demostrarme que se enriquece día a día.

A mis amigas y amigos por siempre:

M en C. Haydée Cruz Bailón, M en C. Diana Macías Mendoza, M en C. Lilián Valencia Turcotte, M en L. Adelia Peña Clavel.

M en C. Cristina Fonseca, Lic. Gloria Guarneros, Nicole Trocherie, Danielle Martineau Olinca Salas Monroy, Alejandra Reyes.

IQ. Leopoldo García Arellano, Q.A. Miguel Angel Hernández Hernández, Dr. Ricardo Mejía Bautista, M en C. Eric Hernández Domínguez, M en B. Aarón Barraza Celis.

Les agradezco su apoyo, su comprensión, cariño, confianza y por darme la oportunidad de haber compartido con ustedes este tiempo.

Es un privilegio contar con su amistad.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
NOMENCLATURA.....	XIV
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. ANTECEDENTES.....	16
3.1 Ingeniería de Vías Metabólicas en la producción de lactato.....	16
3.2 Enzima lactato deshidrogenasa.....	24
3.2.1 Enzima lactato deshidrogenasa de <i>E. coli</i>	24
3.2.2 Enzima lactato deshidrogenasa de <i>B. subtilis</i>	24
3.2.3 Comparación de las propiedades catalíticas de las enzimas LDH de <i>E.coli</i> y <i>B. subtilis</i>	26
3.2.4 Mejoramiento de la enzima LDH.....	26
3.2.5 Efecto de la toxicidad de plásmidos multicopia de la enzima L-LDH de <i>B.subtilis</i> en <i>E.coli</i>	27
3.2.6 Abatimiento del efecto tóxico de plásmidos multicopia de la enzima L- LDH de <i>B.subtilis</i>	28
3.2.7 Posible efecto de la actividad enzimática de L-LDH en el flujo glucolítico de <i>E. coli</i>	28
3.3 Factible uso de la xilosa como fuente de carbono en cultivos con cepas homolácticas.....	29
3.3.1 Metabolismo de la xilosa.....	30
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo general.....	33
5.2 Objetivos particulares.....	33
6. METODOLOGÍA.....	34
6.1 Técnicas de ADN recombinante.....	35
6.2 Cepas.....	36
6.3 Condiciones y medio de cultivo.....	36
6.4 Cuantificación de L-lactato mediante YSI.....	40
6.5 Determinación de azúcares y ácidos orgánicos.....	41
6.5 Actividad enzimática.....	42
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
7.1 Construcción de las cepas LL1 y LR1.....	44
7.1.1 Construcción del plásmido p _{lct} EC.....	44
7.1.2 Integración del gen <i>lctE</i> de <i>B.subtilis</i> en el cromosoma	

	de las cepas JU15 y MT01	49
7.2	Evaluación de clonas en medio mineral AM2-glucosa 40 g/L.....	54
	7.2.1 Transferencias de las cepas LL2 y LL3 en glucosa 40 g/L.....	56
7.3	Evolución de la cepa LL2 en xilosa 40 g/L.....	59
7.4	Comparación de la cepa evolucionada LL26 con sus progenitoras.....	62
	7.4.1 Comparación de parámetros cinéticos obtenidos en medio AM2-glucosa 40 g/L.....	63
	7.4.1.1 Cuantificación de los productos de fermentación en cultivos con glucosa (40 g/L) mediante HPLC.....	66
	7.4.1.2 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con glucosa 40 g/L.....	69
	7.4.2 Comparación de parámetros cinéticos en medio AM2-xilosa 40 g/L.....	70
	7.4.2.1 Evaluación de la fuente de carbono xilosa en concentración de 40 g/L.....	73
	7.4.2.2 Cuantificación de los productos de fermentación en cultivos con xilosa (40 g/L) mediante HPLC.....	74
	7.4.2.3 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con xilosa 40 g/L.....	76
	7.4.3 Comparación de parámetros cinéticos en medio AM2-glucosa 80 g/L.....	77
	7.4.3.1 Cuantificación de los productos de fermentación en cultivos con glucosa (80 g/L) mediante HPLC..	81
	7.4.3.2 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con glucosa 80 g/L.....	83
	7.4.4 Comparación de parámetros cinéticos en medio AM2-xilosa 80 g/L	83
	7.4.4.1 Cuantificación de los productos de fermentación en cultivos con xilosa (80 g/L) mediante HPLC.....	86
	7.4.4.2 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con xilosa 40 g/L.....	88
7.5	Comparación de resultados con otras cepas productoras de lactato ...	88
7.6	Relevancia de la producción de acetato en las cepas productoras de D y L-lactato	89
7.7	Impacto de la actividad enzimática en la velocidad de formación de lactato y de consumo de azúcares	92
7.8	Comentarios finales.....	94
8.	CONCLUSIONES.....	96

9.	PERSPECTIVAS.....	97
10.	REFERENCIAS.....	98
11.	APÉNDICES.....	105
	11.1 APÉNDICE A.....	105
	11.2 APÉNDICE B.....	109
	11.3 APÉNDICE C.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Isómeros del ácido láctico.....	6
Figura 2.	Fermentación de glucosa de <i>E.coli</i> en condiciones anaerobias.....	17
Figura 3.	Metabolismo de glucosa y xilosa de <i>E.coli</i> en condiciones de fermentación, ATP y NADH en la formación de lactato.....	21
Figura 4.	Balance energético cepas <i>E.coli</i> silvestre y JU15.....	22
Figura 5.	Estrategia experimental.....	34
Figura 6.	Sistema de mini-fermentadores.....	39
Figura 7.	Plásmido pKD3 (Datsenko y Wanner 2000.....	45
Figura 8.	Plásmido <i>lctE</i> (Vázquez-Limón 2009).....	46
Figura 9.	Plásmido plctEC.....	47
Figura 10.	Patrón de restricción de la enzima <i>HindIII</i> en el plásmido plctEC.....	48
Figura 11.	Patrón de restricción con la enzima <i>NcoI</i> en el plásmido plctEC.....	49
Figura 12.	Localización cromosomal del gen <i>ldhA</i> en <i>E.coli</i> MG1655.....	50
Figura 13.	Oligonucleótidos para obtener el fragmento de ADN requerido para integrar el gen <i>lctE</i> en <i>E.coli</i>	50
Figura 14.	Representación del producto de PCR de 2663 pb (<i>lctE</i> y <i>cat</i>).....	51
Figura 15.	Amplificación de <i>lctE</i> , y el gen <i>cat</i>	51
Figura 16.	Producto de PCR de integración del gen heterólogo.....	52
Figura 17.	Ubicación de <i>lctE</i> bajo regulación de <i>ldhA</i> en JU15.....	53
Figura 18.	Evaluación de clonas de LL2 y cepa JU15 en glucosa 40 g/L.....	54
Figura 19.	Consumo de KOH 2N de clonas de LL2 y JU15 en glucosa 40 g/L.....	55
Figura 20.	Crecimiento de LL2 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.....	56
Figura 21.	Crecimiento de LL3 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.....	57
Figura 22.	Consumo de KOH 2N de LL2 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.....	57
Figura 23.	Consumo de KOH 2N de LL3 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.....	58
Figura 24.	Crecimiento de LL2 (1-7) (evolución adaptativa) en xilosa 40 g/L.....	60
Figura 25.	Consumo de KOH 2N de LL2 (1-7) (evolución adaptativa) en xilosa 40g/L.....	61
Figura 26.	Crecimiento, lactato y glucosa residual en fermentación de glucosa (40 g/L) cepas MG1655 JU15 y LL26.....	65



Figura 27. Productos de fermentación de glucosa (40 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26	68
Figura 28. Crecimiento, lactato y xilosa residual en fermentación de xilosa (40 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26	72
Figura 29. Productos de fermentación de xilosa (40 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26	75
Figura 30. Crecimiento, lactato y glucosa residual en fermentación de glucosa (80 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26	80
Figura 31. Productos de fermentación de glucosa (80 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26.....	82
Figura 32. Crecimiento, lactato y xilosa residual en fermentación de xilosa 80 g/L cepas MG1655, JU15 y LL26.....	85
Figura 33. Productos de la fermentación de xilosa (80 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26.....	87
Figura 34. Red metabólica propuesta para la cepa LL26	92
Figura 35. Comparación de MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en glucosa 40 g/L.....	105
Figura 36. Comparación de MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en xilosa 40 g/L.....	106
Figura 37. Comparación de MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en glucosa 80 g/L.....	107
Figura 38. Comparación de MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en xilosa 80 g/L.....	108



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades del ácido láctico.....	5
Tabla 2.	Parámetros cinéticos de crecimiento en xilosa cepas CL3 y JU15.....	23
Tabla 3.	Parámetros cinéticos para enzima LDH de <i>B.subtilis</i> y <i>E.coli</i>	26
Tabla 4.	Cepas de <i>E.coli</i> construidas y evaluadas en este trabajo.....	36
Tabla 5.	Composición del medio mínimo. AM2.....	37
Tabla 6.	Composición de los elementos traza en el medio AM2.....	38
Tabla 7.	Parámetros cinéticos de crecimiento y actividad de LDH cepas MG1655, JU15 y LL26 en fermentación de glucosa y xilosa 40 y 80 g/L.....	64
Tabla 8.	Cepas de <i>E.coli</i> recombinantes productoras de lactato.....	109

NOMENCLATURA

Generales

Símbolo	Nombre
Cm	Cloramfenicol
DCW	Peso celular seco (por sus siglas en inglés)
DO_λ	Densidad óptica a una longitud de onda específica (λ)
E	Evolucionada
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)
IPTG	(Isopropil β-D tiogalactopiranosido) Inductor gratuito de la expresión del operón de lactosa
IVM	Ingeniería de Vías Metabólicas
K_a	Constante de disociación
kcat	Constante catalítica
Km	Constante de Michaelis Menten
kn	Kanamicina
KOH	Hidróxido de potasio
L	Litros
LAB	Bacterias Acido Lácticas (por sus siglas en inglés)
LAC	Lactato
p	Plásmido
pb	Pares de bases
PCL	poli (ε-caprolactona)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PEMEX	Petróleos Mexicanos
PET	Tereftalato de polietileno (por sus siglas en inglés)
PHB	poli (β-hidroxi butirato)
pKa	-log K _a
PLA	Ácido poliláctico (por sus siglas en inglés)
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
prot	Proteína
PTS	Sistema de la fosotransferasa (por sus siglas en inglés)
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto
T	Temperatura
TRC	Promotor híbrido -35 de trp (TTGACA) y región -10 O (TATAAT)
::	Inserción o fusión de una construcción genética en un locus determinado
Δ	Eliminación de un fragmento del cromosoma bacteriano o de un gen determinado
ΔH_c	Calor de combustión



Enzimas y genes

Enzima	Gen	Nombre
ACK	<i>Ack</i>	Acetato cinasa
ADH	<i>adhE</i>	Alcohol deshidrogenasa
ARC	<i>arcAB</i>	Control de la respiración aerobia
CAT	<i>Cat</i>	Cloramfenicol transferasa
FNR	<i>Fnr</i>	Reducción de fumarato y nitrito
FRD	<i>frdABCD</i>	Fumarato reductasa
LDH	<i>ldhA</i> y <i>lctE</i>	Lactato deshidrogenasa homóloga y heteróloga
PDC	<i>Pdc</i>	Piruvato decarboxilasa
PDH	<i>aceEF, lpd</i>	Piruvato deshidrogenasa (componentes del complejo enzimático)
PFL	<i>PflB</i>	Piruvato formato liasa
PPC	<i>Ppc</i>	Fosfoenol piruvato carboxilasa
PTA	<i>Pta</i>	Fosfotransacetilasa
RPE	<i>Rpe</i>	Ribulosa fosfato epimerasa
XYLB	<i>xyIB</i>	Xilulocinasa
XYLE	<i>xyIE</i>	Transportador de xilosa independiente de ATP
XYLFGH	<i>xyIFGH</i>	Transportador de xilosa dependiente de ATP
XYLFGHR	<i>xyIFGHR</i>	Regulador del transportador de xilosa dependiente de ATP

Metabolitos

Símbolo	Nombre
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
F-6P	Fructosa 6-fosfato
F-1,6BP	Fructosa 1,6-difosfato
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
G-6P	Glucosa 6-fosfato
H ⁺	Protón
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida reducido
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida fosfato oxidado
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida fosfato reducido
PEP	Fosfoenolpiruvato
R-5P	Ribulosa 5-fosfato
X-5P	Xilulosa 5-fosfato



Parámetros de cultivo		
Símbolo	Nombre	Unidades
μ	Velocidad específica de crecimiento	h^{-1}
X	Biomasa en gramos de peso seco por litro	g_{DCW}/L
Q_p	Productividad volumétrica de formación de producto	g_{LAC}/Lh
X_{MAX}	Biomasa máxima alcanzada durante la fase exponencial de crecimiento	g_{DCW}/L
Y	Rendimiento	$g_{LAC}/g_{AZÚCAR}$



1. RESUMEN

Una de las principales aplicaciones del lactato y la de mayor impacto ambiental es su polimerización a polilactato (PLA) para la manufactura de plásticos biodegradables, cuyas propiedades físicas y de biodegradación están conferidas por una elevada proporción del isómero L. Sin embargo, la producción biotecnológica actual de lactatos es a partir de lactobacilos, los cuales requieren medios de cultivo complejos, que resultan caros para la obtención a grandes volúmenes de PLA. En contraste, *Escherichia coli* fermenta azúcares, en medios minerales simples, a una mezcla de productos de fermentación, incluyendo el D-lactato a partir de piruvato y la enzima estéreo-específica LDHA.

El objetivo del presente trabajo fue integrar en *E. coli* no fermentativa (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyfFGH$, $\Delta ldhA$) el gen *lctE* que codifica para lactato deshidrogenasa estéreo-específica para L-lactato, proveniente de *Bacillus subtilis*, bajo el control del promotor nativo del gen *ldhA* y evaluar la producción de L-lactato en medio mineral. Se partió de una cepa donde se habían inactivado los genes que compiten por la disponibilidad del piruvato, por lo tanto la única vía para regenerar NAD^+ y mantener el equilibrio redox es a través de la enzima heteróloga. Los resultados obtenidos con el analizador bioquímico y por HPLC indican que la cepa L-lactogénica, denominada LL26 es capaz de producir en condiciones de fermentación L-Lactato ópticamente puro a partir de glucosa y xilosa demostrando que la integración de *ldh* de *B.subtilis* es funcional.

Bajo condiciones de fermentación en medio mineral, empleando glucosa o xilosa, en concentraciones de 40 g/L, la cepa LL26 produce L-lactato con un rendimiento del 95%, con tan solo 1.5 g/L de células en 48 h, sólo una mínima fracción es transformada a acetato y succinato, al término de la fermentación la suma de estos ácidos orgánicos es de 2g/L. La cepa silvestre (*E. coli* MG1655) cultivada en las mismas condiciones, usando glucosa como fuente de carbono presenta una

velocidad específica de crecimiento de 0.42 h^{-1} , mientras que la cepa LL26 crece a 0.29 h^{-1} . Esto se debe probablemente a que la interrupción en el gen que codifica para la piruvato formato liasa (*pfIB*) disminuye la generación de acetil-CoA y ATP en la vía de síntesis de acetato. En xilosa los valores de velocidad de crecimiento entre la cepa progenitora y LL26 son similares, siendo de 0.23 h^{-1} y 0.16 h^{-1} respectivamente.

Por otro lado, al duplicar la concentración de ambas fuentes de carbono, hay una disminución del rendimiento, atribuido a la presión osmótica. En el caso de la fermentación de glucosa, el rendimiento disminuye hasta un 79% y se duplicó también la biomasa generada, alcanzándose 3g/L de células. En 72 h se consumió casi el total de la glucosa y al término de la fermentación se detectaron 3 y 5.5 g/L de glucosa residual en la cepa progenitora y LL26 respectivamente. Se mantuvo la misma tendencia de velocidades específicas de crecimiento, se encontraron valores muy similares entre la cepa MG1655 y la LL26 siendo de 0.24 y 0.18 h^{-1} respectivamente. En contraste, en el caso de la fermentación de xilosa 80 g/L, el rendimiento disminuye aún más hasta llegar a 65% y la cantidad de biomasa generada es también de 3.0 g/L en 72 h. De manera notoria la cantidad de xilosa residual es de 43 g/L en el caso de la cepa progenitora mientras que en la cepa LL26 es sólo de 17g/L al término de la fermentación. Existen también diferencias entre las velocidades específicas de crecimiento siendo de 0.18 y 0.12 h^{-1} para la cepa progenitora y la L-lactogénica respectivamente.

Adicionalmente, se cuantificó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en la cepa LL26 y la cepa progenitora (MG1655). En las fermentaciones en glucosa y xilosa en concentraciones de 40 g/L, se detectó un incremento de 3 veces la actividad de la cepa LL26 con respecto a la cepa progenitora en ambas fuentes de carbono. En el caso de las fermentaciones en 80g/L, para el caso de la glucosa el incremento fue de 7 veces mientras que en xilosa fue aún mayor, de 12 veces. En todos los casos, los resultados muestran un mayor valor de actividad en la cepa LL26, la cual cuenta con la enzima heteróloga, sin embargo este aumento en la actividad no se refleja en un incremento del flujo glucolítico, ya que no se eleva el

consumo de glucosa por parte de la cepa; de la misma manera ocurre en lo referente al consumo de xilosa.

La cepa homoláctica de *E.coli* LL26 representa una opción para el desarrollo de una tecnología para la producción industrial de L-lactato.

2. INTRODUCCIÓN

Panorama actual

Ante el inminente agotamiento de las reservas de petróleo, (Ingram *et. al.*, 1999; Martínez *et. al.*, 2002; PEMEX 2006) se estima que las reservas nacionales probadas durarán únicamente 9 años a partir del 2007 (PEMEX 2007), es imprescindible generar alternativas que sustituyan a este energético así como sus derivados. El sector de los plásticos es de notable relevancia pues tan sólo en ésta aplicación se destina el 4% del total del crudo a nivel mundial, se requieren 18.7 toneladas de petróleo para fabricar 3.74 toneladas de plástico (PNUMA 1996)

Actualmente, los plásticos obtenidos a partir del petróleo presentan dos problemas: la dependencia de un recurso natural no renovable y su permanencia en el medio ambiente. En este contexto, resulta de interés la generación de plásticos biodegradables a partir productos de fermentación, la investigación se ha enfocado en obtener los monómeros que los constituyen a través de cepas modificadas.

Obtención y usos del ácido láctico

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) es uno de los ácidos hidroxicarboxílicos más empleados comercialmente debido a sus propiedades, las cuales le dan una gran versatilidad de aplicaciones en las industrias: alimenticia, cosmética, farmacéutica, textil y química. Las propiedades del ácido láctico se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Propiedades del ácido láctico. (Narayanan et al; 2004).

Peso molecular	90.08 g/mol
Punto de ebullición	82-85 °C a 0.5-1 mmHg 122 °C a 14-15 mmHg
Punto de fusión	16.8 °C
Constante de disociación, K_a a 25 °C	1.37×10^{-4}
Calor de combustión, ΔH_c	1361 KJ/mol
Calor específico, C_p a 20 °C	190 J/mol/°C
Solubilidad	Agua Solventes orgánicos miscibles en agua
Volatilidad	Baja
pKa	3.5

El ácido láctico tiene un carbono asimétrico lo cual da lugar a la actividad óptica. Existen 2 isómeros ópticos el dextrógiro, ácido D-(-)-láctico y el levógiro ácido L-(+)-láctico (Figura 1). La obtención del ácido láctico es por vía química o biotecnológica. La producción química, está basada en la reacción del acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado para dar ácido láctico. Otro proceso se basa en la reacción del acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. La síntesis química tiene la desventaja de que el ácido láctico producido es ópticamente inactivo, es decir existe una composición equimolar de los isómeros (Datta et al., 1993, Lippinsky et al., 1986 y Litchfield., 1996). En varias aplicaciones se requiere de alguno de los isómeros ópticamente puros. El lactato que se utiliza en la alimentación humana es el isómero L, siendo este uno de los principales mercados, razón por la cual alrededor del 90% del ácido láctico producido a nivel mundial es por vía biotecnológica (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000).

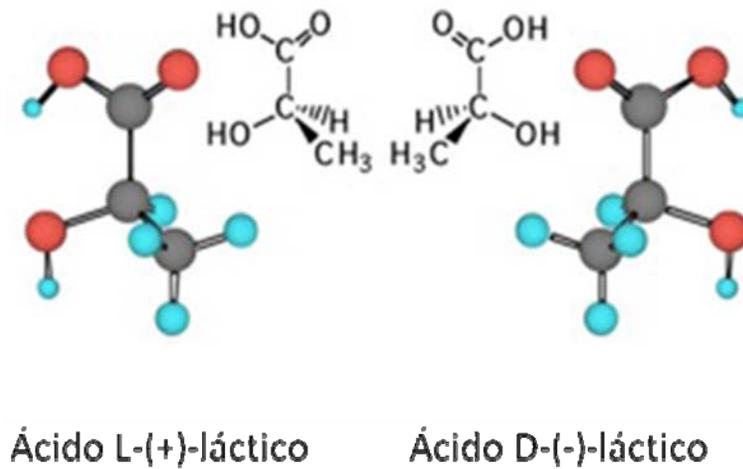


Figura 1. Isómeros del ácido láctico

La producción biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos principalmente glucosa y lactosa, mayoritariamente por bacterias lácticas, teniendo la ventaja de formar enantiómeros D(-) ó L(+), ópticamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo empleado, el pH, la temperatura, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, modo de fermentación empleado y formación de subproductos.

Plásticos biodegradables a partir de lactatos

El lactato puede ser polimerizado para formar plásticos biodegradables, conocidos con el nombre genérico de polilactatos (PLA): el polilactato y el etil-lactato (Skory, 2003). Dentro de sus aplicaciones destacan: fabricación de matrices para liberación de drogas, suturas quirúrgicas, fibras textiles, envases para alimentos y agua, etc. (Rojan, et al., 2006). Recientemente se ha incrementado la investigación para la obtención de D(-) ó L(+) lactatos por vía biotecnológica, debido a su amplio potencial para ser polimerizados en polilactato biodegradable, cuya principal aplicación, y la de mayor impacto ambiental, es la fabricación de envases plásticos, pues evita los problemas de contaminación que generan los plásticos obtenidos a partir del petróleo.

A la fecha, los isómeros ópticamente puros para la fabricación de PLA son obtenidos por fermentación microbiana de glucosa proveniente del almidón del maíz (Datta et al 2006), sin embargo el empleo de otros carbohidratos permitirá reducir costos de producción.

El PLA se forma a partir de dímeros de L-lactato y D-lactato, que generan cadenas de poliéster alifático. La polimerización se lleva a cabo mediante la deshidratación y formación del enlaces éster del carbono carboxílico. La producción de ácido láctico fue de aproximadamente 220,000 toneladas en el 2005. Se prevé que su demanda se duplique para el 2010, principalmente para usarse en la manufactura de PLA (Boswell 2001). Los productores mayoritarios a nivel mundial de ácido láctico por la vía fermentativa son: NatureWorks LLC y Cargill en los EUA, Purac en Holanda, Galactic en Bélgica, y algunas compañías de China.

Recientemente la compañía NatureWorks LLC se ha colocado como líder en el desarrollo de polímeros a partir de lactato, diversificando su producto al dirigirlo en dos líneas principales: las resinas constituidas por polidilactato (NatureWorks PLA®) empleado en los plásticos destinados a los empaques y aplicaciones de estos; y el Ingeo™ polidilactato en presentación de fibras cuyos principales usos son en la industria textil y aplicaciones especializadas de fibras. La mayor planta de polilactato a nivel mundial pertenece a NatureWorks y se encuentra ubicada en Blair, Estados Unidos, posee una capacidad de producción de 136,200 toneladas anuales y proyecta alcanzar las 500,000 toneladas en el 2010.

En la manufactura de envases y materiales de empaque el PLA muestra superioridad con respecto a otros polímeros en los siguientes aspectos: claridad, adecuado calor de deflexión, compostable (rápida degradación en el medio ambiente) y sostenible (proveniente de fuentes renovables).

Las ventajas del Ingeo™ se enlistan a continuación: baja gravedad específica, mayor tenacidad y baja absorción de agua respecto a otras fibras naturales; secado rápido, destacada resistencia a radiaciones ultravioleta, bajo índice de refracción lo que facilita teñirlo para obtener colores intensos; en comparación con el PET y otros polímeros sintéticos presenta un bajo calor de combustión, emite menos humo al quemarse.

En desventaja a otros polímeros presenta una baja resistencia al álcali lo cual ocasiona pérdida de fuerza en el teñido, baja temperatura de planchado debido al bajo punto de fusión.

En la producción de los polímeros de lactato y sus derivados es fundamental la generación del enlace diéster y en la manufactura de dilactato de pureza óptica se ha desarrollado un proceso en continuo, el cual consta de la configuración de múltiples etapas de evaporación, acopladas a varias etapas de polimerización de los oligómeros de bajo peso molecular. El prepolímero se produce catalíticamente, posteriormente se recupera en un sistema de destilación con condensación parcial, para ingresar a otra de las subsecuentes etapas (Datta 2006).

El dilactato es empleado en la manufactura de polímeros de bajo peso molecular o copolímeros, el proceso desarrollado a partir de productos de fermentación tiene la ventaja de reciclar y reusar el ácido láctico así como los prepolímeros, lo cual permite obtener un proceso más eficiente y económico.

En el proceso de obtención de lactato, la glucosa es convertida en ácido láctico a través de la fermentación, el agua es removida a temperatura ambiente para generar un prepolímero de bajo peso molecular, posteriormente este prepolímero es catalíticamente depolimerizado hasta formar un intermediario cíclico de dilactato, el cual es polimerizado en un poliéster de alto peso molecular, posteriormente purificado efectuando una destilación. En el proceso del biopolímero Ingeo™, el dilactato se polimeriza empleando un solvente que permite abrir los anillos dejando un grupo hidroxilo (OH) activo para polimerizar las cadenas y obtener agregados de

polidilactato. El mejor método para este propósito es iniciar la apertura del anillo dimérico mediante el uso de catalizadores alcóxidos y/o carboxilatos de metales covalentes Zn, Sn(II), Al, Y y Sn(IV) (Kohonen et al; 2001) también es usual la policondensación directa del polilactato (Ajioka et al; 1995). En la preparación de los polilactatos es deseable una rápida polimerización en el caso de su obtención por extrusión reactiva en ello es común emplear poliglicerina como activador de los anillos. De manera general los polidilactatos lineales y los ramificados son obtenidos empleando como co-iniciadores alcoholes primarios, secundarios y terciarios, esto no afecta las propiedades del polímero a excepción de un ligero decremento en la temperatura de fusión. (Korhonen et al; 2001).

Debido a la fuerza del polímero pueden ser obtenidas fibras, películas y varillas que son biodegradables, al descomponerse generan ácido láctico y CO₂

Las copolimerizaciones de lactato con ácido hidroxiacético son empleadas en empaques de alimentos, jardinería y horticultura principalmente.

Otra importante aplicación del lactato es como solvente, el etil lactato conocido en el mercado comercial como VertecBioEL™, se utiliza como recubrimiento, tintas y agentes de limpieza, debido a su alto desempeño y versatilidad se ha calificado como el solvente verde con más beneficios ya que es fácilmente biodegradable y reporta excelentes resultados en los ensayos toxicológicos, cuenta con el potencial para desplazar varios solventes provenientes del petróleo tales como: acetona, DMF (N,N-Dimetilformamida), tolueno o N-metilpirrolidona en procesos industriales

El precio comercial del ácido láctico oscila de \$1.4 dólares americanos/kg (50% de pureza) a \$1.6 dólares americanos/kg (88% de pureza), mientras que el precio del PLA es de \$2.2 dólares americanos/kg. El costo de producción del ácido láctico es de \$0.55 dólares americanos/kg (Datta 1993).

La producción de PLA no depende directamente del petróleo como materia prima, pero sí de manera indirecta en su manufactura por la energía utilizada en el

proceso. Para hacerlo realmente sustentable se requiere minimizar el uso de combustibles fósiles en el proceso. La compañía Novamont afirma que para producir un kg de PLA requiere un 80% de la energía necesaria para producir de manera tradicional el polietileno, mientras que NatureWorks sostiene que en su sistema de producción de PLA se ahorra de un 25 a un 68% de la energía; en parte esto lo logra debido al uso de energías renovables que la empresa ha certificado. Así mismo, NatureWorks afirma que el PLA que produce, aparte de uso como material de empaque o embalaje, se puede destinar a cualquiera de los siguientes propósitos: reciclarse química o físicamente, emplearse como abono orgánico e incinerarse para obtener energía.

El organismo regulador de Alimentos y Medicamentos en Estados Unidos conocido por sus siglas en inglés como FDA (Food and Drug Administration) y las autoridades Europeas han aprobado las resinas de polilactato para ser empleadas en aplicaciones alimenticias; de manera tal que aunado al empaque de plástico biodegradable, constituido de PLA, en el cual se expenden frutas y verduras, estas podrán contener cubiertas de polilactato para evitar la senescencia prematura de estos alimentos.

En el presente, el mercado del polilactato experimenta una expansión debido a las propiedades mecánicas que presenta su aplicación como plástico, tales como termoplasticidad, resistencia al impacto y fuerza, alta resistencia a la tensión y mínima elongación, así como elasticidad modulada. La rigidez que presenta le permite ser una opción viable en el reemplazo del poliestireno y/o el PET (Tereftalato de polietileno) en algunas aplicaciones. También se ha extendido su uso a la fabricación de prótesis; y en lo referente a su aplicación en forma de fibras, estas se emplean en suturas quirúrgicas y hasta para generar telas y rellenos biodegradables.

Biodegradación del PLA

El PLA es un polímero que se degrada rápidamente sin dejar residuos tóxicos bajo condiciones de composta en gran escala empleando temperatura de 60°C. En ocasiones el PLA se mezcla con almidón para incrementar su biodegradabilidad y reducir su costo, sin embargo la cristalinidad del polímero se ve reducida, con lo que se restringen algunas de sus aplicaciones; como alternativa, se han efectuado mezclas que incluyen glicerol y sorbitol mostrando mejoras.

Los enlaces éster pueden ser escindidos por hidrólisis química o enzimática, el proceso de degradación ocurre en dos pasos: el inicial consiste en la generación de fragmentos de bajo peso molecular resultantes de la hidrólisis y el posterior consiste en el transporte y metabolismo de dichos compuestos al interior de la célula para su mineralización a CO₂, H₂O y biomasa. Se han identificado como degradadores de oligómeros de PLA (peso molecular ~1000) a los organismos: *Fusarium moniliforme*, (Torres et al., 1996), *Penicillium roquefort*, (Pranamuda et al., 1997), *Amycolatopsis sp.*, (Pranamuda y Tokiwa, 1999), *Bacillus brevis* (Tomita et al., 1999), *Rhizopus delemere* (Fukuzaki et al., 1989), *Tritirachium album*. Estudios recientes demuestran que la enzima aislada de *Amycolatopsis sp.* degrada PLA, discriminando de entre PCL poli (ε-caprolactona) y PHB poli (β-hidroxibutirato). La hidrólisis enzimática ocurre a mayor velocidad en la región amorfa en comparación con la región cristalina (Pranamuda et al; 2001). La primera etapa de la degradación consiste en la hidrólisis de los compuestos solubles en agua y el ácido láctico, la rápida conversión de estos productos en agua, CO₂ y biomasa de una amplia variedad de microorganismos.

Producción biológica y requerimientos de lactatos ópticamente puros

Las principales ventajas de la síntesis fermentativa, sobre la química, consiste en la obtención de isómeros ópticamente puros, lo cual facilita la purificación y su producción a partir de material biológico renovable. Las propiedades físicas y de biodegradación del PLA dependen de la relación empleada de las formas D y L

durante la polimerización, siendo el enantiómero L el que se requiere en una mayor proporción (Zhou et al., 2003).

El PLA es un polímero que se caracteriza por tener una amplia variedad de propiedades, que son el resultado de la existencia de una copolimerización o bien una estéreo-complementación (Saulnier et al., 2004). Se ha estudiado el efecto de la estéreo-complementación de las cadenas de L-PLA y D-PLA en su: formación, estructura, resistencia térmica, propiedades de degradación y aplicaciones; así como en la obtención de cristales y fibras empleadas en la manufactura de plásticos biodegradables. Las interacciones de van der Waals se fortalecen debido a la estéreo-complementación y se favorecen las propiedades mecánicas, la resistencia térmica y la hidrólisis (Hideto et al., 2005). Como ya se mencionó, para la polimerización se requieren de los monómeros L-lactato y D-lactato ópticamente puros, ya que el peso molecular de las cadenas de L-PLA y D-PLA, así como su proporción en la polimerización, son los parámetros cruciales involucrados en la estéreo-complementación, a su vez se ven relacionados en la miscibilidad y cristalización del polímero. (Fukushima et al., 2007).

Potencial uso de residuos agroindustriales en la obtención de L-lactato

Las investigaciones a nivel internacional se enfocan en la disminución de costos de producción, mediante el empleo de nuevos sustratos, nuevas tecnologías de fermentación y separación; así como nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades. El uso de residuos agroindustriales y material lignocelulósico, se ha planteado como alternativa para producir lactatos, con el fin de competir con las tecnologías actuales de obtención de plásticos convencionales (Datta et al., 2006). En áreas agrícolas, se originan cantidades exorbitantes de residuos agroindustriales, anualmente a nivel mundial se generan 3,500 millones de toneladas (Lal et al., 2008). La mayoría son obtenidos al procesar una materia prima o bien un cultivo dedicado a la alimentación humana, como resultado, está garantizada su inocuidad ya que se

encuentra libre de patógenos y ausente de contaminantes. (Russ W. et al; 2004). El uso de esta potencial fuente de carbono depende de su precio, disponibilidad y pureza. El principal componente del agroresiduo es la materia orgánica biodegradable, que en ocasiones genera serios problemas ambientales. Sin embargo actualmente existen diversas alternativas mediante las cuales pueden explotarse sus cualidades. La conversión de este residuo en la fuente de obtención de bioproductos como el ácido L-láctico a partir de su fermentación, resulta atractiva debido a que se encuentran en cantidades abundantes y renovables que hacen factible y rentable su uso. Adicionalmente ofrecen la ventaja de ser de bajo costo y evitar la competencia de alimentos destinados a la nutrición de las especies.

Aún cuando la utilización de estos residuos resulta atractiva por su alto contenido de carbohidratos, su utilización es limitada pues el aprovechamiento de estos azúcares es escaso al encontrarse principalmente en la fracción hemicelulósica que las bacterias lácticas no convierten eficientemente en lactatos.

Después de la glucosa, la xilosa es el segundo monosacárido más abundante en la naturaleza y se encuentra polimerizado en la fracción hemicelulósica de las plantas, cuya composición es principalmente de pentosas (xilosa y arabinosa: 85%) y pequeñas fracciones de hexosas (glucosa y manosa 15%) (Ingram et al., 1999). Sin embargo, la variedad de microorganismos que metabolizan tanto pentosas como hexosas es restringida. No existen microorganismos silvestres que puedan catabolizar eficientemente xilosa o bien mezclas de glucosa-xilosa en productos de fermentación. En este contexto, resulta relevante mejorar la utilización de la xilosa y revertir la baja capacidad de fermentación de la pentosa para la producción de ácido láctico.

Organismos productores de ácido láctico

Las bacterias que pueden emplearse para la producción de ácido láctico son: cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulan, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros: *Lactobacillus* (*Lb*), *Carnobacterium*, *Leuconostoc* (*Leu*), *Pediococcus* (*Pd*), *Streptococcus* (*Str*), *Tetragenococcus*, *Lactococcus* (*Lc*), *Vagococcus*, *Enterococcus* (*Ent*), *Aerococcus* y *Weissella* (Sneath 1984; Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000). La mayoría de las especies pertenecientes a estos géneros tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5, lo cual es una ventaja competitiva sobre otras bacterias. Las bacterias ácido lácticas (LAB) del género *Lactobacillus* son excelentes productoras de D y L-lactato, sin embargo, su uso para la obtención de lactatos para producir PLA no es ventajoso, debido a los requerimientos nutrimentales complejos de estas bacterias, resultado de su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B. (Niel y Hahn-Hägerdal, 2000), además de generar mezclas racémicas. Aunado a esto, la gran mayoría de los lactobacilos no son capaces de fermentar eficientemente xilosa.

Los hongos estudiados en la producción de ácido láctico son mohos y levaduras pertenecientes a los géneros: *Mucor*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Saccharomyces* y *Kluiveromyces*. (Bianchi et al., 2001). De entre ellos, el más estudiado es *Rhizopus oryzae* puesto que no requiere fuente de nitrógeno orgánico para su crecimiento, produce grandes cantidades de L (+) ácido láctico a partir de almidón y es fácilmente separado del medio de fermentación. La producción de ácido láctico con mohos presenta la dificultad de la forma física de gran tamaño de los micelios causando resistencia a la transferencia de masa en el proceso fermentativo, en consecuencia, se prolongan los tiempos de fermentación, aumentan los subproductos generados y disminuyen los rendimientos de conversión (Bulut et al., 2004, Dong-Mei et al., 2003).

El ácido láctico además puede ser producido por bacterias que no se incluyen en el grupo de lactobacilos como *Bifidobacterium*, algunas especie de *Bacillus*,

Clostridium, *Microbacterium* y bacterias entéricas como: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus faecalis*. *E. coli* es una bacteria que puede fermentar xilosa, arabinosa, manosa y glucosa, entre muchos azúcares, siendo mínimos sus requerimientos nutrimentales, es decir, requiere únicamente sales y la fuente de carbono (Ingram et al., 1987, Chang et al., 1999). En condiciones de fermentación *E. coli* produce una mezcla de acetato, etanol, formato, succinato y D-lactato. Mediante Ingeniería de Vías de Metabólicas (IVM) es factible obtener cepas derivadas de *E. coli* homofermentativas (Dien 2002, Zhou 2003). En el grupo de investigación donde se desarrolló este trabajo se han construido cepas de *E. coli* (Utrilla et al., 2009) y de *Bacillus subtilis* (Romero et al., 2007, 2009b) capaces de producir D y L-lactato, respectivamente, con altos rendimientos. En el presente trabajo se abordó la posibilidad de producir L-lactato a partir de xilosa mediante una cepa de *E.coli*, para ello se integró en cromosoma el gen *ldh* de *B. subtilis* que codifica para una L-lactato deshidrogenasa y se evaluó la producción de L-lactato en medio mineral.

3. ANTECEDENTES

3.1 Ingeniería de vías metabólicas en la producción de lactato

Recientemente se ha incrementado el interés por realizar investigaciones relacionadas a la producción de lactatos ópticamente puros por Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM). El objetivo de la IVM es modificar la red metabólica de un organismo a través de técnicas de ADN recombinante, para alterar el flujo metabólico y dirigirlo mayoritariamente hacia un producto en específico. Involucra sistemas de transporte, mecanismos de regulación y actividades enzimáticas, las mejoras por IVM están enfocadas en el rendimiento y la productividad de un metabolito de interés. (Stephanopoulos, 1999; Bailey, 1991; Romero *et. al.*, 2007). De esta manera, se han construido cepas derivadas de *E. coli* para la producción homofermentativa de D y L-lactatos. La principal estrategia para obtener cepas homolácticas, en el caso de *E. coli* productoras de D-lactato, empleando el gen nativo que codifica para la D-lactato deshidrogenasa (LDHA), ha consistido en interrumpir la conversión de piruvato en ácidos orgánicos (acetato, succinato, formato) y etanol (Figura 2) que las cepas silvestres de *E.coli* realizan durante la fermentación de glucosa, con la finalidad de lograr el balance redox. En el caso de las cepas productoras de L-lactato, adicionalmente se interrumpe la formación de D-lactato. En las estrategias de IVM se modifica el balance de carbono hacia el producto deseado manteniendo el equilibrio redox, además se evita la formación de subproductos y con ello se mejora la acumulación de ácido láctico (Zhu *et al.*, 2007).

Como se aprecia en la figura 2, el piruvato es mayoritariamente metabolizado a acetil-CoA por la enzima piruvato formato liasa (PFL) en condiciones de anaerobiosis mientras que en condiciones aerobias la conversión es catalizada por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH). Así mismo, en condiciones de fermentación las enzimas PFL y LDHA compiten por el piruvato.

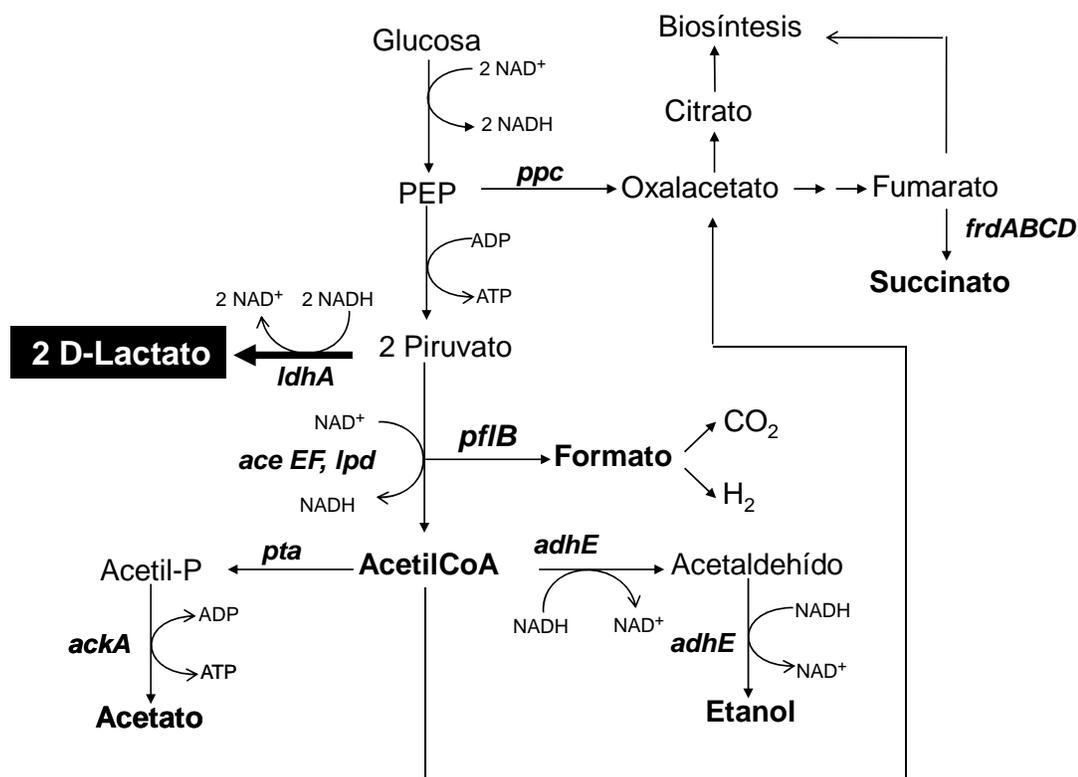


Figura 2 Fermentación de glucosa en *E. coli* en condiciones anaerobias (Zhou et al., 2003). Los genes que codifican a las enzimas se indican en cursivas: *ldhA* lactato deshidrogenasa; *ppc* fosfoenol piruvato carboxilasa; *pfIB* piruvato formato liasa; *frdABCD* fumarato reductasa; *adhE* alcohol deshidrogenasa; *ackA* acetato cinasa; *aceEF* y *lpd* piruvato deshidrogenasa.

En *E. coli* la reoxidación del poder reductor ocurre primordialmente por acción de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa durante la glucólisis. Esta enzima distribuye el flujo hacia fosfoenolpiruvato, subsecuentes reacciones permiten obtener los diversos productos de fermentación, la producción de succinato está catalizada por la enzima (*ppc*) fosfoenol piruvato carboxilasa. Con excepción del succinato, todos los ácidos orgánicos y el etanol provienen del piruvato. El piruvato juega un papel fundamental en la regulación metabólica (Yang et al., 2001). Así, el destino del piruvato está regido por un estricto control metabólico. La expresión de los genes que codifican las enzimas para los productos de fermentación es

regulada de manera global mediante FNR (Reducción de Fumarato y Nitrato) y el sistema ArcA/B (control de la respiración aerobia). Estos reguladores de uno y dos componentes respectivamente, detectan el estado de oxidación de los intermediarios en el proceso de respiración con lo que activan o reprimen los genes asociados a la fermentación o la respiración. De manera general ArcA/B se encuentra activo en condiciones de microaerobiosis mientras que FNR lo está en estrictas condiciones de anaerobiosis (Shale-Levanon et al., 2005, Aleexeva et al., 2003, 2000).

Finalmente la distribución del flujo en el nodo de piruvato incide en el metabolismo de la célula, esto se refleja al modificar los niveles de actividad de las enzimas involucradas y en mantener en balance el estado energético y el equilibrio redox. La adecuada manipulación de los genes en el metabolismo del piruvato ha permitido generar cepas cuyo espectro de productos de fermentación se ve reducido; logrando dirigir el flujo hacia un metabolito deseado. Las inactivaciones en *pfl* descritas por (Chang et al., 1999, Zhou et al., 2003, Zhou y Shimizu 2004); y la inactivación en *pta* (fosfotransacetilasa) (Chang et al., 1999) permiten un incremento en la concentración de D-lactato. Ante ello, la investigación se ha enfocado en interrumpir las vías que compiten por la disponibilidad del piruvato:

Una de las estrategias ha consistido en la interrupción del flujo que genera acetil-CoA y formato, esto es eliminando o interrumpiendo parte del gen que codifica para la piruvato formato liasa (*pfl*) (Dien et al., 2001; Dien et al., 2002) y eliminando las vías que compiten por la disponibilidad de piruvato (Zhou et al., 2003; Zhou et al., 2005; Grabar et al., 2006; Zhu et al., 2007).

Una propuesta consistió en interrumpir los genes que codifican para la fosfotransacetilasa (*pta*) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), obteniéndose un rendimiento alto de ácido láctico de 90%. Sin embargo estas cepas para su crecimiento requieren de suplementos, tales como ácidos carboxílicos o nutrientes complejos (Chang et al., 1999; Utrilla et al., 2009). Se observó que los

requerimientos de ácidos carboxílicos disminuyen si se preserva *ppc*, pero el rendimiento se ve disminuido, debido a la presencia de succinato. Otra alternativa consistió en eliminar la producción de acetato, succinato, etanol y formato, es decir, interrupciones cromosomales en los genes *ack*, *frdBC*, *adhE* y *pfIB*, respectivamente. Con estas cepas ha sido factible obtener D-lactato ópticamente puro a partir de glucosa, con rendimientos de hasta el 95% del teórico (Chang et al., 1999). Cabe mencionar que el rendimiento teórico de conversión de glucosa en lactato es de 1 g de lactato por g de glucosa.

También se ha logrado la producción homofermentativa de L-lactato, reemplazando el gen *ldhA* de *E. coli* W3110 en cromosoma por el gen *ldhL*, el cual codifica para una L-lactato deshidrogenasa proveniente de *Pediococcus acidilactici*. Con la cepa resultante (SZ85), también se obtienen rendimientos cercanos al teórico de L-lactato ópticamente puro a partir de glucosa (Zhou et al., 2003). SZ85 también fue evaluada usando xilosa en medio mineral, sin embargo las productividades son bajas, (máxima productividad específica 20.8 ± 1.4 mmol/ (g_{DCWH}h) para glucosa y 9.8 mmol/(g_{DCWH}h) para el caso de la xilosa), por ende los tiempos de fermentación son muy extensos, de 5 y 14 días para convertir 50 g/L de glucosa o xilosa en L-lactato, respectivamente (Zhou et al., 2003).

En condiciones de fermentación *E. coli* requiere regenerar la forma oxidada de NAD⁺ a partir del NADH, esto lo consigue a través de los diversos productos de fermentación de entre los cuales se encuentran el lactato y el acetato y siendo minoritarios el formato, succinato y etanol. Estos productos presentan diferentes estados de oxidación estableciendo un balance energético y un balance redox (Clark 1989). Aún cuando se forman otros metabolitos, la conversión de piruvato a lactato constituye el paso con mayor aporte a la regeneración de NADH.

Otro aspecto importante en la regulación del metabolismo es el balance de energía, bajo condiciones de fermentación el ATP es generado por la célula a través de la

glucólisis. Se ha demostrado que el flujo glucolítico se controla por los requerimientos de ATP (Koebmann et al., 2002). Las reacciones catalizadas por las enzimas piruvato cinasa y acetato cinasa intervienen en la disponibilidad del ATP en la célula. La figura 3 muestra el balance de ATP y el balance redox que realiza *E. coli* al emplear la glucólisis y la vía de las pentosas hasta la generación de lactato en condiciones de fermentación.

La interrupción en *pflB* tiene efectos drásticos en la fisiología de *E. coli* al cultivarse en condiciones de fermentación, ya que la disponibilidad de acetyl-CoA disminuye drásticamente y aunado a esto se encuentra la baja generación de biomasa (Hasona et al., 2004). También la obtención de ATP se afecta, debido a que por mol de xilosa se utilizan dos ATPs para transportarla y fosforilarla, lo cual limita la producción de ATP al interrumpir la formación de acetato, únicamente se obtiene 0.67 moles de ATP por mol de xilosa. En el caso de la glucosa este valor es de 2, ya que el sistema de transporte y fosforilación de éste azúcar, el sistema de la fosfotransferasa, utiliza sólo 1 ATP (Hasona et al; 2004)

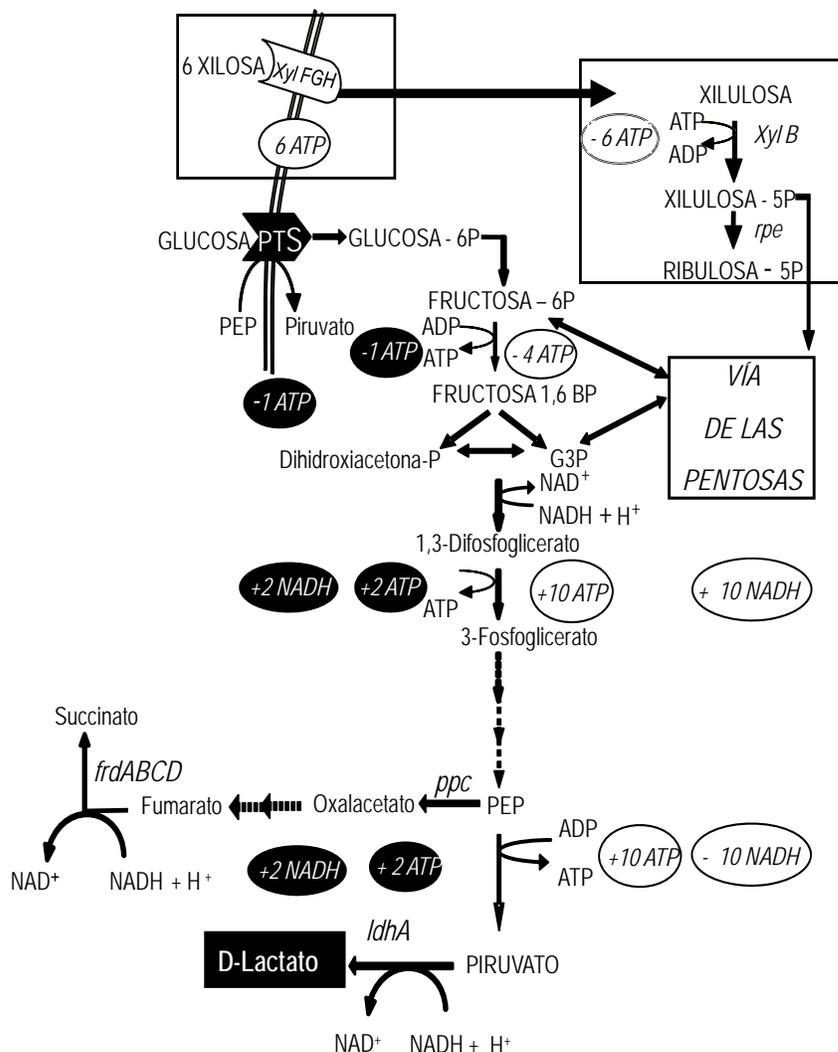


Figura 3. Metabolismo de glucosa y xilosa de *E.coli* en condiciones de fermentación, balance de ATP y NADH en la formación de lactato. Símbolos rellenos glucosa ● símbolos abiertos xilosa ○, XylFGH Transportador de xilosa dependiente de ATP, XylB Xilulocinasa, rpe ribulosa fosfato frdABCD fumaratoreductasa.

A continuación se muestra un esquema del balance energético y balance REDOX hasta la formación de piruvato empleando glucosa o xilosa (Figura 4). Por cada mol de xilosa se producen 0.67 moles de ATP mientras que por cada glucosa se producen 2 moles de ATP. Con lo que es posible inferir que se requiere metabolizar xilosa a una mayor velocidad para lograr la misma eficiencia que la alcanzada en la

generación de biomasa a partir de glucosa. En el caso de la cepa JU15, al parecer se producen 1.67 moles de ATP por cada mol de xilosa esto es atribuible a la inactivación del transportador *xyIFGH* (dependiente de ATP) y a los niveles de actividad basal de la piruvato deshidrogenasa, se canaliza carbono hacia Acetil-CoA, generando acetato y por ende un mayor rendimiento de ATP.

Cepa <i>E. coli</i> Balance de ATP	
<p>Glucosa a Piruvato Por cada molécula de glucosa -2 ATP por activación +4 ATP producidos $\Sigma=2$ ATP por molécula de glucosa</p> <p>Rendimiento neto: 2 ATP por molécula de glucosa</p>	<p>Xilosa a Piruvato Por cada 6 moléculas de xilosa -6 ATP por transporte -10 ATP por activación +20 ATP producidos $\Sigma = 4$ ATP por 6 moléculas de xilosa</p> <p>Rendimiento neto: 0.67 ATP por molécula de xilosa</p>
Balance de NADH	
<p>Glucosa a Lactato +2 NADH en glucólisis -2 NADH en producción de lactato $\Sigma=0$</p> <p>Balance REDOX</p>	<p>Xilosa a Lactato +10 NADH en glucólisis -10 NADH en producción de lactato $\Sigma = 0$</p> <p>Balance REDOX</p>
Cepa <i>E. coli</i> JU15 Balance de ATP	
<p>Glucosa a Piruvato Por cada molécula de glucosa -2 ATP por activación +4 ATP producidos $\Sigma=2$ ATP por molécula de glucosa</p> <p>Rendimiento neto: 2 ATP por molécula de glucosa</p>	<p>Xilosa a Piruvato Por cada 6 moléculas de xilosa -10 ATP por activación +20 ATP producidos $\Sigma = 10$ ATP por molécula de xilosa</p> <p>Rendimiento neto: 1.67 ATP por molécula de xilosa</p>
Balance de NADH	
<p>Glucosa a Lactato Por cada molécula de glucosa + 2 NADH en glucólisis -2 NADH en producción de lactato $\Sigma=0$</p> <p>Balance REDOX</p>	<p>Xilosa a Lactato Por cada 6 moléculas de xilosa -10 ATP por activación +20 ATP producidos $\Sigma = 0$</p> <p>Balance REDOX</p>

Figura 4. Balance energético de las cepas de *E.coli* silvestre y JU15.

En el Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM) del Instituto de Biotecnología, a partir de *E. coli* MG1655 se han construido cepas por IVM para producir D-lactato bajo el fondo genético $\Delta pfIB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$ (Utrilla et al., 2009). Además se promovió la utilización del sistema de transporte de xilosa por simporter (*xyIE*) para evitar el uso de ATP en la internalización de xilosa. Para lograr esto se eliminó el sistema de transporte ABC de xilosa (*xyIFGH*). Esta cepa (*E. coli* MG1655 $\Delta pfIB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyIFGH$) CL3 fue sometida a evolución adaptativa, obteniéndose de esta manera la cepa denominada JU15 (Utrilla 2009b), con la cual se ha logrado convertir 40 g/L de glucosa o xilosa en D-lactato con rendimientos de conversión del 95% en 1.5 y 2 días respectivamente, mostrando su superioridad para producir D-lactato a mayor velocidad en comparación con las derivadas de *E. coli* W3110 (Utrilla 2009b). La tabla 2 muestra una comparación entre JU15 y su progenitora CL3 (MG1655 $\Delta pfIB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$), es de notar que se incrementaron casi al doble los parámetros de velocidad específica de crecimiento y velocidad específica de producto, manteniéndose constante el rendimiento de 95%.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento en xilosa de las cepas CL3 y JU15.

Parámetro	Cepa CL3	Cepa JU15
μ (h^{-1})	0.08	0.18
Y p/s (g lactato/g azúcar)	95%	95%
Vel. Esp. Prod (g lactato/g DCW*h)	1.3	2.62

μ : Velocidad específica de crecimiento

Yp/s: Rendimiento producto sustrato

Vel. Esp. Prod. Velocidad específica de producto.

3.2 Enzima lactato deshidrogenasa

En el paso final de la ruta Embden-Meyerhof las bacterias homofermentativas convierten el piruvato en lactato y regeneran NAD^+ a partir del NADH que se forma en los pasos previos, mientras que en las bacterias heterofermentativas aún cuando se forman otros metabolitos, la conversión de piruvato a lactato es también el paso mayoritario en la regeneración de NAD^+ . Las bacterias ácido-lácticas poseen una gran cantidad de lactato deshidrogenasa ligada a NAD (nLDH). Estas enzimas son citoplasmáticas. El piruvato se convierte en L(+) o D(-) lactato por diferentes enzimas L(+) L-LDH o D(-) D-LDH.

3.2.1 Lactato deshidrogenasa de *E.coli*

E.coli expresa tres tipos de lactato deshidrogenasas, dos están unidas a la membrana plasmática y llevan a cabo la conversión irreversible de D- y L- lactato a piruvato, mientras que la tercera es citoplasmática, de carácter fermentativo, es una enzima soluble ligada a NAD^+/NADH que convierte unidireccionalmente el piruvato a D(-) lactato. Esta enzima LDH se activa alostéricamente por piruvato encargándose de reoxidar el NADH generado durante la glicólisis (Tarmy, 1968). El gen *ldhA* de *E.coli* es inducido por dos factores, la anaerobiosis y la acidez. La expresión del gen está bajo el control de múltiples reguladores transcripcionales. En condiciones de baja concentración de oxígeno en *E.coli* se ha evidenciado un incremento en la actividad de la enzima LDH, así como las que intervienen en la vía glucolítica y otras relacionadas a la producción de otros ácidos orgánicos. (Zhu y Shimizu, 2005).

3.2.2 Lactato deshidrogenasa de *B. subtilis*

Por otro lado, *B. subtilis* posee una enzima que es específica para la formación de L(+) lactato, también dependiente de NAD^+ (Yoshida, 1965) que a diferencia de la LDH de *E. coli* no se activa por sustrato, y dentro de la clasificación de las L(+) LDH's, pertenece al grupo que se activa por 1,6-FDP (fructosa 1,6-difosfato). La L(+)LDH de *B. subtilis* (codificada por *lctE*) es un homotetrámero de 140 kDa,

comparte un 65% de identidad con la L(+)LDH de *B. stearothermophilus*, esta última se ha estudiado ampliamente y se cuenta con su estructura cristalográfica (Schar, 1982).

La lactato deshidrogenasa de *B.subtilis* desempeña un papel fundamental en el metabolismo fermentativo. Esto se demostró al generar la cepa BS35 la cual tiene interrumpido el gen *ldh*, donde el crecimiento y el consumo de glucosa se ven abatidos en esta construcción, aún cuando se ha reemplazado la vía fermentativa de lactato por la vía heteróloga de producción de etanol. Se determinó la especificidad de los cofactores de la enzima, encontrándose que es capaz de utilizar ambos: NADH y NADPH, esto se evidenció de manera clara ya que en ausencia de la deshidrogenasa no se detecta la reducción del NADPH. (Romero et al., 2007). Para verificar que la reducción del NADPH es catalizada únicamente por la enzima lactato deshidrogenasa de *B.subtilis* se determinaron sus parámetros cinéticos: Km NADH 0.013 mM, Km NADPH 0.288 mM el valor de NADH es muy similar al reportado previamente (Tabla 3.) (Yoshida, 1965).

En las bacterias Gram positivas se han determinado los valores de Km para NADH y estos oscilan entre 0.001 a 0.22 mM; destaca el valor de *B. subtilis* por ser una de las correlaciones más altas del valor de afinidad por el NADH y valor de actividad de LDH (Garvie 1980). Mientras que el valor de Km para NADPH de *B.subtilis* es similar al de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus acidophilus* y *L. jensenii* (Romero et al., 2007).

3.2.3 Comparación de las propiedades catalíticas de las enzimas LDH de *E.coli* y de *B. subtilis*

Tabla 3. Parámetros cinéticos para lactato deshidrogenasa de *B.subtilis* y *E. coli*.

Fuente	Parámetros cinéticos					Ref.
	KM NADH (mM)	KM Piruvato (mM)	KM Lactato (mM)	kcat ((mol _S /min)/mol _{enzima})	Act esp. (UI/mg _{PROT})	
<i>lctE</i> <i>B. subtilis</i>	0.065	0.8	30	4.2 x 10 ⁶	1.1x10 ⁴	Yoshida 1965
<i>ldhA</i> <i>E. coli</i>	0.65	7.2	22	3.4 x 10 ⁴	2.5 x10 ²	Tarmy & Kaplan 1968

En comparación con la D-LDH de *E.coli*, la L-LDH de *B. subtilis* presenta una afinidad diez veces mayor por NADH y piruvato, así mismo su kcat y actividad específica son dos órdenes de magnitud mayores que las de *E. coli*. Estas características, nos permitieron plantear la factible sustitución del gen que codifica para la D-LDH nativa de *E. coli* con el de la L-LDH de *B. subtilis* bajo el control del promotor silvestre de *ldhA*, para obtener cepas capaces de producir L-lactato.

En la generación de cepas de *E.coli* L-lactogénicas, la elección de la enzima heteróloga constituye un factor decisivo en el éxito de la construcción, en consecuencia, se han dirigido esfuerzos en distintas vertientes.

3.2.4 Mejoramiento de la enzima LDH

En el Instituto de Biotecnología se ha realizado investigación en la evolución dirigida de la enzima lactato deshidrogenasa, enfocada al mejoramiento de los parámetros catalíticos de la L-LDH de *Bacillus stearothermophilus*. Mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos consenso se creó una librería, donde fueron sustituidos de manera preferencial, los aminoácidos cercanos al sitio de unión del cofactor

NADH, tomando como base la estructura tridimensional de la lactato deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus*. Una triple mutante (Mut 31) fue mejor en la utilización del NAD⁺ y más eficiente catalíticamente que la enzima silvestre. Al efectuar la sustitución de dos aminoácidos en (Mut 31) involucrados en la especificidad de la enzima por el cofactor, la enzima utiliza mejor el NADP⁺ e invirtió su preferencia de NADH por NADPH (Flores et al., 2005).

Sin embargo el uso de las enzimas lactato deshidrogenasas modificadas en *E.coli* se encuentra aún limitado debido a que se ha reportado que la sobre-expresión de la enzima puede generar efectos adversos tales como los siguientes:

3.2.5 Efecto de toxicidad de plásmidos multicopia de la enzima L-LDH de *B. subtilis* en *E. coli*.

El efecto de la sobreexpresión en plásmidos multicopia de la L-LDH de *B. subtilis* en *E. coli*, se ha determinado como tóxico en la cepa Val23 (*E. coli* W3110 $\Delta pfl \Delta ldh$). Esto se observa como una disminución en la generación de biomasa y en los rendimientos de ácido láctico en condiciones anaerobias, además reduce sustancialmente el crecimiento del bacilo en condiciones aerobias. De la misma manera se ha evidenciado que en mutantes carentes de la actividad enzimática LDH (ausencia de producción de ácido láctico) se desencadena el mismo efecto tóxico al sobre-expresar la proteína en el medio intracelular (Vázquez et al., 2007). Esto puede ser debido a la interacción de regiones hidrofóbicas en la superficie de la proteína lo cual evita la solubilidad y ocasiona la formación de agregados. Sin embargo, cuando el nivel de transcripción del plásmido es basal en condiciones anaerobias, la actividad de LDH de *B. subtilis* logra complementar la ausencia de la LDH silvestre en *E. coli* y permite el crecimiento de VAL23, regenerando el NAD⁺ mediante la conversión de piruvato a lactato (Vázquez et al., 2007).

3.2.6 Abatimiento del efecto tóxico de plásmidos multicopia de la enzima L-LDH de *B. subtilis*

El efecto de toxicidad al sobre-expresar la LDH de *B. subtilis* es abatido mediante evolución dirigida, ello se evidenció al incrementar los niveles de expresión de la enzima en plásmidos. Las mutantes se eligieron empleando el criterio consistente en la mejora del crecimiento bajo la inducción de IPTG y la regeneración de NAD⁺ (Vázquez et al., 2007). Se identificaron dos variantes de interés, la 2P que aumentó la velocidad específica de formación de ácido láctico, aún cuando disminuye los niveles de expresión de la enzima, mantiene actividad específica ligeramente superior a la enzima silvestre. La variante 6T3 mejoró su actividad específica, mantiene un nivel de expresión similar al de la silvestre, atribuible a la disminución de agregados debido a que las mutaciones identificadas son en zonas de exposición al solvente. (Vega, 2009).

3.2.7 Posible efecto de la actividad enzimática de L-LDH de *B.subtilis* en el flujo glucolítico de *E.coli*

Datos de nuestro grupo y de otros, han mostrado que el transporte y la velocidad de transformación del piruvato en productos de fermentación permiten controlar el flujo a través de la glucólisis. Es decir, que una mayor capacidad para transportar glucosa o una mayor actividad total de alguna enzima que convierte el piruvato en productos de fermentación, permite controlar el flujo de la glucólisis y la productividad específica de productos de fermentación. En el caso de una cepa etanológica (*KO11/ppdc_{Zm}*) se observó que la sobre-expresión de la enzima piruvato decarboxilasa que realiza la conversión de piruvato a acetaldehído, incrementa la velocidad de consumo del carbohidrato y el flujo de la glucólisis; incrementando la actividad de PDC se logró aumentar sustancialmente el rendimiento teórico de conversión de glucosa o xilosa en etanol. Se ha demostrado que los incrementos en la actividad de PFK y PYK en la cepa KO11 reducen

drásticamente los flujos de consumo de glucosa y de formación de etanol, favoreciendo el flux de formación de ácidos orgánicos. De tal forma que incrementando el nivel de actividad de PDC se logró un efecto directo en el rendimiento teórico de conversión de glucosa o xilosa en etanol acrecentándose la velocidad de consumo de glucosa (Huerta et al., 2007). En este contexto, se propuso que las propiedades catalíticas de la enzima LDH de *B.subtilis* en la cepa L-lactogénica incrementarían el flujo glucolítico y probablemente el flujo de las pentosas al utilizar xilosa como fuente de carbono.

Con base en los antecedentes antes descritos, la elección de la LDH de *B.subtilis* como la enzima heteróloga en la generación de la cepa L-lactogénica y su integración a nivel de cromosoma se definió en función de tres factores fundamentales. El primero lo constituyen las **propiedades catalíticas** de la enzima LDH de *B. subtilis*, destacando el valor de afinidad por el piruvato y el cofactor NADH, de dos órdenes de magnitud superior a los reportados para *E.coli* (tabla 3), así como el valor de mayor actividad reportada (Garvie, 1980). El segundo es el **efecto tóxico** de la actividad de LDH en plásmidos multicopia en la cepa VAL23. (Vázquez et al., 2007; Vega 2009). El tercero es el efecto de la **carga metabólica** impuesta por la transcripción de plásmidos debido a que, en las cepas $\Delta pf1B$ los rendimientos de ATP limitan el uso de plásmidos. (Utrilla, 2009b). En consecuencia, con el objetivo de minimizar el fenómeno de carga energética y el efecto tóxico debido a la presencia de una alta cantidad de LDH de *B. subtilis*, se integró en el cromosoma de *E.coli* JU15 la enzima heteróloga.

3.3 Factible uso de xilosa como fuente de carbono en cepas homolácticas

Como objetivo en este proyecto se planteó la producción de L-lactato a partir de xilosa con la finalidad de aprovechar el potencial de uso de esta fuente de carbono contenida en los residuos agroindustriales. La composición de estos residuos es de un 25 a 30% de biomasa hemicelulósica de la cual, el 85% lo constituyen pentosas

(xilosa 75% y arabinosa 10%) y el otro 15% hexosas (glucosa) (Saha, 2003; Martínez et al., 2000). La pentosa más abundante es la xilosa y los productos de su fermentación permitirán obtener sustitutos de derivados del petróleo como el L-lactato empleado en la manufactura de plásticos biodegradables.

Adicionalmente, hasta el momento existen pocos microorganismos capaces de metabolizar eficientemente la xilosa, en este contexto resulta de interés el desarrollo de cepas eficientes en el aprovechamiento de la pentosa. Se requiere generar conocimiento básico en el metabolismo de xilosa en condiciones no aireadas para posteriormente transferir el bioproceso y en un futuro lograr la generación de cepas de aplicación industrial. Las tecnologías actuales de producción de plásticos biodegradables están enfocadas en reducir costos de producción para competir con la tecnología de producción de plásticos que emplea derivados del petróleo, para ello se requiere de generación de cepas, optimización de cultivos, uso de materiales renovables y manejo eficiente de la energía, con el objetivo de obtener una tecnología sustentable la cual permita posicionarse en el mercado comercial al proceso biotecnológico.

En el ámbito del futuro uso de materiales renovables y considerando la abundancia de la xilosa, es conveniente generar una cepa que en condiciones de fermentación produzca el isómero L-lactato.

3.3.1 Metabolismo de xilosa

La presencia de D-xilosa en el medio induce la expresión de dos operones involucrados en la utilización de esta fuente de carbono el primero: *xyIAB* (codifica para los genes *xyIA* (xilosa isomerasa) y *xyIB* (xilulocinasa) y el segundo *xyIFGHR* (codifica para los genes *xyIF*, *xyIG*, *xyIH* cada una de las subunidades del transporte de xilosa dependiente de ATP y *xyIR* es el activador de dicho transportador).

En el caso de la utilización de D-xilosa por parte de la cepa MG1655 es a través de un represor catabólico inducible el cual involucra dos transportadores que intervienen a nivel de la membrana citoplasmática y que no se activan por la D-ribosa o la D-arabinosa, sino por la isomerización de la D-xilosa y la fosforilación de la D-xilulosa- 5 fosfato dependiente de ATP. (Mayer C. and W. Boos 2009). La D-xilosa ingresa a través de dos permeasas inducibles una de alta afinidad y baja especificidad, cuyo valor de Km oscila de 0.3 a 3. Este sistema depende de la unión exitosa a una proteína del dominio periplásmico de 37,000 daltons y es dependiente de ATP. Mientras que la otra permeasa es de baja afinidad y alta especificidad, la cual emplea la fuerza motriz de un gradiente de protones. Este transportador de protones y de D-xilosa constituye el simporte y está codificado por *XylE*. (Davis E. y Henderson P. 1987).

En el metabolismo de la xilosa, el primer paso es la isomerización de la xilosa a xilulosa por acción de la enzima xilosa isomerasa, posteriormente la xilulosa es fosforilada por la xilulosa cinasa generando la xilulosa-5-fosfato. Y por último la transcetolasa convierte la xilulosa-5-fosfato en gliceraldehído-3-fosfato el cual es metabolizado por la glucólisis a piruvato. En la generación del intermediario xilulosa-5-fosfato, no se requiere la reducción de acetil-fosfato a etanol para mantener el balance redox. En su lugar, el ATP y el acetato son generados a partir del acetil-fosfato a través de la enzima acetato cinasa.

Otra manera de metabolizar la xilosa ocurre cuando la xilulosa-5-fosfato entra a la vía de las pentosas en la cual la ribulosa fosfato epimerasa genera la ribulosa-5-fosfato que sufre interconversiones sucesivas hasta generar dos moléculas de fructosa-6-fosfato; al fosforilarla se obtiene la fructosa 1,6-difosfato que es metabolizada por la glucólisis hasta piruvato. En condiciones de fermentación en ausencia de oxígeno, la concentración y el consumo de fructosa 1,6-difosfato es superior que en presencia de este (Alexeeva 2000).

4. HIPÓTESIS

Es posible sustituir el gen *ldhA* en *E. coli* JU15 (MG1655 Δ *pfIB*, Δ *adhE*, Δ *frdA*, Δ *xy/FGH*), con el gen *lctE* de *B. subtilis*, controlar su transcripción con el promotor silvestre de *ldhA*, para obtener cepas productoras de L-lactato, y que en base a las propiedades cinéticas de la L-LDH de *B. subtilis* se pueda incrementar el flujo de glucosa a lactato y probablemente el flujo a través de las pentosas cuando se utilice xilosa como fuente de carbono.

5. OBJETIVO GENERAL:

Modificar la cepa productora de D-lactato *E. coli* JU15 (MG1655, *pfIB*, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xy/FGH$) sustituyendo el gen nativo *ldhA* por el gen *ldh* de *B. subtilis*, utilizando glucosa o xilosa como fuente de carbono evaluar su efecto sobre la productividad de L-lactato.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Integrar en el cromosoma de *E. coli* JU15 (MG1655 $\Delta pfIB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xy/FGH$) el gen de la lactato deshidrogenasa de *B. subtilis* bajo el control del promotor de lactato deshidrogenasa nativa de *E. coli* interrumpiendo la expresión del gen *ldhA* de *E. coli*.
- Evaluar el efecto de la expresión del gen heterólogo en medio mineral, mediante análisis cinéticos de crecimiento celular, ensayos de actividad enzimática, producción y velocidad de formación de L-lactato, velocidades específicas de consumo de glucosa o xilosa en concentraciones de 40 y 80 g/L.

6. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos y someter a prueba la hipótesis propuesta se realizó la siguiente estrategia experimental:

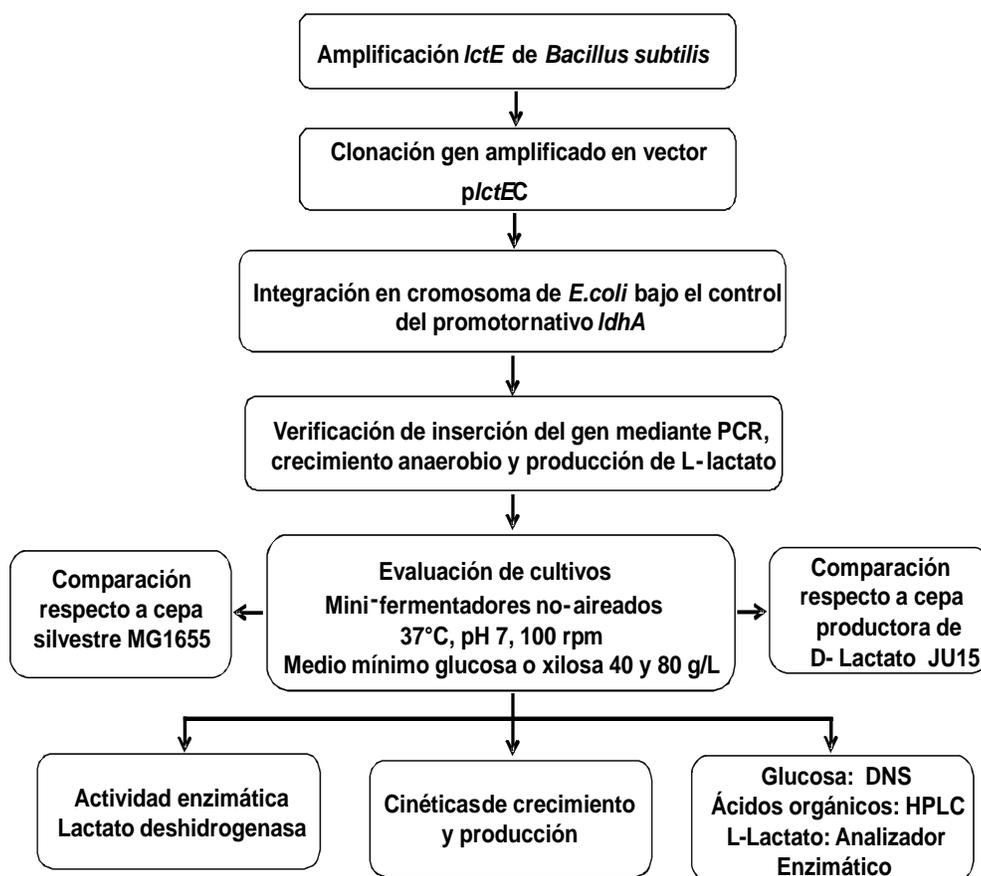


Figura 5. Estrategia experimental.

6.1 Técnicas de ADN recombinante

Todas las enzimas de restricción, T4 ADN polimerasa y marcadores de peso de peso molecular de ADN usadas en este trabajo fueron de New England BioLabs o MBI Fermentas, y se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Los demás reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química, Research Organics Inc, Merck-México y Difco Laboratories. De manera general, las manipulaciones de ADN, no descritas en esta sección, se llevaron a cabo por técnicas estándares, tal y como se describe en (Maniatis et al., 1989).

Las ligaciones se llevaron a cabo con una relación de vector: inserto de 1:4. El microorganismo huésped para la construcción de los vectores fue *E. coli* XL1-blue. Las células electrocompetentes de *E. coli* XL1-blue se prepararon usando medio YenB (libre de sales). Para los experimentos de clonación, los fragmentos de ADN procedentes de reacciones de PCR y las digestiones con enzimas de restricción se analizaron y purificaron con gel de agarosa al 1%. La purificación de ADN, a partir de una banda del gel de agarosa se llevó a cabo con el kit High Pure PCR Product Purification de Roche o bien utilizando el kit Rapid Gel Extraction System de Marligen Bioscience Inc. Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron utilizando Elongasa (New England Biolabs), Accuprime Supermix (Invitrogen) o Pfu ADN polimerasa (Fermentas). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 50 μ L, con los siguientes reactivos: 50 ng de ADN como templado, 35 pM de cada nucleótido iniciador, 0.2 mM de mezcla de dNTPs, amortiguador de enzima al 10% y 1-2 unidades de ADN polimerasa. La amplificación de las muestras se incubaron en los termocicladores Robo Cyclor gradient 96, Stratagene o PCR Sprint, ThermoHybaid. El programa de amplificación se diseñó contemplando el tamaño del templado a amplificar, la temperatura de alineamiento y la polimerasa utilizada.



6.2 Cepas

Las cepas de *E.coli* evaluadas así como las construidas en este trabajo se describen en la tabla 4. Finalmente, la cepa MG1655 se utilizó como testigo y la cepa JU15 como cepa progenitora y control positivo.

Tabla 4. Cepas de *E.coli* evaluadas y construidas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Referencia
MG1655	F ⁻ , λ, <i>ilvG</i> , <i>rfb50</i> , <i>rph-1</i>	Blattner et al; 1997
JU15	MG1655 Δ <i>pfkB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Kn ^r , E	Utrilla et al 2009
MT01	JU15 Δ <i>pfkB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Δ <i>ldhA</i> , Kn ^r	Fernández 2008
LL1	JU15 Δ <i>pfkB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Δ <i>ldhA::lctE</i> , Kn ^r , Cm ^r	Este trabajo
LR1	MT01 Δ <i>pfkB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Δ <i>ldhA::lctE</i> , Kn ^r , Cm ^r	Este trabajo
LL2	JU15 Δ <i>pfkB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Δ <i>ldhA::lctE</i> , Kn ^r	Este trabajo
LR2	MT01 Δ <i>pfkB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Δ <i>ldhA::lctE</i> , Kn ^r	Este trabajo
LL26	JU15 Δ <i>pfkB</i> , Δ <i>adhE</i> , Δ <i>frdA</i> , Δ <i>xyIFGH</i> , Δ <i>ldhA::lctE</i> , Kn ^r , E	Este trabajo

E: Cepa Evolucionada

6.3 Condiciones y medios de cultivo

Inóculos para cultivos

Con la finalidad de estandarizar los experimentos y obtener inóculos cuyas variaciones sean mínimas, durante el desarrollo de este proyecto se realizaron bancos de gliceroles de las cepas MG 1655, JU15 y la seleccionada LL26 (ver sección de resultados). Se crecieron en medio mineral-glucosa o xilosa (40 g/L, pH: 7, 37°C 150 rpm) y cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm fue de 1 se preservaron en crioviales conteniendo 800 μL de glicerol al 80% y 800 μL del respectivo cultivo.

Condiciones de cultivo.

Las fermentaciones se realizaron en sistemas de mini-fermentadores o mini-fleakers (Beall *et al.*, 1991), con un volumen de trabajo de 200 mL. La temperatura se controló a 37°C y el pH a 7.0 mediante la adición automática de KOH y con una velocidad de agitación de 150 rpm. El medio se suplementó con glucosa y xilosa en concentraciones de 40 y 80 g/L para ambos casos. Se emplearon dos concentraciones de KOH: 2N en el caso de las fermentaciones de glucosa o xilosa en concentraciones de 40g/L y KOH 4N para las fermentaciones de 80 g/L de carbohidrato. Los cultivos se realizaron en medio AM2, que se caracteriza por su bajo contenido de sales (Martínez *et al.*, 2007) La composición del medio AM2 se detalla en la tabla 5:

Tabla 5. Composición del medio mínimo AM2.

Medio mínimo AM2	
Componente	Concentración (unidades)
(NH₄)₂HPO₄	2.63 g/L
NH₄H₂PO₄	0.87 g/L
MgSO₄7H₂O (1M)	1.0 mL/L
Elementos traza	1.5 mL/L
KCl (2M)	1.0 mL/L
Ácido cítrico	100 mg/L
Betaína HCl	1.0 mL/L

La composición de los elementos traza se describe en la siguiente tabla:

Tabla 6. Composición de los elementos traza en el medio AM2.

Elementos traza	
Compuesto	Concentración (g/L)
FeCl₃	1.6
CoCl₂6H₂O	0.2
CuCl₂	0.1
ZnCl₂4H₂O	0.2
Na₂MoO₄	0.2
H₃BO₃	0.05
MnCl₂·4H₂O₂	0.33

El sistema de mini-fermentadores o Fleakers empleado en este trabajo, se muestra en la figura 6 y consta de:

- a) Un control de temperatura, el cual está integrado por un baño de agua, un sensor de temperatura y un termocirculador de agua.
- b) Un control de pH, el cual está integrado por 6 electrodos, 6 controladores y 6 válvulas (solenoides) para la adición de base.
- c) Un sistema de agitación o parrilla magnética con capacidad para 6 magnetos (rango de 100-850 rpm)
- d) 6 Mini-fermentadores o fleakers con un volumen nominal de 250 mL cuyo sistema de agitación consiste en un agitador magnético en forma de cruz de 1.5 pulgadas.



Figura 6. Sistema de mini-fermentadores.

Concentración celular

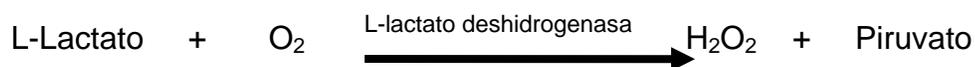
La densidad óptica se midió a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU-70) y se convirtió a peso seco de células (DCW: dry cellular weight), de acuerdo a una curva de calibración: $1 \text{ DO}_{600} = 0.37 \text{ gDCW/l}$. Todas las muestras se centrifugaron (5,000 rpm y temperatura ambiente); el paquete celular se desechó y el sobrenadante se congeló para su posterior análisis.

6.4 Cuantificación de L-Lactato mediante YSI

El lactato puede ser determinado mediante HPLC, sin embargo esta metodología no permite discriminar entre las formas D o L, al menos que se use una columna para separación quiral, por tal razón en este trabajo se decidió usar usando el analizador bioquímico YSI 2700 Select. Los sensores enzimáticos YSI emplean una o más enzimas que al término de la reacción producen peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es electroquímicamente oxidado en el electrodo de platino de la sonda electroquímica.

La sonda produce una señal eléctrica. Las mediciones no son afectadas por color, turbidez, densidad o pH. La enzima que contiene la membrana para determinar lactato de este analizador bioquímico es específica para L-lactato.

La reacción química es:



Cuando la muestra es inyectada en la cámara, el L-Lactato difunde a través de la membrana que contiene la enzima L-lactato deshidrogenasa inmovilizada y es inmediatamente oxidado a peróxido de hidrógeno y piruvato. El peróxido de hidrógeno es detectado amperométricamente en la superficie de platino del electrodo. La corriente es directamente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y en consecuencia a la concentración de L-lactato.

En algunos casos se cuantificó de manera indirecta la producción de ácido láctico al titularlo con hidróxido de sodio (KOH) 2N. Puesto que el rendimiento de conversión de glucosa a lactato es de 1:1, a partir de 40 g de glucosa se espera producir 40 g de ácido láctico, los cuales se titulan con 44.4 ml de KOH 2N.

Para cerciorarnos de que el producto de fermentación de la cepa **LL26** se trata de L-Lactato, se cuantificó en el sobrenadante de cada muestra tomada a intervalos de 3h en las cinéticas de crecimiento y producción de la cepa LL26. Desde que se obtuvo la cepa LL1 (MG1655 ΔpfB , $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyFGH$ $\Delta ldhA::lctE$ Cm^r) se realizó una cuantificación de una fermentación de la cepa LL1 y se confirmó que produce L-Lactato.

Como controles experimentales se tienen: la cepa silvestre MG1655, la cepa JU15 productora de D-Lactato. Debido a que se confirmó que la única cepa que produce L-lactato es la cepa LL26 y para simplificar las figuras, en las gráficas globales de producción de lactato el dato que se muestra para la cepa LL26 es el obtenido mediante YSI, los datos de las cepas MG1655 y JU15 provienen del HPLC. A través del HPLC no puede diferenciarse el isómero D del L, se observó una correspondencia en los datos del HPLC y los del YSI para la cepa LL26.

6.5 Determinación de azúcares y ácidos orgánicos

La determinación de xilosa y glucosa se hizo usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Los productos de fermentación, ácidos orgánicos (acético, fórmico, succínico, láctico, pirúvico, etc.) también se determinaron por HPLC. La determinación por HPLC, se llevó a cabo por cromatografía isocrática con H₂SO₄ 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min en una columna Aminex HPX-87H (Biorad) a 50°C. La detección de los compuestos separados, se efectuó simultáneamente con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). El análisis y procesamiento de datos se

realizó con el sistema Milenium (Versión 3.01 Waters). Las temperaturas interna y externa de la columna fueron ajustadas a 35 y 45°C respectivamente. Los sobrenadantes de las muestras a analizar se filtraron previo al análisis con membranas de 0.45 μm y se inyectaron automáticamente con ayuda del autoinyector (Waters 717). Para la confirmación de los azúcares y los productos analizados por HPLC se inyectaron estándares de xilosa, glucosa, ácidos orgánicos, alcoholes e intermediarios metabólicos.

6.6 Actividad enzimática

Las actividades enzimáticas se verificaron en extractos celulares cosechados durante el crecimiento exponencial. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Es posible determinar la actividad de una enzima siguiendo de manera continua el incremento o decremento de la absorbancia producida por la desaparición o aparición del sustrato o del producto. Un ejemplo de ello es la determinación de la actividad de las enzimas deshidrogenasas, también denominadas reductasas, que utilizan al NADH como uno de los sustratos o bien es uno de los productos.

En la enzima lactato deshidrogenasa el NADH es uno de los sustratos en la reacción y absorbe a una longitud de onda de 340 nm, la forma oxidada NAD^+ no absorbe a esta longitud de onda, por lo que se puede medir la disminución de NADH y así determinar la actividad de la enzima. La pendiente de la curva (cociente absorbancia / tiempo), permite determinar la velocidad de la reacción.

El ensayo se desarrolló a 30 °C y pH de 7.0, monitoreando la velocidad de reacción espectrofotométricamente a 340 nm, con una celda de 1 cm, se midió directamente con la adición de piruvato y monitoreando la oxidación del NADH a 340 nm (Peng et al., 2003). La actividad enzimática específica es reportada como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{prot}})$], la cual se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 μmol de sustrato en

producto por minuto por mg de proteína. La concentración de proteína celular total se determinó por el método de Bradford empleando albúmina bovina sérica (BSA) como estándar.

Conociendo el coeficiente de extinción molar del NADH ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) es posible calcular la cantidad de sustrato que desaparece en función del tiempo, con lo cual se determina la velocidad de la reacción y cuantifica la actividad de la enzima.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Construcción de las cepas LL1 y LR1

Se construyeron las cepas LL1 y LR1, derivadas de JU15 [MG 1655, $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyFGH$, Kn^R , **E** (evolucionada)] y MT01 (JU15 Δldh), respectivamente. Tan sólo por incrementar la probabilidad de obtener la cepa se partió de estas dos cepas, si bien, es claro que sin importar de cual provenga, el objetivo es obtener la cepa cuyo genotipo sea MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyFGH$ $\Delta ldhA::lctE$ Kn^R de tal forma que contengan el gen que codifica para la lactato deshidrogenasa de *B. subtilis* (*lctE*) bajo regulación del promotor nativo de *ldhA* de *E. coli*.

Para la construcción de las cepas LL1 y LR1 se efectuó la siguiente estrategia experimental:

7.1.1 Construcción del plásmido plctEC

El plásmido plctEC (Figura 9) se construyó con la finalidad de utilizarse como templado para obtener el PCR con el cual se llevó a cabo la integración del gen lactato deshidrogenasa de *B. subtilis* (*lctE*) en el cromosoma de *E. coli* JU15. El plásmido plctEC fue generado mediante la clonación de un fragmento de ADN de 1192 pb, obtenido por digestión del plásmido plctE (Figura 7) (Vázquez-Limón et al; 2009) con *HindIII*, en el sitio *HindIII* del plásmido pKD3 (Figura 8) (Datsenko y Wanner 2000). El plásmido resultante plctEC (Figura 9) es de 6321 pb, contiene el gen *lctE* bajo regulación del promotor híbrido *trc* y delante de este el gen que codifica para la cloramfenicol acetil transferasa flanqueado por los sitios FRT.

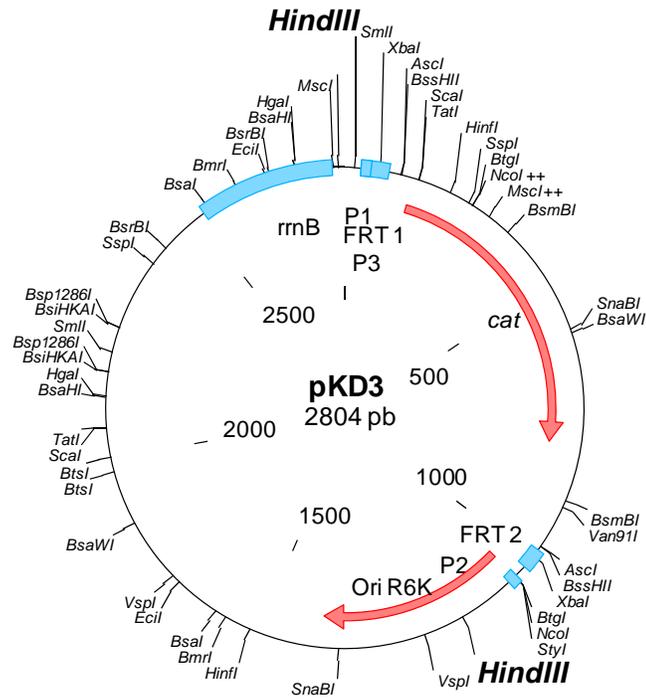


Figura 7. Plásmido pKD3 contiene los sitios: P1, FRT, el gen que codifica para la cloramfenicol acetil transferasa, FRT y P2. (Datsenko y Wanner 2000)

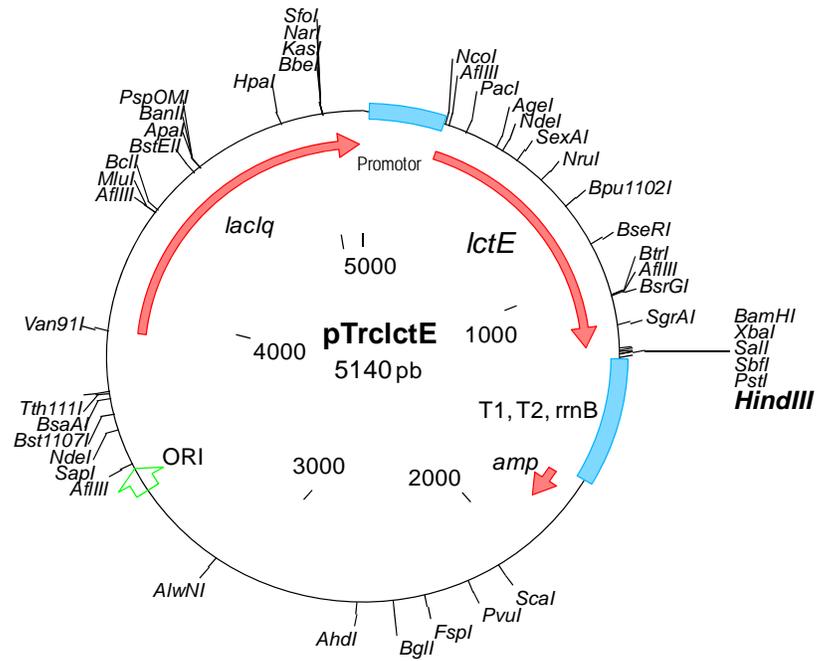


Figura 8. Plásmido que contiene el promotor *trc*, *lctE* y resistencia a ampicilina. (Vázquez-Limón 2009).

El plásmido plctEC fue transformado en *E. coli XL1Blue*, las colonias transformadas fueron aisladas en LB con ampicilina 200 µg/mL y cloramfenicol 30 µg/mL. De ellas se aisló el plásmido para confirmar la correcta construcción de plctEC (Figura 9), mediante el patrón de restricción con *HindIII*. De tal forma que las digestiones con *HindIII* dieron lugar a dos fragmentos, uno de 5,139 pb y otro de 1192 pb. (Figura 10).



Figura 10. Patrón de restricción de la enzima *HindIII* en el plásmido plctEC aislado de colonia crecida en Ap 200 µg/mL Cm 30 µg/mL. En el carril 1 aparece el marcador de peso molecular, del carril 4 al 12 corresponde a plásmido extraído de colonia crecida en Ap 200 µg/mL Cm 30 µg/mL. Los productos de los carriles 4, 6, 7 y 9 coinciden con los pesos moleculares esperados: el fragmento de menor tamaño es el que contiene los sitios P1, FRT1, cloramfenicol acetil transferasa, FRT2, P2 y el Ori6K.

Para asegurar que el marco de lectura del gen *lctE* quedara bajo regulación del promotor *trc*, se realizaron digestiones con la enzima *NcoI* cuyos fragmentos en fase se aprecian en el siguiente gel (Figura 11).

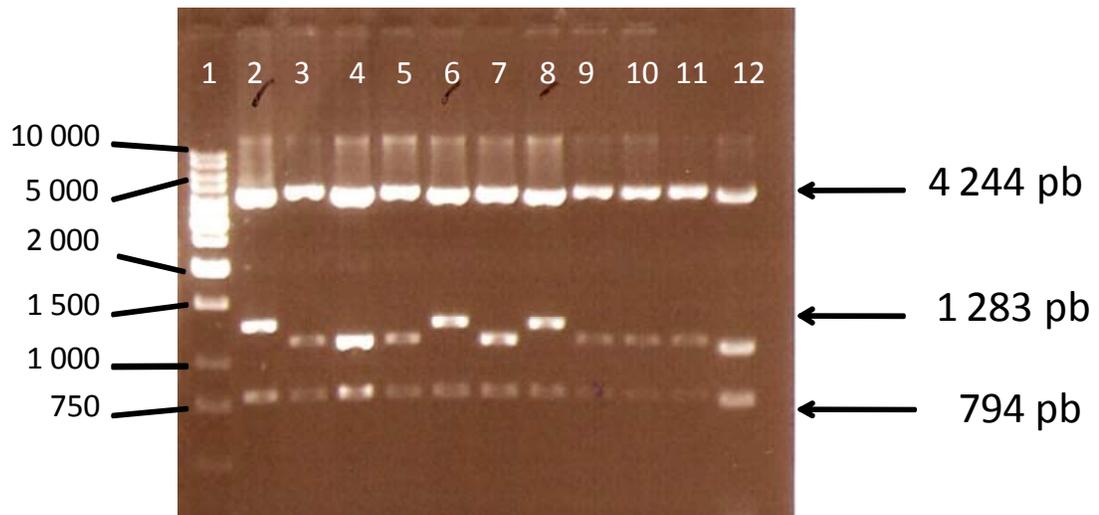


Figura 11. Patrón de restricción obtenido con la enzima *NcoI* en el plásmido *plctEC* aislado de colonia crecida en Ap 200 mg/mL y Cm 30 µg/mL. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, de los carriles 4 al 7 corresponde a los plásmidos *plctEC* analizados. Las muestras de los carriles 2, 6 y 8 corresponden a los fragmentos esperados, que son de 4,244 pb, 1,283pb y 794 pb. La digestión confirmó la presencia del gen *lctE* en fase, bajo regulación del promotor *trc*.

7.1.2 Integración del gen *lctE* de *B.subtilis* en el cromosoma de JU15 y MT01

Mediante los datos del genoma de *E.coli* depositados en los sitios Colibrí y Ecocyc, se ubicó el gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa *ldhA*, en la posición 1440.9 Kb; esto es entre el regulador positivo para el regulón de cisteína *CysB* y el gen *ydbH* cuya función es aún desconocida, en la figura 14 se muestra la posición de los genes en la vecindad del gen *ldhA*.

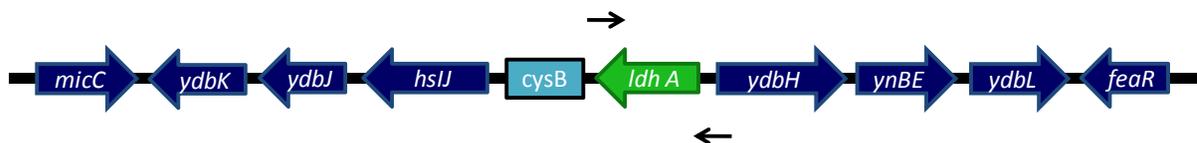


Figura 12. Localización cromosomal del gen *ldhA* que codifica para la lactato deshidrogenasa de *E.coli* MG1655.

La integración del gen *lctE* en el cromosoma tanto en JU15 como en MT01 se llevó a cabo mediante modificación de la estrategia de Datsenko y Wanner 2000. Inicialmente se diseñaron un par de oligonucleótidos (Figura 13) para amplificar mediante PCR un fragmento de ADN de 2263 pb (Figura 14) que contiene el gen de *lctE* y el cassette de resistencia a cloramfenicol flanqueado por los sitios FRT utilizando como templado el plásmido *plctEC* (Figura 9). Los oligonucleótidos específicos de 63 y 59 bases tienen homología con las regiones adyacentes al gen *ldhA* de *E.coli* que se desea inactivar (H1 y H2) y al plásmido (*pKD3*) templado (P1 y P2) que contiene el gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por los sitios FRT (Figura 13.)

EcLctEIntFw

**5´ AAA TTT TGT AAA ATA TTT TTA GTA GCT TAA ATG TGA TTC AAC tca cac
agg aaa cag acc atg 3´**

Tm: 73, %GC 29, 63 bases

EcLctEIntRv

**5´ TTA AAC CAG TTC GTT CGG GCA GGT TTC GCC TTT TTC CAG cat atg aat
atc ctc ctt ag 3´**

Tm: 78, %GC 44, 59 bases

Figura 13. Oligonucleótidos para obtener el fragmento de ADN a partir del cual se integró el gen *lctE* en *E.coli*. Nota: En mayúsculas se muestran (H1 y H2) y en minúsculas (P1 y P2).

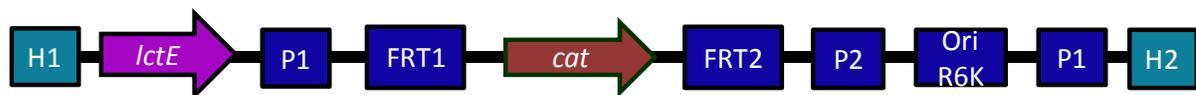


Figura 14. Representación del producto de PCR de 2663 pb que contiene el gen *lctE* ubicado río arriba del gen *cat* flanqueado por los sitios FRT.

Las cepas JU15 y MT01 fueron transformadas con el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner 2000), el cual contiene el sistema de recombinación red del fago inducible mediante arabinosa. Las cepas transformantes se crecieron en medio SOB con arabinosa a 30°C para inducir la expresión de las recombinasas del fago lambda y después hacerlas electrocompetentes. Posteriormente las células electrocompetentes fueron transformadas por electroporación con el producto de PCR de interés, el cual contiene la lactato deshidrogenasa heteróloga río arriba del cassette de resistencia a Cm, flanqueado por los sitios P1, FRT1, y FRT2, P2, Ori6K, P1 respectivamente; (Figura 14). En suma, se generó un producto de 2263 pb (Figura 15). Las células se recuperaron por 3 horas en medio SOC con glucosa y se seleccionaron en LB con Cm 30 µg /mL y Kn 40µg/mL.

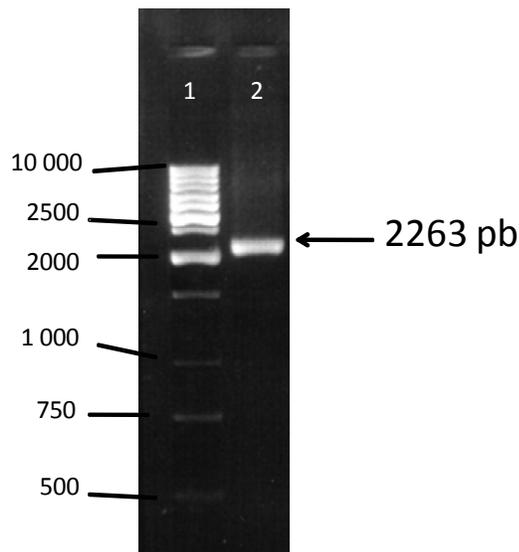


Figura 15. Producto de PCR que muestra la amplificación de *lctE*, y el gen *cat*.

Se seleccionaron las colonias que crecieran en Cm 30 µg/mL, Kn 40 µg/mL y no en Ap 100 µg/mL. Estas colonias fueron analizadas por PCR con los oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *ldhA* de *E.coli* desde 200 pb fuera de la región estructural. De esta manera se obtiene un producto de 2663 pb, que contiene la integración del gen *lctE* de *B.subtilis* y el cassette de resistencia a Cm. El PCR indica que el gen *lctE* está integrado en cromosoma bajo el control del promotor nativo de *ldhA* de *E.coli*. Las cepas recombinantes se denominaron LL1 y LR1

derivadas de JU15 (MG1655, $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyIFGH$, $\Delta ldhA::lctE$ Kn^R) y MT01 (JU15 $\Delta ldhA::lctE$, Kn^R) respectivamente, en la figura 16 se muestra el análisis de las colonias previamente descritas.

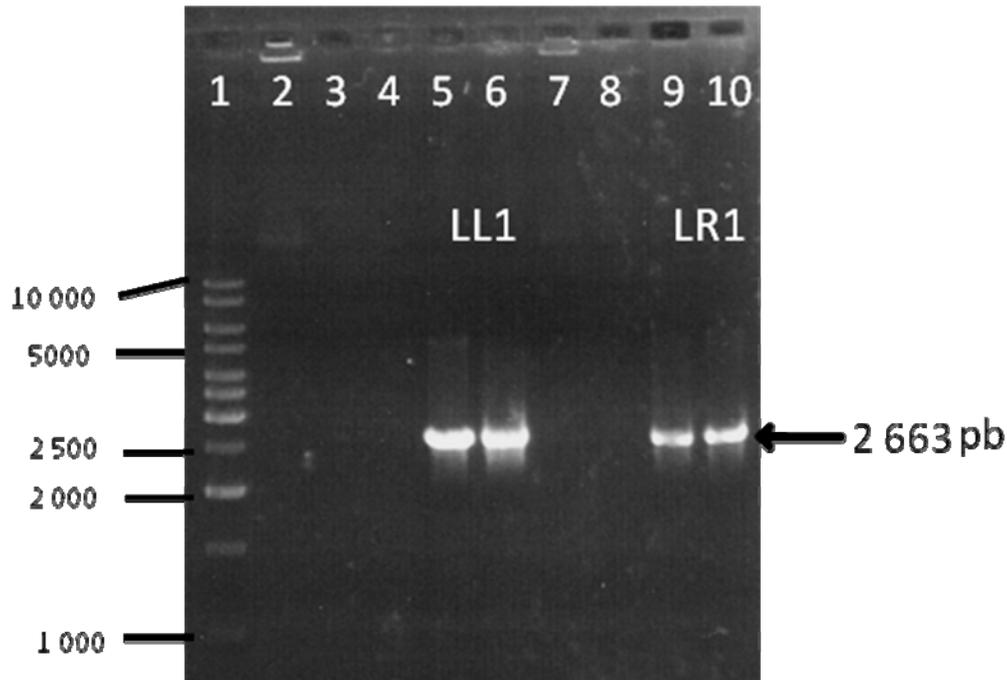


Figura 16. Producto de PCR correspondiente a la integración del gen heterólogo. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, los carriles 5 y 6 corresponden a la cepa LL1 y en los carriles 9 y 10 se presenta la cepa LR1. Para ambas cepas se ha amplificado un producto de PCR que coincide con el peso molecular esperado (2663 pb) cuando se ha integrado al gen heterólogo.

Posteriormente, en las cepas obtenidas LL1 y LR1 fue eliminado el cassette de resistencia a cloramfenicol mediante la FLP recombinasa. Las cepas recombinantes se seleccionaron por la pérdida de resistencia a cloramfenicol. De las colonias obtenidas sensibles a kanamicina se evaluaron mediante PCR con los oligonucleótidos específicos para verificar la interrupción obteniéndose un producto cercano a las 1093 pb, que corresponde a los sitios adyacentes del gen heterólogo *lctE*. De esta manera se obtuvieron las cepas denominadas **LL2** y **LR2** (*E. coli* MG 1655, $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyIFGH$, $\Delta ldhA::lctE$, Kn^R) (LL2 y LR2 son carentes de Cm^r). Se eligió a la cepa LL2 por mostrar un mejor fenotipo con respecto de LR2.

La integración del gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa de *B.subtilis* en la cepa LL2 se confirmó cuantificando la formación de L-lactato en lugar del D-lactato, demostrando así que es funcional.

Así mismo, la integración constituye la única vía de producción de L-lactato en condiciones de fermentación de esta cepa. Si bien, existe la vía del metil glicoxal en *E.coli*, mediante esta vía metabólica sólo se produce el L-lactato como un paso intermediario en el mecanismo de detoxificación del metil glicoxal, y generalmente por esta va se genera L-lactato de forma transitoria, pues posteriormente es convertido a piruvato y dirigido hacia el metabolismo central. (Murata et al; 1989).

En la figura 17 se presenta un esquema que representa la construcción obtenida, teniendo al gen que codifica para la lactato deshidrogenasa heteróloga *lctE* bajo regulación del promotor nativo del gen *ldhA* de *E.coli*.

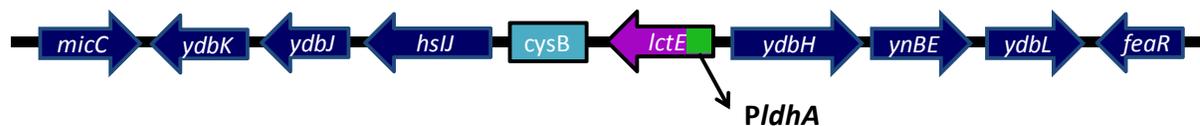


Figura 17. Mapa de la localización del gen que codifica para la lactato deshidrogenasa heteróloga *lctE* bajo regulación del promotor nativo *ldhA* en el cromosoma de *E.coli* JU15.

7.2 Evaluación de clonas en medio mineral AM2-glucosa 40 g/L

De la cepa LL2, se tenían 5 colonias para ser caracterizadas fenotípicamente, se denominaron LL2 (1-5) y contienen el gen que codifica para la lactato deshidrogenasa de *B. subtilis* (*lctE*) bajo regulación del promotor nativo de *ldhA* de *E.coli*. Se analizaron en condiciones de fermentación en medio mineral AM2, se complementó el medio con glucosa 40 g/L y el pH se controló a 7.

Es importante mencionar que la cepa LL2 tiene como única vía para la regeneración del poder reductor la conversión de piruvato a lactato, así, el lactato producido se puede estimar mediante el consumo de base (KOH 2N). Para esta evaluación se empleó como control la cepa JU15, progenitora de la serie de cepas LL2. La cepa JU15 fue evolucionada en xilosa y fermenta 40 g/L de xilosa en 72 h mientras que para el caso de la glucosa a la misma concentración el tiempo es de 36 h. (Utrilla 2007). Los datos de densidad óptica y consumo de base se muestran en las figuras 18 y 19 respectivamente.

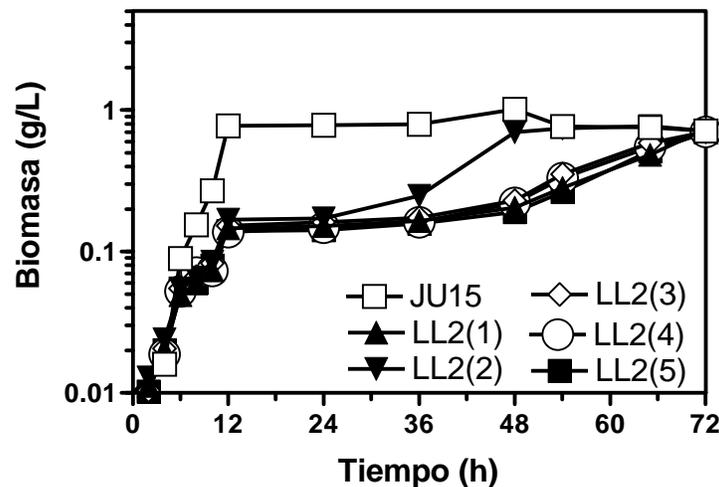


Figura 18. Perfil de crecimiento de las 5 colonias seleccionadas de LL2 (1, 2, 3, 4 y 5) y JU15 en glucosa 40 g/L.

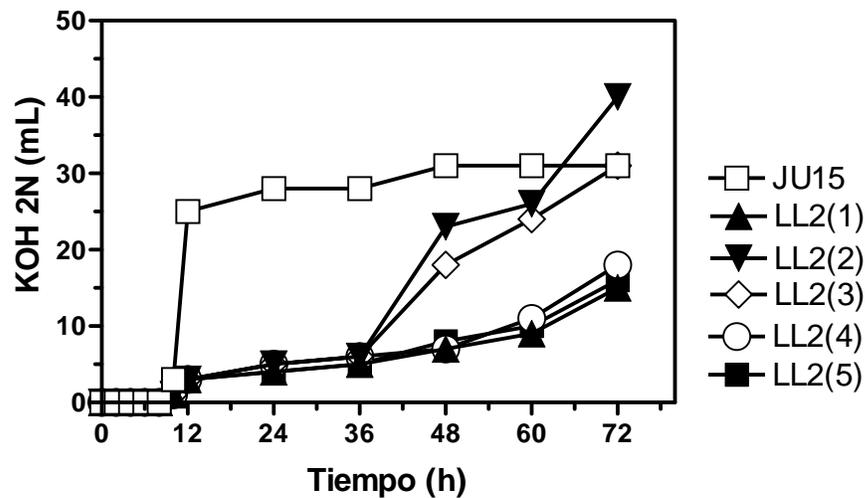


Figura 19. Consumo de KOH 2N de las colonias de LL2 (1, 2, 3, 4 y 5) y JU15 en glucosa 40g/L

Se aprecia en las figuras 18 y 19 que las colonias LL2(2) y LL2(3) fueron las que mostraron la mejor correlación de crecimiento y consumo de base, siendo los valores de biomasa de 0.17 y 0.15 g/L a las 12 h, así como de 40 y 31 mL de consumo de KOH 2N a las 72 h, respectivamente. Siguiendo este criterio se eligieron las colonias LL2(2) y LL2(3) para evaluar su crecimiento en condiciones de fermentación en medio mineral AM2 complementado con glucosa 40 g/L. Sin embargo se observa en la figura 18 que las cepas seleccionadas LL2(2) y LL2(3) presentaban un crecimiento retardado en comparación con JU15, por lo que se decidió someterlas a transferencias sucesivas en glucosa 40 g/L con la finalidad de reducir dicha fase y así adaptar a la cepa para crecer de manera más rápida y eficiente en presencia de glucosa 40 g/L. Debido a que ambas cepas LL2(2) y LL2(3) provienen de la cepa LL2 (*E. coli* MG 1655, $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, $\Delta ldhA::lctE$, Kn^R) se simplificó la nomenclatura denominándolas LL2 y LL3 para diferenciarlas de las 5 cepas evaluadas previamente.

7.2.1 Transferencias de las cepas LL2 y LL3 en glucosa 40 g/L

La cepa LL2 fue adaptada para crecer en glucosa 40 g/L, se hicieron dos transferencias en las cuales se mejoró la correlación de densidad óptica (Figura 20) y consumo de base, generándose así la cepa LL2-2. El mismo número de transferencias se realizaron para la cepa LL3, obteniéndose la cepa LL3-2 (Figura 21), esto se hizo hasta mejorar la velocidad específica de crecimiento de la cepa, en el caso de LL2 fue hasta alcanzar un valor de 0.40 h^{-1} , mientras que para la cepa LL(3) fue de 0.34 h^{-1} , un 15% menor. En estos resultados también se confirmó la correlación entre la biomasa alcanzada y el consumo de base. Como se observa en las figuras 22 y 23 la velocidad de producción de lactato, cuantificado como consumo de base fue mayor para las cepas derivadas de LL2.

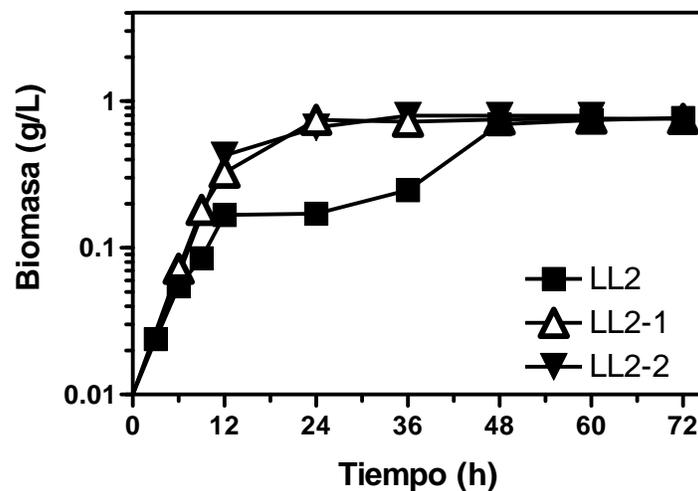


Figura 20. Crecimiento de la cepa LL2 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.

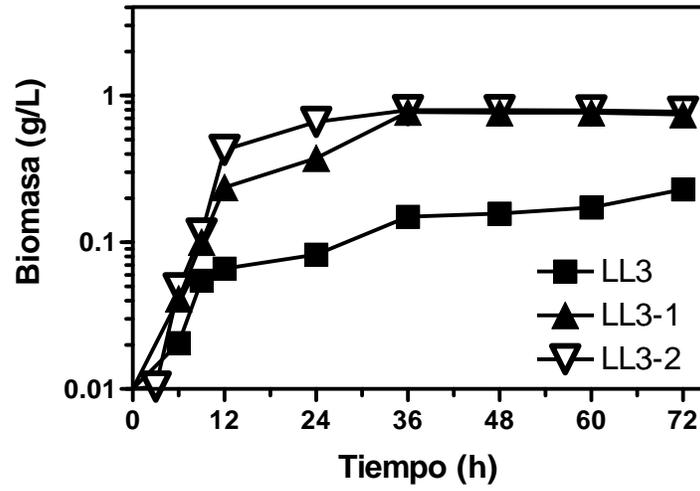


Figura 21. Crecimiento de la cepa LL3 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.

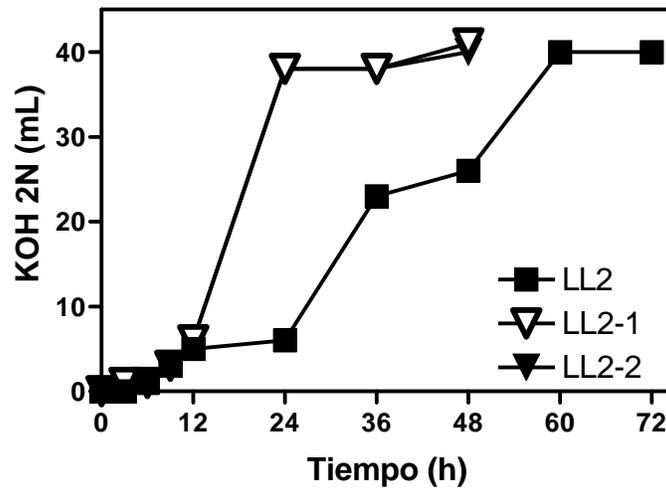


Figura 22. Consumo de KOH 2N con la cepa LL2 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.

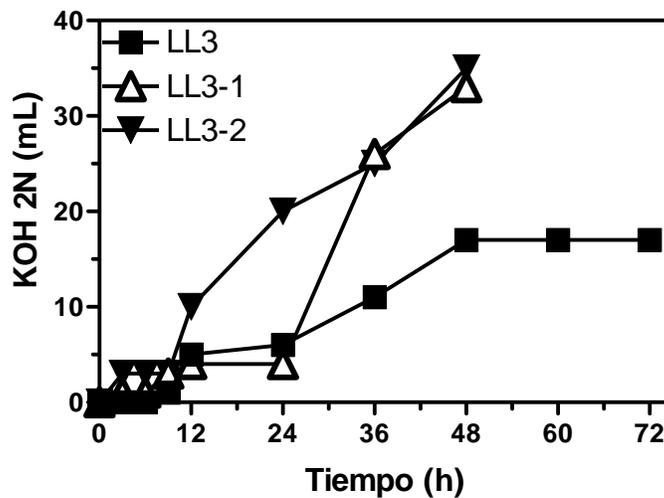


Figura 23. Consumo de KOH 2N con la cepa LL3 y sus derivadas en glucosa 40 g/L.

La selección de la cepa se considera un evento multifactorial, donde el factor ambiental es el medio mineral complementado con glucosa 40 g/L y el factor genético lo constituye la ingeniería metabólica realizada en la cepa a nivel cromosomal. La cepa seleccionada presenta una mejor velocidad de crecimiento y es capaz de conservarla. La evolución adaptativa, para mejorar la velocidad de crecimiento; constituye una estrategia que permite hacer una selección y a la vez enriquecer la población de una cepa en una determinada condición (Elena y Lenski 2003), en este caso se mejoró la velocidad de crecimiento de la cepa en medio mineral complementado con glucosa a 40 g/L. En otros trabajos, mediante la evolución adaptativa se ha logrado elucidar el mecanismo de la presión de selección, fundamentándose en los cambios ocurridos en la expresión de genes en un determinado ambiente, las mutaciones específicas que un microorganismo muestra resultan en mejoras fisiológicas en el crecimiento de la cepa, nivel de transcrito de una proteína, acumulación de un metabolito, etc. (Vijayendran et al; 2008).

El consumo de base es un indicador preciso del comportamiento de las cepas, su correlación con el crecimiento refleja la conversión eficiente de la glucosa, al ser transformada a piruvato a través de la glucólisis y convertido subsecuentemente a

lactato, regenerando así el NADH requerido para el crecimiento. Si este fenómeno no ocurriese, la cepa no crecería y por ende no habría consumo de base. Tanto la velocidad de crecimiento como el consumo de base fundamentaron la selección de la cepa LL2 para evaluarla en xilosa 40 g/L, ya que es una fuente con un potencial de uso aún sin explotar.

7.3 Evolución de la cepa LL2 en xilosa 40 g/L

La evolución adaptativa consistió en efectuar transferencias del cultivo cuando éste se encontraba en la fase exponencial, a un nuevo mini-fermentador (fleaker) con 40 g/L de la fuente de carbono en este caso xilosa. Para favorecer la selección de cepas que mejoran su velocidad de crecimiento, cada fermentación se inoculó iniciando a una densidad óptica de 0.01. Esta estrategia permitió obtener mutantes cuya capacidad para crecer en la fuente de carbono es creciente con respecto a su predecesora. La presencia de una mejora en la utilización de una fuente de carbono es atribuible a una ventaja adquirida por la bacteria en la cual la mutación resultante es aquella en la que la asimilación de la fuente de carbono es más eficiente y la cual mediante el proceso de selección se ha preservado (Elena y Lenski 2003).

Se pretendió alcanzar en la cepa LL2 un valor cercano a la velocidad de crecimiento de la cepa JU15 seleccionada mediante evolución adaptativa, la cual produce D-lactato con un μ de 0.40 h^{-1} , el máximo valor a alcanzar lo determina la velocidad de la cepa silvestre que es de 0.41 h^{-1} .

En el laboratorio se tiene como antecedente la evolución adaptativa de la cepa JU15 la cual fermenta 40 g/L de xilosa obteniéndose rendimientos del 95% de conversión a D-Lactato (Utrilla 2007). De la misma manera se buscó mejorar de manera simultánea la velocidad específica de crecimiento y la producción de lactato de la cepa LL2. También se han reportado cepas derivadas de *E.coli* K12 (FBR9, FBR10, Dien *et. al.*, 2001), *E. coli* RR1 (JP203, Chang *et. al.*, 1999), *E. coli* W3110 (SZ40, SZ58 y SZ63, Zhou *et. al.*, 2003), *E. coli* B (FBR11, Dien *et. al.*, 2001; SZ132, Zhou *et. al.*, 2006; TG107, Martínez *et. al.*, 2007) y *E. coli* YYC202 (ALS974,

Zhu *et. al.*, 2007); que son capaces de utilizar hexosas y/o pentosas para la producción de ácido láctico.

En las figuras 24 y 25 se presentan los resultados de la evolución adaptativa de la cepa LL2 en condiciones no aireadas en medio mineral y xilosa 40 g/L.

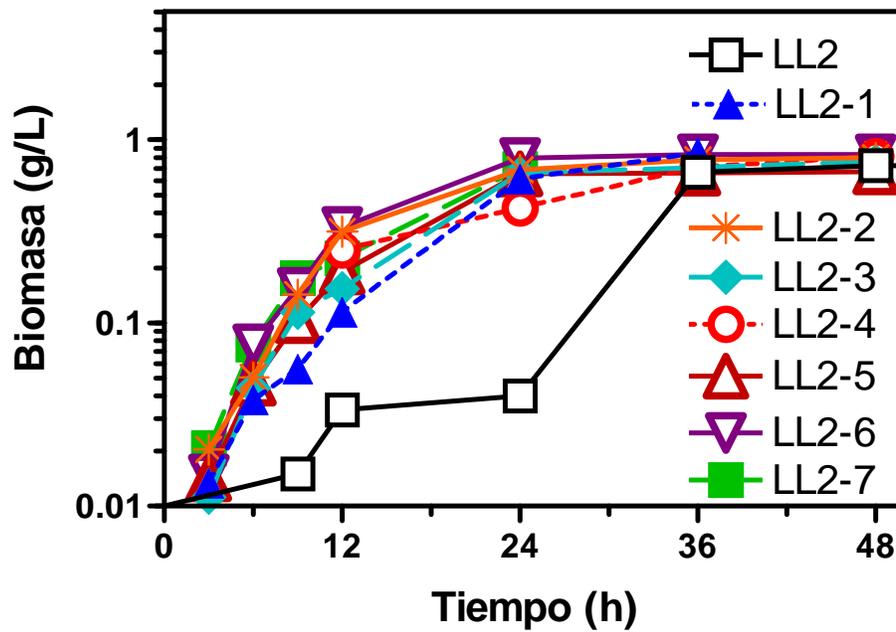


Figura 24. Crecimiento de la cepa LL2 (1-7) en cultivos de evolución adaptativa en xilosa 40 g/L.

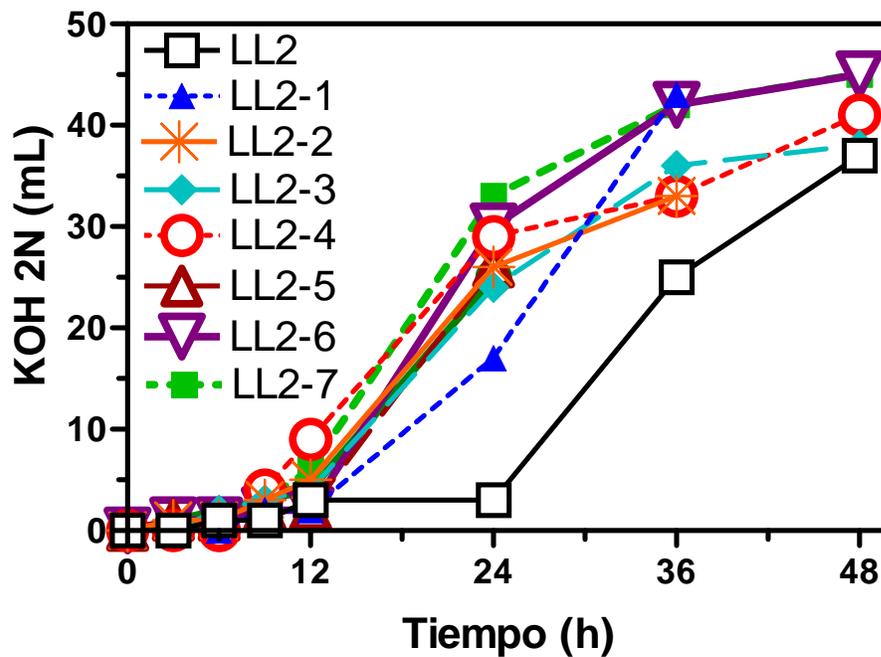


Figura 25. Consumo de KOH 2N de la cepa LL2 (1-7) en cultivos de evolución adaptativa en xilosa 40g/L

La cepa LL2 fue evolucionada en xilosa 40 g/L, empleándose como controles la cepa MG1655 y la cepa JU15 (ver más adelante), se requirieron 7 pases para obtener un comportamiento constante, es decir que ya no se mejora la capacidad para crecer y consumir base (Figuras 24 y 25). En este caso se seleccionó la cepa del sexto pase y se le denominó LL26 (LL2-6) debido a que fue la que generó la mayor velocidad de crecimiento y consumo de base, el genotipo conocido de LL26 es (*E. coli* MG 1655, $\Delta pf1B$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xy1FGH$, $\Delta ldhA::lctE$, Kn^R) y fue evolucionada para crecer y producir lactato primero en presencia de glucosa y después en xilosa, en ambos casos a 40 g/L.

Después de haber sido transferida en siete ocasiones y observando que el comportamiento entre el sexto y séptimo pase son el mismo, es evidente la mejora que experimentó la cepa LL26 en la evolución adaptativa en xilosa, pues finalmente logra alcanzar una biomasa de 0.33 g/L a las 12 h, en contraste con la cepa LL2 a la cual no había sido evolucionada y su valor de biomasa fue de 0.039 g/L, es decir

inferior en un orden de magnitud en el mismo intervalo de tiempo (Figura 24). De manera directa la correlación en el consumo de base se ve incrementada. El elevado consumo de KOH 2N que iniciaba a la hora 24 para la cepa LL2, se ha logrado reducir 12 h, iniciándose a partir de la hora 12 para la cepa LL26 (figura 25).

Ante estos resultados es posible afirmar que la generación exitosa de una cepa depende no sólo de la ingeniería de vías metabólicas sino también de otras estrategias, en este caso es a través de la evolución adaptativa, en la cual los mecanismos de selección son empleados a manera de transferencias sucesivas, como resultado, se logra enriquecer la población en las condiciones del medio que le permiten a la mutación adquirida prevalecer.

7.4 Comparación de la cepa evolucionada LL26 con sus progenitoras

Una vez obtenida la cepa mejorada mediante evolución adaptativa (LL26), se procedió a compararla con su antecesora y con la cepa silvestre, a fin de tener un control experimental adecuado. Se analizaron las cepas mediante: cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar y producción de lactato. Se caracterizaron las tres cepas en condiciones de fermentación de glucosa y xilosa en concentraciones de 40 y 80 g/L cada uno de las fuentes de carbono.

Las condiciones experimentales para las cinéticas de crecimiento fueron: cultivos no aireados en mini fermentadores de 250 mL, cuyo volumen de trabajo fue de 200 mL de medio mineral AM2 (Tabla 3) complementado con glucosa o xilosa en concentraciones de 40 y 80 g/L, agitación de 150 rpm, pH 7, 37°C. Las fermentaciones se iniciaron a una D.O. de 0.01 en el caso de las concentraciones de 40 g/L y de 0.10 en el caso de 80 g/L de fuente de carbono. Se siguió la cinética a intervalos de 3h durante las primeras 24 h y posteriormente cada 12 h hasta agotar la fuente de carbono. La duración de la cinética fue de 48 h en el caso de las fermentaciones de 40 g/L, y de 72 h para el caso de 80 g/L de sustrato. En cada

toma de muestra se registraron los valores de densidad óptica, pH y volumen de base adicionada, se centrifugó la muestra y se guardó sobrenadante para cuantificar L-lactato mediante el analizador enzimático YSI. Así mismo, cuando la densidad óptica fue cercana a 1.0 se guardó muestra para medir actividad enzimática de lactato deshidrogenasa en los extractos celulares de las tres cepas analizadas.

7.4.1. Comparación de parámetros cinéticos en medio AM2-glucosa (40 g/L)

La caracterización de la cepa LL26 se realizó en medio mineral AM2 complementado con glucosa 40 g/L. Los datos a partir de las fermentaciones (Tabla 7 y Figura 26) muestran que la cepa con la mayor velocidad de crecimiento y mayor cantidad de biomasa al término de la fase exponencial es la cepa silvestre. La cepa JU15 presenta una velocidad muy similar a la de la cepa silvestre 0.41 h^{-1} , mientras que LL26 lo hace a una velocidad menor, 0.29 h^{-1} lo cual representa el 70% del valor de MG1655. No obstante que las cepas MG1655 y JU15 presentan la misma velocidad en la condición de glucosa 40 g/L, la cantidad de biomasa generada por JU15 constituye el 60% de la silvestre, mientras que en el caso de la cepa LL26 con un 70% de la velocidad de MG1655 genera casi la mitad (46%) de la biomasa de la cepa silvestre.

En cuanto a la producción de lactato la cepa MG1655 tiene el menor rendimiento de conversión de glucosa tan sólo del 25%, esto es porque el lactato es uno más de los diversos productos de fermentación que genera la cepa. En contraste, las cepas JU15 y LL26 presentan un rendimiento del 95% del valor teórico máximo, generando D o L-lactato prácticamente como productos únicos, respectivamente. La producción de lactato ocurre mayoritariamente durante las primeras 24 horas, siendo a una menor velocidad para LL26, no obstante, aún con esta velocidad alcanza también el máximo valor de lactato que JU15 a las 48 h (Figura 26).

Los datos de glucosa residual en condiciones de fermentación con medio AM2 para cada una de las cepas analizadas (Figura 26) reflejan la mayor velocidad de

consumo volumétrico de glucosa para MG1655 y un patrón similar para las cepas JU15 y LL26. De la misma manera que en la producción de lactato, la glucosa es consumida a una velocidad superior durante las primeras horas de la fermentación, debido a que las células se encuentran en fase exponencial y es más elevado su consumo en este intervalo de tiempo, correlacionando así con la producción de lactato.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento y actividad de LDH de las cepas MG1655, JU15 y LL26 en fermentación de glucosa y xilosa 40 y 80 g/L.

Cepa	Azúcar	* μ (h ⁻¹)	*X (g/L)	Y _{LACTATO} (g _{LAC} /g _{Azúcar})	Q _P (g _{LAC} /Lh)	*Act Enz. (UI/mg _{prot})
MG1655	Glc 40 g/L	0.41	1.2	0.25	0.44	0.18
	Glc 80 g/L	0.23	0.88	0.16	0.26	0.42
	Xil 40 g/L	0.24	0.69	0.29	0.19	0.12
	Xil 80 g/L	0.18	0.86	0.12	0.07	0.34
JU15	Glc 40 g/L	0.40	0.72	0.95	1.6	0.29
	Glc 80 g/L	0.19	0.71	0.78	1.21	1.96
	Xil 40 g/L	0.24	0.48	0.95	1.3	0.25
	Xil 80 g/L	0.14	0.82	0.7	0.48	2.88
LL26	Glc 40 g/L	0.29	0.56	0.95	1.14	0.57
	Glc 80 g/L	0.16	0.66	0.79	1.33	2.88
	Xil 40 g/L	0.18	0.20	0.95	1.23	0.35
	Xil 80 g/L	0.12	0.66	0.69	0.42	3.95

*Datos obtenidos a partir de la fase exponencial. μ es la velocidad específica de crecimiento; Y es el rendimiento de lactato por azúcar consumido; Q_P es la productividad volumétrica a las 24 horas de los cultivos.

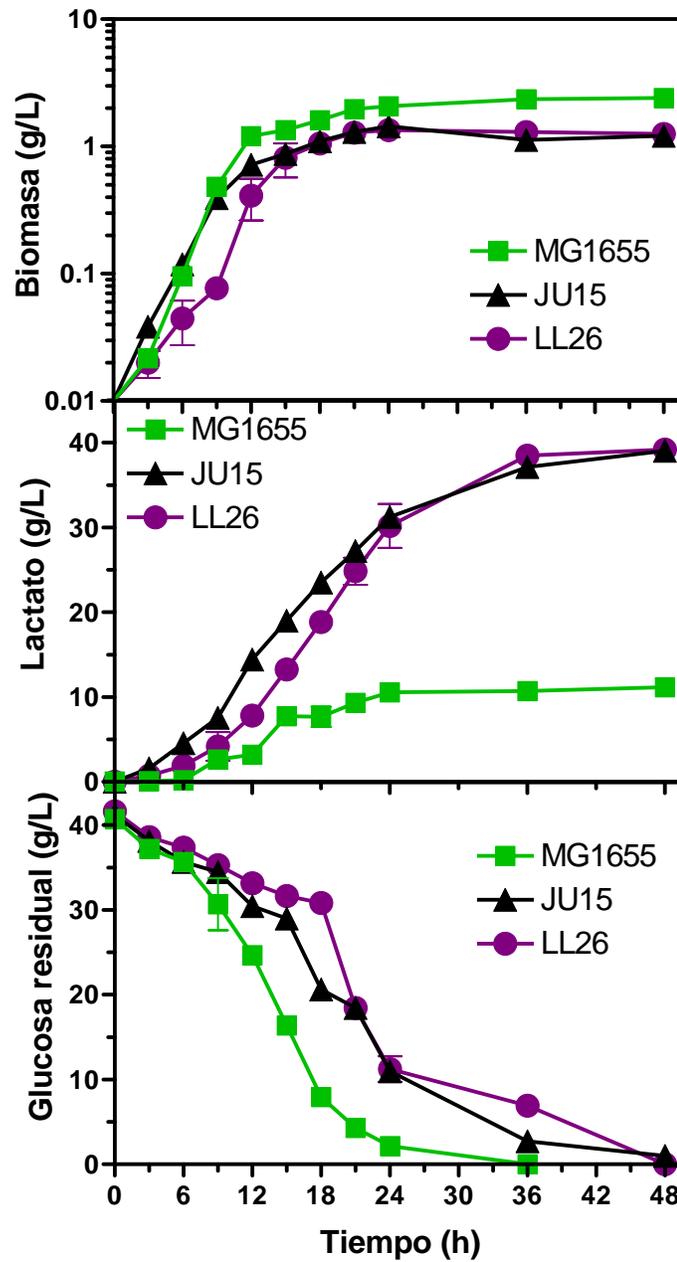


Figura 26. Comparación del crecimiento, producción de lactato y glucosa residual en fermentación de glucosa (40 g/L) de las cepas MG1655, JU15 y LL26.

7.4.1.1 Cuantificación de los productos de fermentación en cultivos con glucosa (40 g/L) mediante HPLC

Con la finalidad de verificar que el flujo de carbono se está canalizando principalmente hacia la producción de L-Lactato en la cepa LL26, se caracterizaron mediante HPLC sus productos de fermentación, se empleó como control experimental los productos de las cepas progenitoras: MG1655 y JU15 los resultados se muestran en la figura 27.

La cepa silvestre distribuye el flujo glucolítico en diversos productos de fermentación, mientras que en el caso de las cepas JU5 y LL26 se espera como producto mayoritario el lactato: el isómero D para la cepa JU15 y el isómero L para el caso de la cepa LL26 y una proporción mínima de acetato para ambas cepas.

Los resultados para la fermentación de 40 g/L de glucosa de las cepas MG1655, JU15 y LL26 se muestran en la figura 27. En el caso de MG1655 se esperan en orden decreciente (unidades: mmol de producto/mmol de glucosa) lactato 39.75, etanol 16.6, dióxido de carbono 14.67, acetato 12.17, succinato 7.14 y formato 0.40 (Böck A. y Sawers 1996); lo cual expresado en g/L es lactato 10, etanol 4.4, acetato 12, succinato 1.8 y formato 0.60. Como es de esperarse, en el caso de MG1655 se muestran los ácidos orgánicos y el etanol cuyas concentraciones coinciden con lo reportado, en concentraciones de mmol de producto/mmol de glucosa: lactato 38, etanol 15.7, acetato 12, la glucosa y el piruvato son agotados (Figura 27 A).

En lo referente a las cepas JU15 y LL26 se detectó como otro producto de fermentación de glucosa el acetato, cuya concentración es de 0.8 y 0.7 mmoles de acetato/mmol de glucosa, equivalente a 0.78 y 0.69 g/L de acetato, respectivamente. Esto confirma que el flujo de carbono se canaliza hacia la formación de lactato, obteniéndose en términos prácticos cepas homolácticas, ya que a excepción del lactato y acetato, no se detecta ningún otro producto de fermentación (Figuras 27 B y 27 C). La presencia del acetato está asociada al

crecimiento. En el caso de JU15 se ha determinado al finalizar la fermentación de glucosa, una concentración máxima de 1 mmol de acetato/mmol de glucosa (Utrilla 2007), por lo que en el caso de la cepa LL26 se esperaba una concentración de acetato semejante a la de la cepa JU15, datos verificados en las figuras 27 B y 27 C.

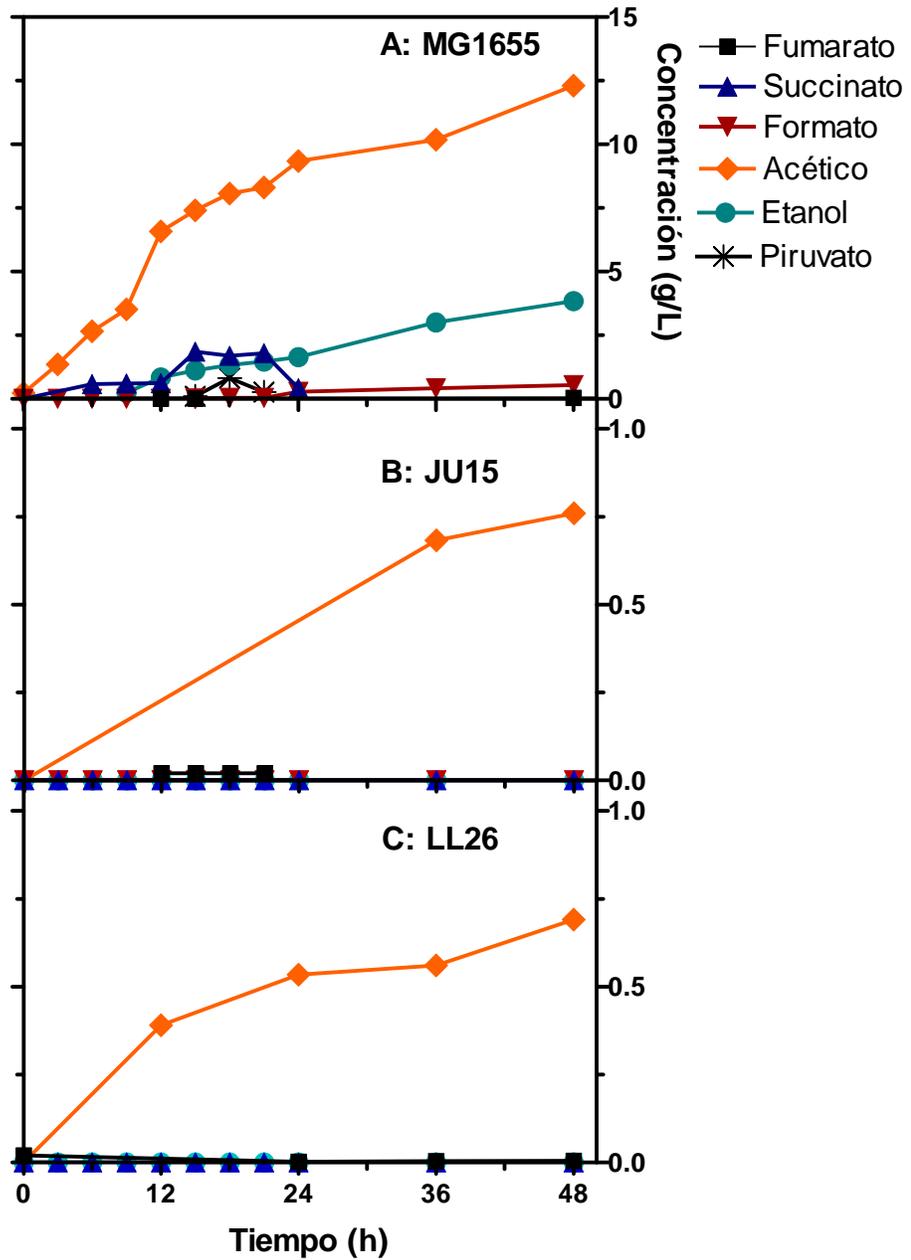


Figura 27. Productos obtenidos de la fermentación de glucosa (40 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26.

7.4.1.2 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con glucosa (40 g/L)

Como se presenta en la Tabla 7, el valor de actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) se incrementó 1.5 veces en JU15 respecto al valor de la cepa silvestre. La cepa JU15 presentó un productividad volumétrica de D-lactato 3.6 veces mayor que la cepa silvestre (Tabla 7). En el caso de la cepa LL26 el valor de actividad de L-LDH fue 3.2 veces superior al de D-LDH de MG1655, con un incremento 2.6 veces en la productividad volumétrica de lactato (Tabla 7). Como ya se discutió, este comportamiento se debe a las modificaciones que se realizaron en JU15, pero el resultado de actividad parece indicar que en respuesta a los ajustes de expresión genética se incrementa la cantidad de LDH presente en las células, y se ajusta a la velocidad con que se regenera el NAD^+ en una y otra cepa. En el caso de la cepa LL26 las propiedades intrínsecas de la enzima heteróloga (cuya afinidad por el piruvato es un orden de magnitud y la eficiencia catalítica dos órdenes de magnitud mayor para la L-LDH que la D-LDH nativa de *E.coli* (Tabla 3)), podrían estar favoreciendo este incremento en la productividad. Este fenómeno se discute en mayor detalle más adelante.

7.4.2 Comparación de parámetros cinéticos en medio AM2-xilosa 40 g/L

La finalidad de generar cepas eficientes en la conversión de xilosa en lactato, reside en aprovechar esta pentosa como alternativa viable para competir con la tecnología actual de producción de plásticos, se prevé reducir los costos si se emplean sustratos alternativos como lo son los residuos agroindustriales. (Yun et al; 2003). Esta pentosa representa al componente mayoritario de la fracción hemicelulósica contenida en estos residuos, representa un 75% de la composición total. (Saha 2003, Martínez et al; 2000).

Se llevó a cabo la caracterización de la cepa LL26 en condiciones de fermentación en presencia de xilosa 40 g/L, el comportamiento se observa en la figura 28 y es muy similar al antes visto en glucosa 40 g/L (Figura 26 y Tabla 7). Las cepas MG1655 y JU15 crecen prácticamente a la misma velocidad, por otro lado, la cepa LL26 (Figura 28) representa un 70% de la velocidad de MG1655 (Tabla 7). Finalmente en las últimas 24 horas de la fermentación, la cepa LL26 alcanza la misma concentración de producto que la JU15. Al igual que en la fermentación de glucosa en concentración de 40 g/L (Figura 26), la biomasa alcanzada por las cepas JU15 y LL26 en xilosa 40 g/L constituye la mitad de la producida por MG1655 (Figura 28).

La reducción de la formación de biomasa con las cepas D y L-lactogénicas puede atribuirse a la inactivación del gen que codifica para la piruvato formato liasa, ya que esta interrupción limita drásticamente la formación de Acetil-CoA a partir de piruvato y por ende se reduce la formación de biomasa (Zhu y Shimuzu; 2004).

De la misma manera que en la fermentación en glucosa, la producción de lactato está asociada al crecimiento, la velocidad de producción volumétrica de lactato de JU15 es superior a la de LL26 como se ve en la figura 28. El máximo valor de lactato alcanzado por la cepa silvestre es de 12 g/L mientras que las cepas JU15 y LL26 alcanzan 38 g/L lo que constituye el 95 % de rendimiento teórico máximo de

lactato (Figura 28 y Tabla 7) y es el mismo valor alcanzado en la fermentación en glucosa. La mayor producción de lactato ocurre de la hora 12 a la hora 36 tanto para JU15 como para LL26 y es minoritaria la producción de la cepa MG1655 (Figura 28). Debido a que la fermentación ocurre en un intervalo de tiempo mayor respecto al de glucosa, en consecuencia la mayor producción de lactato en el medio AM2 complementado con xilosa 40 g/L dura 12 horas más. Se encuentran asociadas la velocidad de producción de lactato y la velocidad de consumo de xilosa, los valores de xilosa residual para las cepas analizadas MG1655, JU15 y LL26 (Figura 28).

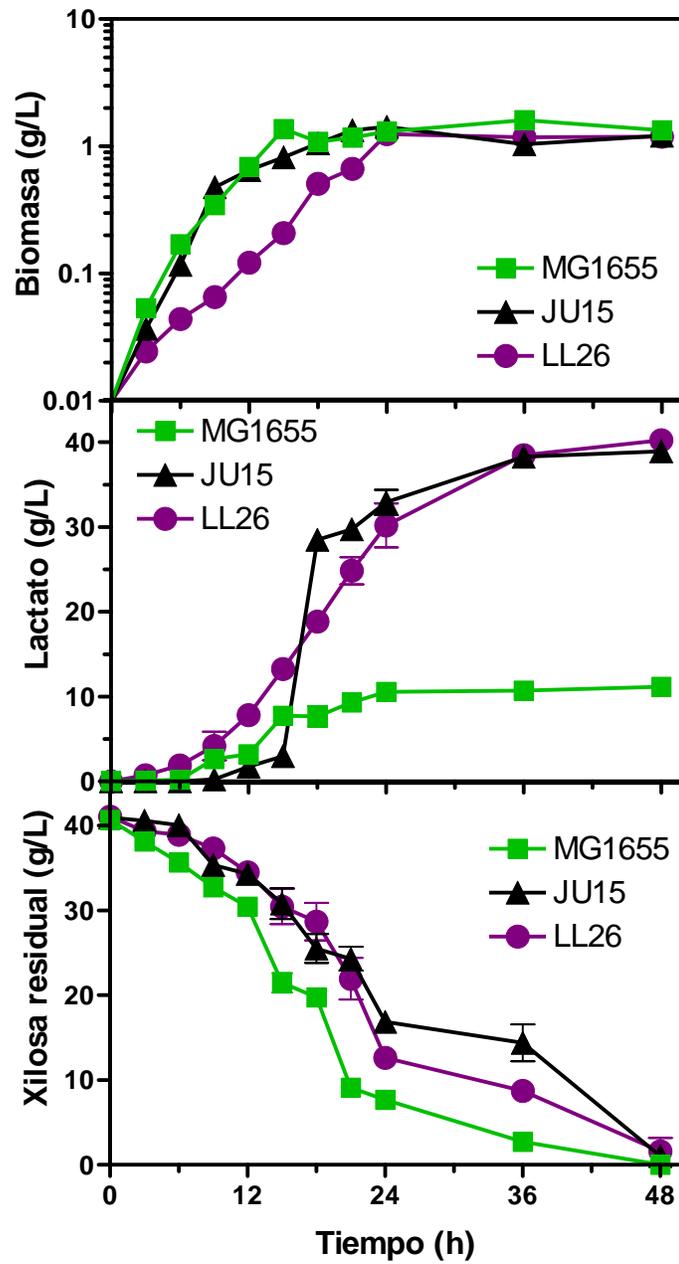


Figura 28. Comparación del crecimiento, producción de lactato y xilosa residual en fermentación de xilosa (40 g/L) de las cepas MG1655, JU15 y LL26.

La xilosa es consumida a una velocidad mayor durante el crecimiento y posteriormente disminuye; hasta agotarse a las 48 horas en todos los casos. A diferencia de las fermentaciones en glucosa 40 g/L la xilosa es agotada en 48 horas, un intervalo de tiempo de 12 horas mayor; al ordenar las cepas de manera decreciente de acuerdo a su consumo de xilosa se tiene un comportamiento como el antes visto en glucosa (Figura 26) el primer lugar lo ocupa la cepa MG1655, seguida de JU15 y por último LL26, (Figura 28).

7.4.2.1 Evaluación de la fuente de carbono xilosa en concentración de 40 g/L

Estudios de producción biotecnológica de ácido láctico emplean cepas capaces de convertir hexosas y/o pentosas en ácido láctico con distintas cepas derivadas de: *E. coli* K12 (FBR9, FBR10, Dien *et. al.*, 2001), de *E. coli* RR1 (JP203, Chang *et. al.*, 1999), de *E. coli* W3110 (SZ40, SZ58 y SZ63, Zhou *et. al.*, 2003), de *E. coli* B (FBR11, Dien *et. al.*, 2001; SZ132, Zhou *et. al.*, 2006; y de *E. coli* YYC202 (ALS974, Zhu *et. al.*, 2007) de tal forma que para evaluar la capacidad de la cepa LL26 y poder comparar los parámetros cinéticos, se llevó a cabo su caracterización en xilosa.

Al cambiar la glucosa por xilosa, se presenta una disminución del 40% de las velocidades específicas de crecimiento en las tres cepas evaluadas (Tabla 7). Se asume que el principal transportador de xilosa en las cepas JU15 y LL26 es el transportador de xilosa *XylE* pues se ha interrumpido *XyIFGH* por el requerimiento energético de un ATP que implica su uso y como resultado no se ve drásticamente disminuida la velocidad específica de crecimiento. Es claro que la fuente de carbono al cambiar la hexosa por la pentosa en concentración de 40 g/L, no incide en la producción de ácido láctico pues ambas fuentes de carbono se agotaron a las 48 h de fermentación y se mantiene constante el rendimiento de 95% (Tabla 7).

La velocidad de formación de lactato de JU15 es superior respecto de la detectada en LL26 para ambas fuentes de carbono, sin embargo, aún con esta velocidad, la cepa LL26 alcanzó al igual que JU15, los máximos valores de producción de lactato en dichas fuentes de carbono cuando llega a las 48 horas (Figuras 27 y 29).

7.4.2.2 Cuantificación de los productos de fermentación en cultivos con xilosa (40 g/L) mediante HPLC

Se cuantificaron los productos de fermentación a partir de xilosa, con el fin de cerciorar que el flujo metabólico se dirige a la generación de lactato en las cepas homolácticas JU15 y LL26. Se analizaron todos los productos de fermentación de estas cepas, y se compararon con los de la cepa silvestre MG1655 en condiciones de fermentación en medio mineral complementado con xilosa 40 g/L. (Figura 29).

Para el caso de JU15 y LL26, (Figuras 29 B y 29 C) se observa que el producto mayoritario es el lactato, se detectaron trazas de otros productos de fermentación que son inferiores a 1 g/L como lo es el caso del acetato; es importante destacar que el acetato está asociado al crecimiento y es el único producto detectado en estas cepas. (Hasona et al; 2004).

La baja cantidad de acetato (0.5 g/L) producido por la cepa LL26 en la fermentación de xilosa, (Figura 29) representa una ventaja en la generación de ácido láctico, pues a diferencia del grupo de bacterias ácido lácticas fermentadoras de xilosa, de entre las cuales se ha identificado un amplio número de lactobacilos y lactococos (Collins et al; 1984); éstas bacterias son heterofermentativas y producen una cantidad equimolar de ácido láctico y ácido acético con un rendimiento de ácido láctico del 60% en peso del consumo de xilosa, en contraste, la cepa LL26 produce ácido láctico con un rendimiento del 95% (Tabla 7).

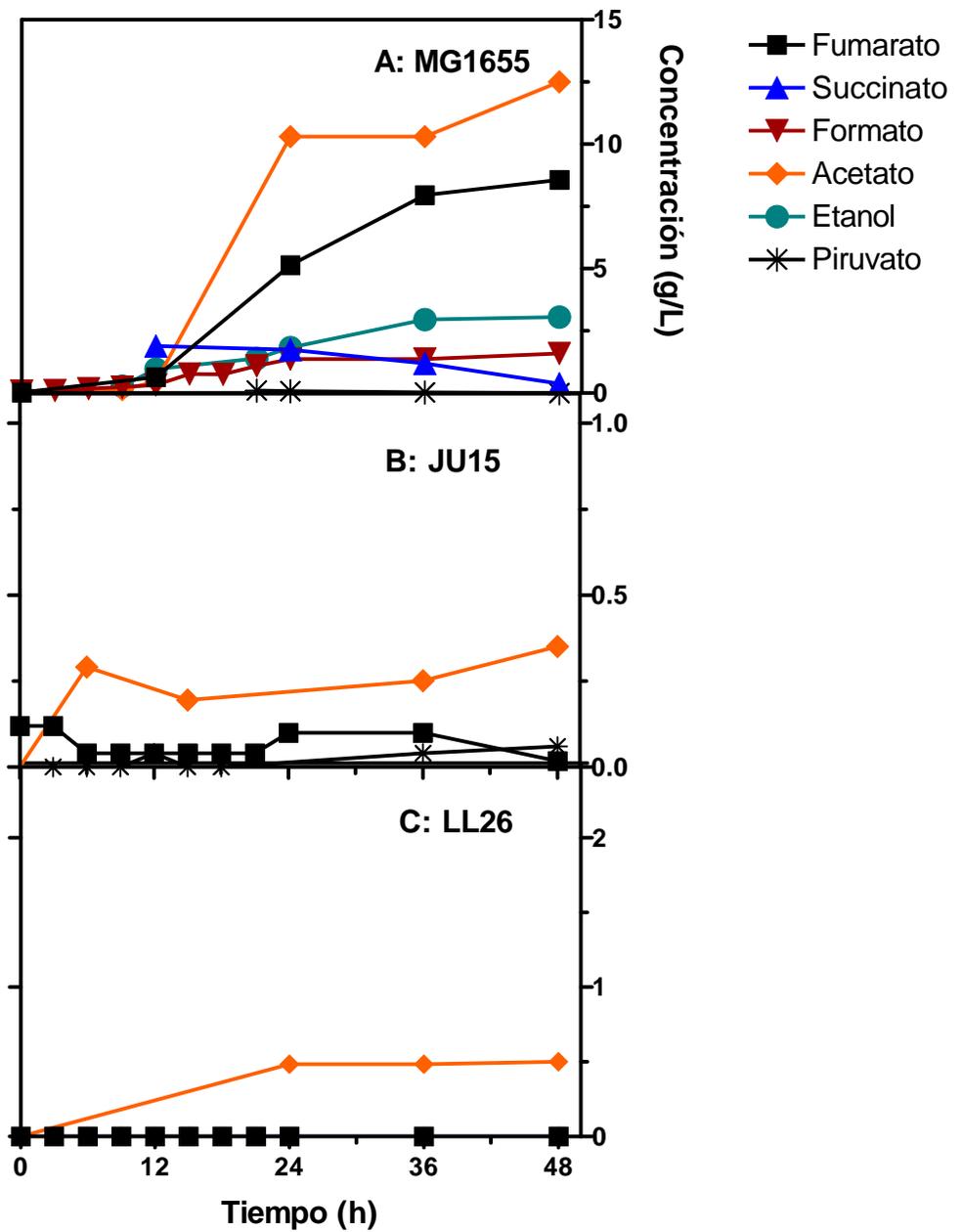


Figura 29. Productos obtenidos de la fermentación de xilosa (40 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26.

Por otro lado, en el caso del lactobacilo *Enterococcus casseliflavus* en condiciones de fermentación en medio rico (MRS) suplementado con 50 g/L de xilosa, produce 38 g/L de L-lactato y 6.5 g/L de acetato (Taniguchi et al; 2004). De la misma manera que en las bacterias ácido lácticas fermentadoras de xilosa, la cepa LL26 muestra superioridad ante la cepa de *E. casseliflavus* puesto que el rendimiento de lactato a partir de xilosa es superior: 95% para LL26 y 76% para el lactobacilo; adicionalmente la concentración de acetato producida por la cepa LL26 representa tan sólo el 2.5% de la fuente de carbono empleada mientras que en el caso del lactobacilo esta es de 13%. Este dato demuestra que *E. coli* LL26 es una alternativa en la producción de L-lactato con la ventaja de emplear condiciones y medios de cultivo simples. Con base en los resultados obtenidos de las fermentaciones en medio mineral complementado con glucosa y/o xilosa en concentraciones de 40 g/L, cuyo principal producto de fermentación obtenido es el ácido láctico, es posible sugerir que la cepa LL26 es prácticamente homoláctica. El poco acetato producido está asociado al crecimiento, (Hasona et al; 2004), esto representa ventajas no sólo en el rendimiento, pues el uso de la cepa LL26, facilitará subsecuentes etapas de la purificación del lactato.

7.4.2.3 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con xilosa (40 g/L)

En lo que se refiere a las actividades de LDH en las fermentaciones de xilosa 40 g/L los resultados muestran que el valor de actividad D-LDH de JU15 es 2 veces superior al de MG1655, mientras que el valor de actividad de L-LDH de la cepa LL26 es 3 veces el valor de la silvestre, (Tabla 7). La productividad volumétrica de las cepas JU 15 y LL26 es prácticamente la misma cuyos valores son de 6.8 y 6.6 veces el valor de productividad de MG1655.

7.4.3 Comparación de parámetros cinéticos en medio AM2-glucosa 80 g/L

Con el propósito de comparar el comportamiento de la cepa LL26 en mayores concentraciones de los azúcares evaluados, se analizó el efecto de incrementar la concentración de glucosa a 80 g/L. Los resultados de biomasa, producción de lactato y glucosa residual en condiciones de fermentación de medio mineral complementado con glucosa 80 g/L, para las tres cepas, se muestran en la figura 30 y en la Tabla 7.

Al analizar la fermentación de glucosa en concentración de 80 g/L se observa que la cepa MG1655 es la que exhibe una mayor velocidad específica de crecimiento, la velocidad de JU15 es un 17% inferior a la de MG1655, la cantidad de biomasa corresponde al 80% de la producida por la cepa silvestre; en el caso de la cepa LL26, los datos son velocidad 30% inferior y la biomasa obtenida es equivalente al 75% de la mostrada por la cepa silvestre (Tabla 7). La fermentación se monitoreó por 72 horas y el valor máximo de biomasa alcanzado, durante la fase estacionaria, es muy similar en las tres cepas: 3 g/L. En lo referente al rendimiento, es casi del 80% en ambas cepas JU15 y LL26. Los datos demuestran que para ambas condiciones de fermentación de 40 y 80 g/L de glucosa, la cepa LL26 relativamente mantuvo constante el comportamiento de velocidades de crecimiento, esto es el 70% de la velocidad de MG1655 (Tabla 7).

Al evaluar el efecto de la concentración de glucosa 80 g/L se observa una disminución de hasta un 50% del valor de la velocidad específica de crecimiento para las tres cepas analizadas. Los datos obtenidos en las fermentaciones en concentraciones de sustrato de 80 g/L reflejan el efecto directo de la presión osmótica en el rendimiento, la eficiencia de la conversión disminuye en un 18% para JU15 y un 17% para LL26 en glucosa (Tabla 7).

La presión osmótica es una propiedad coligativa de una solución, se define como la presión que detiene la ósmosis, es decir la presión que se requiere para evitar que un soluto fluya libremente hacia dentro de la célula cuando este se encuentra en mayor concentración en el medio cultivo. Depende de la concentración de iones en sí pero no de la identidad del soluto.

Los microorganismos se han clasificado en función del valor de la actividad acuosa, (a_w) se define como la presencia de agua, en forma disponible para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas. A medida que una solución se concentra, la presión de vapor disminuye y la actividad acuosa desciende a partir de un valor máximo de 1 para el agua pura (en ausencia de capilares y fuerzas de adsorción). El menor valor de tolerancia de a_w para cualquier microorganismo es de 0.62. Sin embargo, si el soluto no es tóxico, no importa si es de naturaleza iónica o no iónica, se mantiene constante el valor mínimo tolerable. En la clasificación de las bacterias no halófilas, *E.coli* se ubica en la media del rango de tolerancia de baja a_w , siendo más tolerante que *B.subtilis*. (Kushner., 1978).

El valor de presión osmótica en el medio mineral AM2 complementado con glucosa 80 g/L es de 1.14 MPa equivalente a 0.44 osM, representa el doble de la presión osmótica del medio en glucosa 40 g/L cuyo valor es de 0.57 MPa para 0.222 osM de soluto. Estos valores se determinaron a partir de la expresión matemática de la presión osmótica (π), que asemeja la forma de la ecuación del estado de un gas ideal:

$$\pi=nRT$$

Donde **n** es el número de moles del soluto en la solución por unidad de volumen, **R** es la constante de los gases y **T** es la temperatura absoluta.(Castellan 1996)

En el caso de la fermentación en glucosa 80 g/L, el efecto de la presión osmótica se presentó sólo durante la segunda mitad de la fermentación, pues durante las primeras horas el comportamiento visto es muy similar a la fermentación de 40 g/L

de glucosa. Se observó a las 48 h una producción de lactato de 52 g/L para ambas cepas lactogénicas. Es importante mencionar que conforme va avanzando la fermentación, se está incrementando la concentración de lactato con lo que contribuye también a la presión osmótica.

La presión de turgencia de *E.coli* (presión óptima para el crecimiento) es alrededor de 0.3 MPa, por lo que cuando crece en medios mínimos con osmolaridad alta; la concentración en el citoplasma de los solutos K^+ , glutamato y trehalosa se incrementa linealmente con la finalidad de mantener la presión de turgencia (Munro et al., 1972), mientras que la fuerza iónica es reducida al intercambiar K^+ por putrecina (Prince et al., 1990). Estos ajustes permiten el crecimiento en un medio cuya presión osmótica es de al menos 2 osM. Sin embargo, la tolerancia a una mayor presión externa es incrementada al hacer uso de osmoprotectores. En las condiciones de cultivo se empleó betaína como osmoprotector pues es uno de los más efectivos, su acumulación en el citoplasma reduce la concentración de K^+ y glutamato, esto se refleja en una mejora en la velocidad de crecimiento, así mismo reduce la acumulación de trehalosa y otros solutos iónicos.

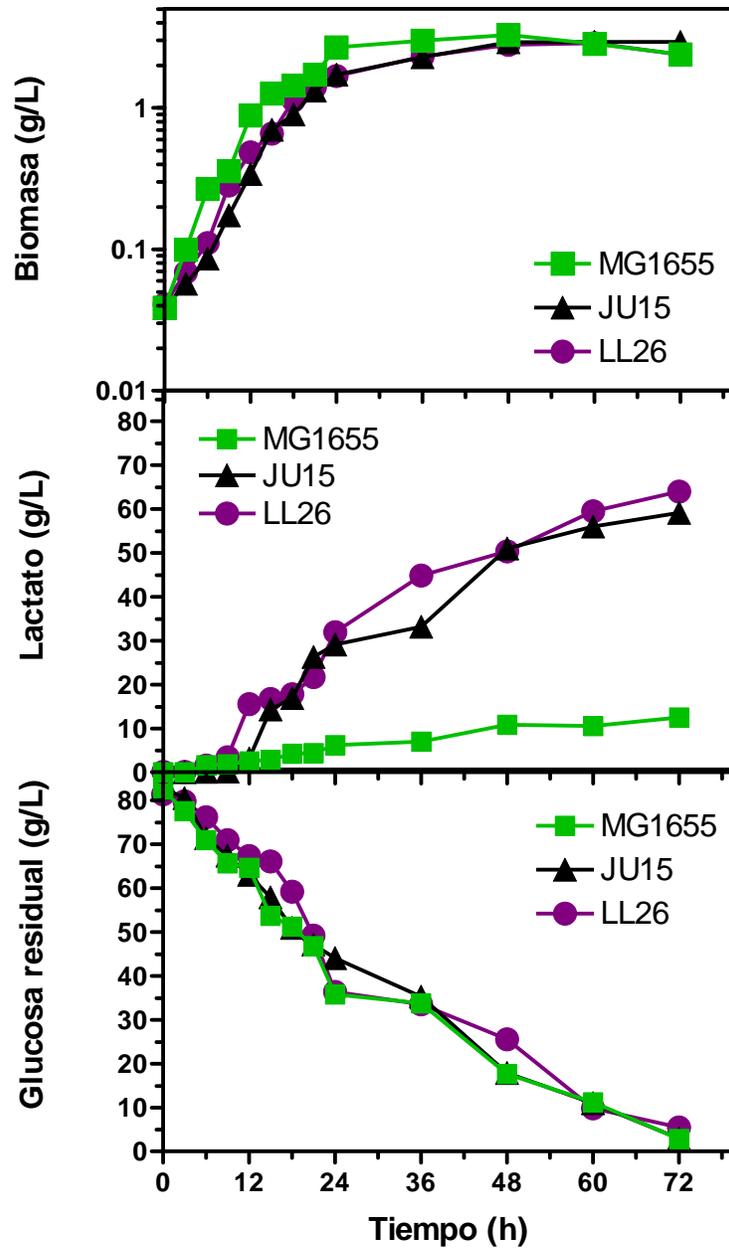


Figura 30. Comparación del crecimiento, producción de lactato y glucosa residual en fermentación de glucosa (80 g/L) de las cepas MG1655, JU15 y LL26.

En lo referente a la producción de lactato se empleó KOH 4N, para evitar una excesiva tasa de dilución. La cepa con mayor producción de lactato (con ello mayor consumo de KOH 4N) fue la cepa LL26, seguida por JU15, y por último la silvestre, dado que esta última otros productos de fermentación mayoritarios, a diferencia de las cepas que generan casi de forma exclusivamente lactato. En cuanto a la producción de lactato, las cepas LL26 y JU15 muestran el mismo comportamiento y alcanzan valores muy similares de lactato: 64.0 y 59.1 g/L, respectivamente, con rendimientos similares de conversión de glucosa en lactato, lo cual constituye un incremento de 5 veces la producción de lactato de MG1655, que sólo llega al máximo de 12 g/L (Figura 30).

La mayor velocidad volumétrica de consumo de glucosa (Figura 30) se presentó durante la etapa de crecimiento (0 a 24 h), una vez disminuida esta velocidad, decrece la velocidad de consumo de glucosa y también la de producción de lactato. La glucosa residual fue de casi 3 g/L para las cepas JU15 y MG1655 por el contrario en la cepa LL26, fue de 5.5 g/L. (Figura 30).

7.4.3.1 Cuantificación de los productos de fermentación en cultivos con glucosa (80 g/L) mediante HPLC

Como se observa en la figura 31, la cepa MG1655 presentó la amplia gama de productos de fermentación siendo los mayoritarios el acético y láctico en concentraciones de 11 y 15 g/L, el etanol en 6 g/L. En el caso de las cepas JU15 y LL26 se observó una pequeña formación de formiato y 1.2 y 1.8 g/L de acetato respectivamente (Figura 31 B y 31 C).

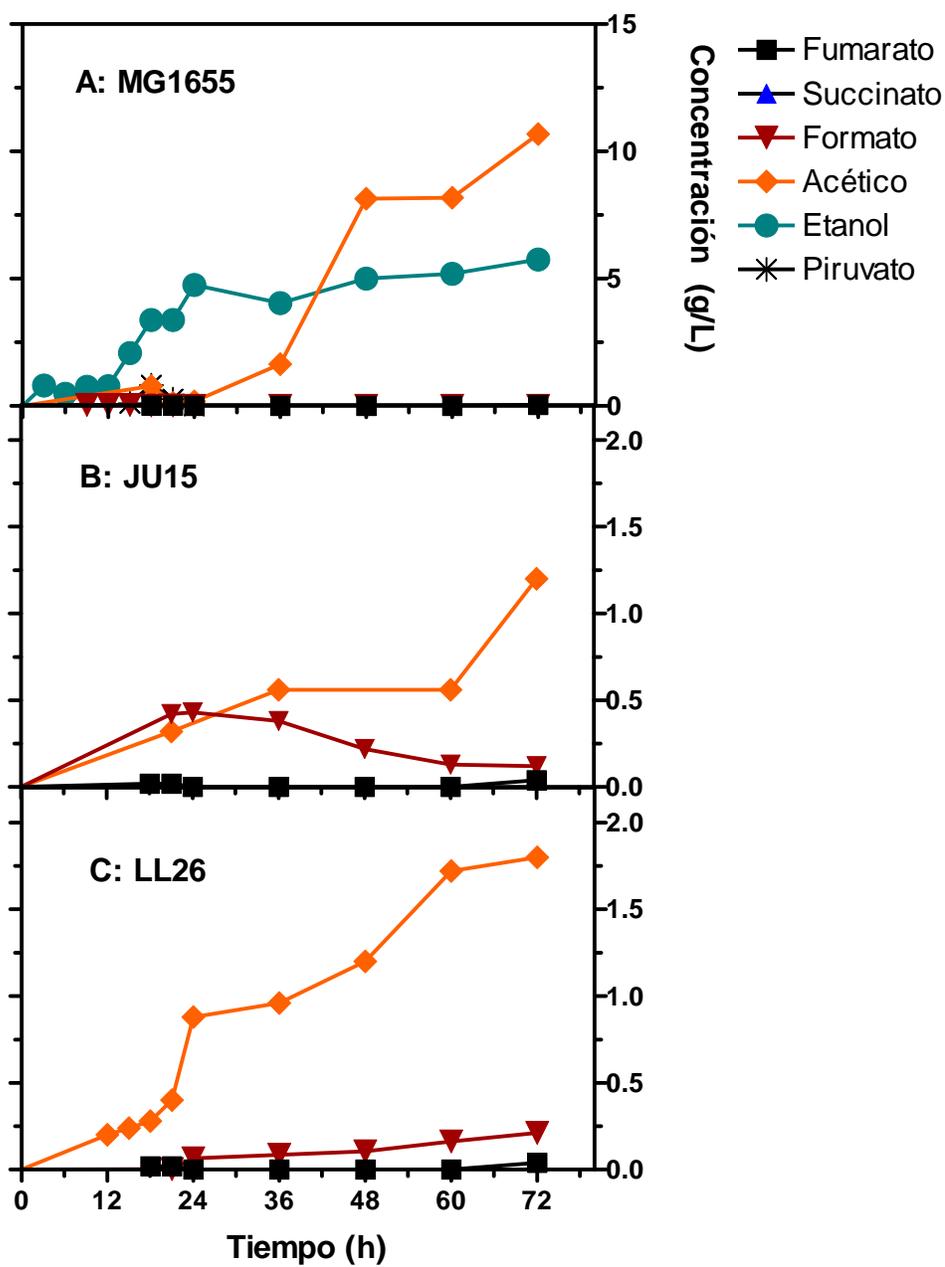


Figura 31. Productos obtenidos de la fermentación de glucosa (80 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26.

7.4.3.2 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con glucosa (80 g/L)

Los datos de la Tabla 7 muestran la tendencia antes vista, es decir el mayor valor de actividad fue en la actividad L-LDH de la cepa LL26, constituye 7 veces el valor de D-LDH de MG1655. El valor de actividad D-LDH de JU15 es 4.6 veces superior al de MG1655. Por otro lado, aún con esta diferencia en la actividad LDH, los valores de productividad volumétrica de las cepas LL26 y JU15 es prácticamente el mismo 5.3 y 5.5 veces el valor de productividad de MG1655.

7.4.4 Comparación de parámetros cinéticos en medio AM2-xilosa 80 g/L

La evaluación con 80 g/L de xilosa muestra que la cepa silvestre presenta la mayor velocidad de crecimiento, en este caso JU15 es 0.7 veces el valor de velocidad de MG1655 mientras que LL26 lo es 0.6 veces (Tabla 7). La fase exponencial abarca hasta la hora 24 de fermentación, todas las cepas alcanzan la misma biomasa (aproximadamente 2 g/L: Figura 32). Se observa que el máximo valor de lactato alcanzado por la cepa MG1655 es de 5 g/L mientras que las cepas JU15 y LL26 generan 52 y 50 g/L respectivamente, lo que constituye 10 veces el valor de lactato producido por MG1655 (Figura 32).

El comportamiento visto en respuesta al incremento en la concentración de xilosa 80 g/L, consistió en un decremento en las velocidades específicas de crecimiento, probablemente como consecuencia de la presión osmótica; las velocidades presentan una baja del 40 y 33% para JU15 y LL26 respectivamente. El valor de presión osmótica en medio mineral complementado con xilosa en concentración de 80 g/L es de 1.4 MPa para 0.533 osM de xilosa, lo cual representa el doble de la presión ejercida en el medio en xilosa 40 g/L, cuyo valor es de 0.69 MPa para 0.266 osM de xilosa. Si bien se presentó una disminución en este parámetro, éste no fue

tan drásticamente como en el caso de glucosa 80 g/L la cual implicó una disminución del 50% en las todas las cepas. Probablemente los cambios que se presentaron durante la evolución en xilosa tengan que ver con este comportamiento.

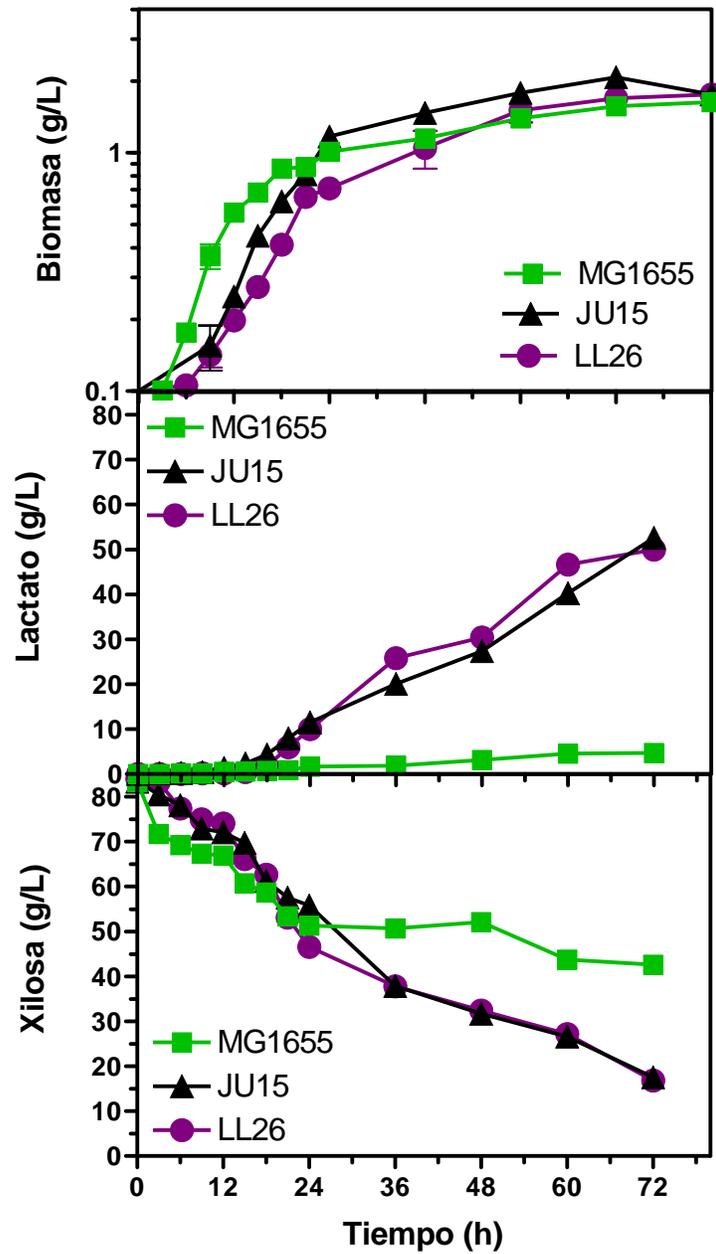


Figura 32. Comparación del crecimiento, producción de lactato y xilosa residual en fermentación de xilosa 80 g/L de las cepas MG1655, JU15 y LL26.

Por otro lado, el efecto en la reducción del rendimiento fue mayor que en la fermentación en glucosa a 80 g/L; en comparación con xilosa a 40 g/L este valor disminuyó un 26% y 30% para JU15 y LL26, respectivamente al duplicar la concentración de la pentosa. Dicho comportamiento puede atribuirse al menor rendimiento energético que se obtiene con este azúcar, lo cual genera una menor cantidad de biomasa (en la condición de la xilosa se generan dos tercios de la biomasa con glucosa a 80 g/L), y como la producción de lactato es asociada al crecimiento, la producción volumétrica se reduce y se obtiene menos producto a las 72 h.

La xilosa residual en la cepa MG1655 presentó el valor más alto de 42 g/L de pentosa a las 72 h(Figura 32), por el contrario; en el caso de las cepas JU15 y LL26 fu de tan sólo de 17 g/L al mismo tiempo. El consumo de xilosa correlaciona con el crecimiento durante la fase exponencial y cuando disminuye la velocidad específica de crecimiento también disminuye el consumo de xilosa.

7.4.4.1 Cuantificación de productos de fermentación de xilosa (80 g/L) mediante HPLC

La cuantificación de productos de fermentación muestra que para la cepa MG1655 (Figura 33 A) los productos generados en orden decreciente fueron: acético 9 g/L, etanol 6 g/L, D-lactato 5 g/L, formato 1 g/L y succinato 0.5 g/L. En el caso de la cepa JU15 (Figura 33 B) se detectó como co-producto la presencia de 4.2 g/L acetato, lo cual representa prácticamente la mitad de la concentración de acetato producida por la cepa silvestre. De la misma manera que la cepa JU15, en la cepa LL26 se detectó únicamente la presencia del acetato, pero tan sólo se produjeron 2 g/L (Figura 33 C) lo cual es un 22% de la cantidad de acetato producido por MG1655 (Figura 33 A).

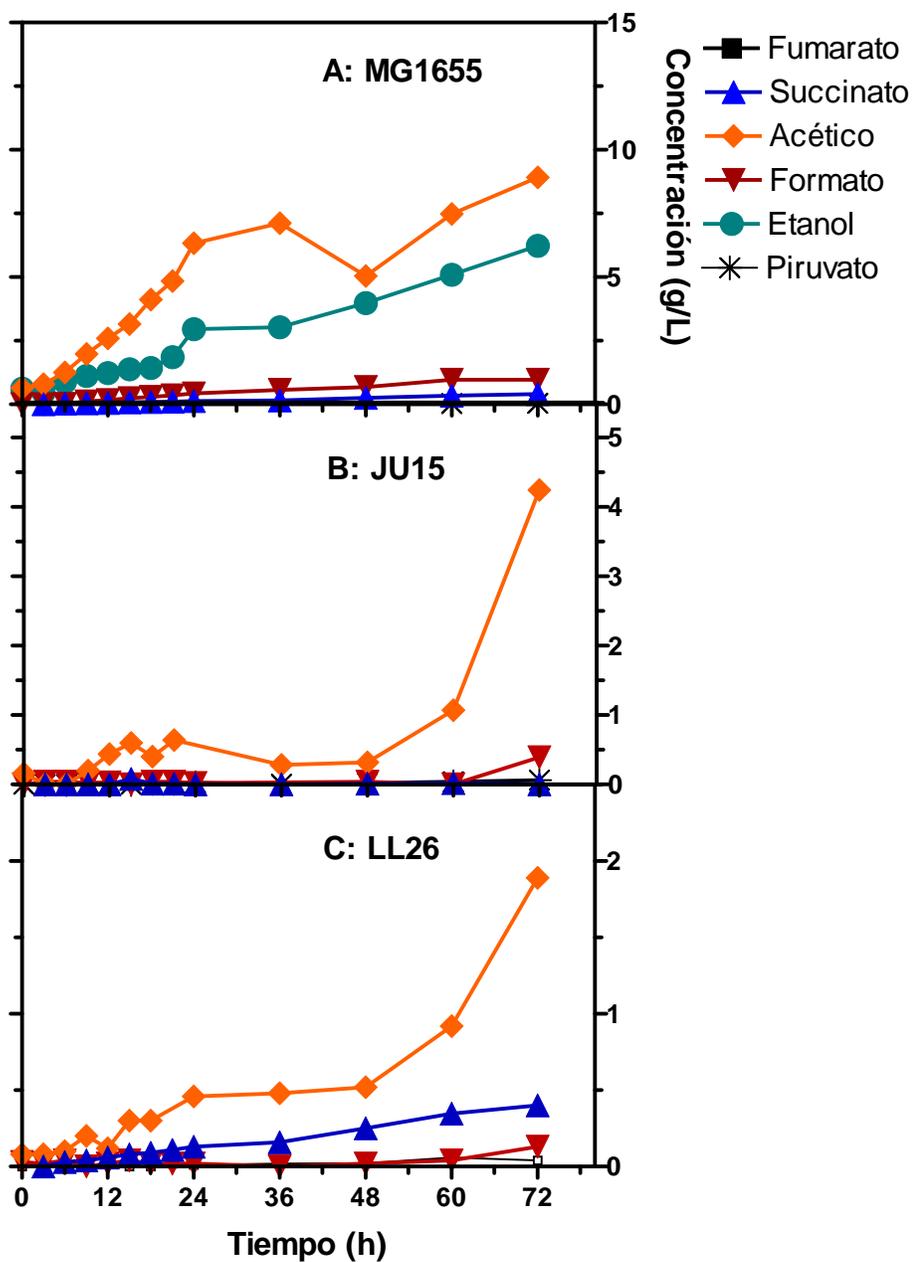


Figura 33. Productos obtenidos de la fermentación de xilosa (80 g/L) cepas MG1655, JU15 y LL26.

7.4.4.2 Evaluación de la actividad enzimática de LDH en cultivos con xilosa (80 g/L)

En lo que se refiere a las actividades de LDH en las fermentaciones de xilosa 80 g/L los resultados muestran que el valor de actividad D-LDH de JU15 fue 8.5 veces superior al de MG1655, mientras que el valor más alto corresponde a la actividad L-LDH de la cepa LL26, constituye 11.6 veces el valor de productividad de la silvestre. (Tabla 7). También en este caso los valores de productividad volumétrica de las cepas JU15 y LL26 fueron similares, 6.8 y 6.0 veces mayor al de MG1655, respectivamente.

7.5 Comparación de resultados con otras cepas de *E. coli* productoras de lactato

Al interrumpir las vías que compiten en la disponibilidad del piruvato se presenta una re-distribución del flujo en el nodo de piruvato, que incide en el metabolismo de la célula: Esto también se puede reflejar en los niveles de actividad de las enzimas involucradas ya que, como se describió en la sección anterior se tienen efectos sobre la expresión genética y la regulación alostérica. La adecuada manipulación de los genes en el metabolismo del piruvato ha permitido generar cepas cuyo espectro de productos de fermentación se ve reducido; logrando así dirigir el flujo hacia un metabolito deseado, en este caso hacia la producción de L-lactato.

En trabajos previos de inactivaciones de genes, en la cepa JW0885 (BW25113 $\Delta pflA$) se observó un incremento de 60 veces en la producción de lactato respecto de la cepa silvestre BW25113, la generación de biomasa decayó 3.7 veces, las concentraciones de los productos que cataliza *pfl* (formato, acetato y etanol) se detectaron en concentraciones insignificantes. Mientras que en la cepa, JW1228 (BW25113 $\Delta adhE$), la inactivación mostró un incremento en la producción de lactato de 8 veces respecto de la cepa silvestre; la biomasa alcanzada fue casi 3

veces inferior respecto de la cepa silvestre BW25113. En ambos trabajos el análisis se realizó en cultivos micro-aeróbicos y usando glucosa como fuente de carbono. Es evidente que la inactivación en la enzima *pfl* por su ubicación en el esquema glucolítico logra incrementar en mayor medida el flujo hacia lactato con respecto de *adhE*. (Zhu y Shimizu 2005). En concordancia con los trabajos descritos, en la presente tesis se encontró que la inactivación simultánea de *pflB* y *adhE* ocasionó un incremento en la producción de lactato hasta de 10 veces y una reducción en la producción de biomasa de 2 veces con respecto a la cepa silvestre (*E. coli* MG1655).

7.6 Relevancia de la producción de acetato en las cepas productoras de D y L-lactato

La presencia de acetato como producto minoritario en las fermentaciones con las cepas JU15 y LL26 en las condiciones evaluadas se puede deber a una distribución distinta del carbono en el nodo de acetyl-CoA en respuesta a la inactivación en *pflB*. El complejo piruvato formato liasa cataliza la descarboxilación no oxidativa del piruvato generando formato y acetyl-CoA en condiciones de fermentación. Las funciones de acetyl-CoA son como aceptor de electrones generando etanol, precursor en la formación de ATP durante la producción de acetato o bien contribuir a la generación de biomasa, ya que se encuentra asociado al crecimiento. Este complejo es sensible a la presencia de oxígeno, su expresión se reduce drásticamente en condiciones aerobias (Axelsson 2004). Con la interrupción de *pflB*, la generación de ATP en condiciones no aireadas está limitada a la fosforilación a nivel de sustrato y probablemente a una vía alterna para generar acetyl-CoA y su posterior conversión a acetato por la fosfoacetilasa y la acetato cinasa.

El comportamiento presentado por las cepas, en la generación de acetato, soporta el diseño de las cepas JU15 y LL26, en el sentido de dejar activa la vía de

generación de acetato para generar ATP de forma alterna a la fosforilación a nivel sustrato en cepas interrumpidas en *pfl*. Resultados recientes (Utrilla et al., 2009) soportan la hipótesis de que en ciertas condiciones el complejo de la piruvato deshidrogenasa (el cual generalmente es activo a bajas concentraciones de NADH y en presencia de oxígeno) funciona como una vía alterna de generación de acetil-CoA en las condiciones de cultivo que se utilizaron en el presente trabajo. Además, un incremento en la concentración intracelular de piruvato, favorecido por la interrupción en *pfl*, funciona como activador alostérico de la fosfotransferacetilasa activando el primer paso en la formación de acetato a partir de acetil-CoA (Suzuki et al; 1969). Así mismo, en otros trabajos ha sido reportado que un exceso de piruvato es directamente oxidado a acetato por la enzima piruvato oxidasa (*poxB*), cuya inducción se da en fase estacionaria o bien en condiciones de estrés. (Chang et al; 1994). La actividad de PFL ha sido observada durante condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis por lo que se ha asociado como la única actividad en el catabolismo de *E.coli*; sin embargo se demostró que no es la única, (Alexeeva et al., 2000). Recientemente, se ha demostrado que se puede encontrar activo el complejo de la PDH en condiciones anaerobias, con un 5% de la actividad que presenta en condiciones aerobias. También, se ha reportado que en mutantes *pfl* evolucionadas para la producción de etanol, se puede llevar a cabo la conversión de piruvato a acetil-CoA (Zhou et al; 2003) por medio de la piruvato deshidrogenasa. La inactivación de *aceF* -una subunidad del complejo de la piruvato deshidrogenasa- demostró que la transcripción en condiciones de anaerobiosis de PDH es la suficiente para la formación de acetil-CoA y esto le permite a la célula crecer en condiciones deficientes de ATP (Utrilla 2009).

Por otro lado, cepas silvestres de *E. coli* en condiciones de fermentación distribuyen gran parte de acetil-CoA en la generación de acetato y etanol en proporción 1:1. (Alexeeva et al., 2000; Vemuri et al., 2002), esta relación se ve afectada por la misma disponibilidad de acetil-CoA y la actividad residual de PDH. (Alexeeva et al., 2000; De Graef et al., 1999). En el caso de las cepas JU15 y LL26, el flujo de participación en el nodo de acetil-CoA es distinto al de las cepas silvestres: aparte de la

interrupción de *pfl*, también es debido en parte a la interrupción en *adhE*. En consecuencia, la presencia de acetato también es atribuible a que las cepas JU15 y LL26 no son capaces de formar etanol a partir de acetil-CoA, y por tanto un exceso de este metabolito puede ser canalizado hacia la vía pta-Ack para generar acetato y ATP como respuesta a la inactivación de la vía para producir etanol.

En trabajos previos se demostró que la disponibilidad de acetil-CoA es uno de los factores limitantes en el incremento del flujo hacia la generación de acetato. Esto se evidenció al construir una cepa de *E. coli* (BW25113) con una interrupción en uno de los dos genes que codifican para las piruvato cinasas, en este caso la PykF (Δ *pykF*), observándose que los niveles de Pta-Ack responden a los cambios de concentración de acetil-CoA ocasionados por la interrupción en la piruvato cinasa (Zhu y Shimizu 2005). Además, los mismos autores encontraron que la expresión de *ackA* se incrementa significativamente cuando se ha interrumpido *pfl*, y observaron un incremento en la actividad enzimática de *ack*, como resultado se obtuvo una mayor concentración de acetato al final de la fermentación respecto de la cepa silvestre (Zhu y Shimizu, 2005).

En resumen, el acetato es atribuible a: la actividad de las enzimas piruvato deshidrogenasa y piruvato oxidasa, las cuales, aún cuando las condiciones no les son favorables, realizan la conversión de piruvato en acetil-CoA dando lugar a la generación de acetato; a la inactivación de *pfl* y *adhE*; la baja disponibilidad de ATP; y a cambios que se inducen en la expresión genética y regulación alostérica de varios genes y enzimas. Considerando lo anterior, se propone que en la red metabólica de la cepa LL26 la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa incide directamente en la producción de acetato y se indica en las flechas punteadas de la (Figura 34).

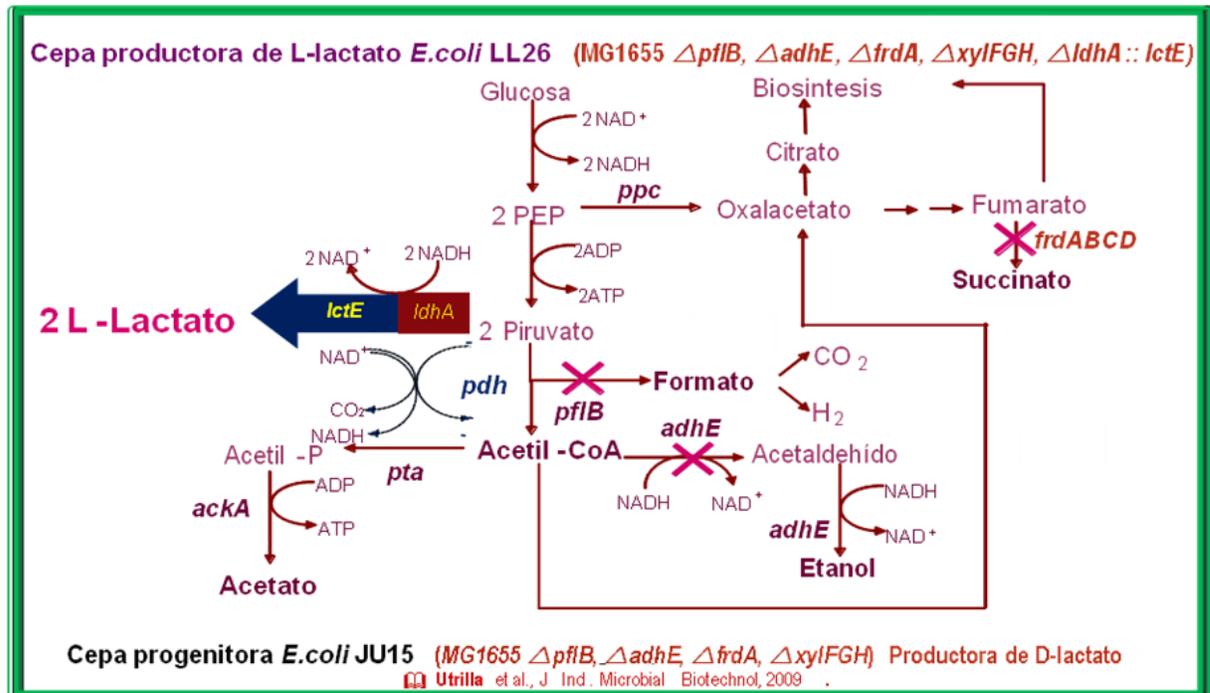


Figura 34. Red metabólica propuesta para la cepa LL26.

7.7 Impacto de la actividad enzimática en la velocidad de formación de lactato y de consumo de azúcares

Para demostrar si la actividad enzimática heteróloga en la cepa LL26 aumenta el flujo de carbono hacia la formación de lactato, cuando se utiliza glucosa o xilosa como fuente de carbono, se evaluó la productividad volumétrica de lactato en función de la actividad enzimática de LDH

Es notorio observar que al incrementar al doble la concentración de glucosa o xilosa (Tabla 7) se incide en un incremento del valor de actividad específica, tanto para JU15 como para LL26. Probablemente en el caso de la cepa LL26 se trata de una activación alostérica en respuesta al incremento de la presencia de sustrato (piruvato) conferido por las relaciones NADH/NAD⁺ y fructosa 2,6 difosfato/fosfato activador alostérico propio de la enzima heteróloga L-LDH (Yoshida 1965).

Con la fuente xilosa en concentración de 80 g/L se obtuvieron los valores más altos de actividad enzimática de LDH (Tabla 7). El efecto de la fuente de carbono incide en el incremento de la actividad de las cepas JU15 y LL26, sin embargo este efecto no correlaciona con los valores de productividad inferiores en las fermentaciones con 80 g/L de glucosa. Es importante mencionar que en todos los casos, la cantidad de proteína encontrada en la cepa LL26 fue inferior con respecto al valor de proteína presente en las demás muestras demostrando así que el incremento en la actividad enzimática específica es conferido por las propiedades catalíticas superiores de la enzima L-LDH.

Cabe recordar que la reoxidación del NADH resulta imprescindible en las cepas JU15 y LL26, pues constituye el único mecanismo de generación de poder reductor para ambas cepas, en consecuencia es de mayor impacto el cociente NADH/NAD^+ . Si bien, el flujo glucolítico se regula por la concentración de fructosa 1,6 difosfato en las cepas MG1655, JU15 y LL26, este intermediario también es el precursor del activador de la enzima *lctE* (L-LDH) de la cepa LL26 pues esta enzima es activada alostéricamente por la fructosa 1, 6 difosfato. (Zuber et al; 1979).

Se ha demostrado que el transporte de glucosa y la velocidad de transformación del piruvato en productos de fermentación permiten controlar el flujo a través de la glucólisis. Es decir, que una mayor capacidad para transportar glucosa o una mayor actividad total de alguna enzima que convierte el piruvato en productos de fermentación, permite controlar el flujo de la glucólisis y la productividad específica de productos de fermentación. En el caso de una cepa etanológica de *E. coli* (KO11) se observó que la sobreexpresión del gen que codifica para la enzima piruvato decarboxilasa (PDC) proveniente de *Zymomonas mobilis* y que realiza la conversión de piruvato a acetaldehído, incrementó la velocidad de consumo de glucosa y el flujo de la glucólisis (Huerta-Beristain et al; 2008). Además, incrementando la actividad de PDC se logró aumentar sustancialmente el rendimiento teórico de conversión de glucosa o xilosa en etanol. Se ha demostrado que los incrementos en la actividad de PFK y PYK en la cepa KO11 reducen

drásticamente los flujos de consumo de glucosa hacia la formación de etanol, favoreciendo la formación de ácidos orgánicos (Huerta-Beristain et al; 2008).

Por otro lado, el flujo glucolítico es controlado también por los requerimientos de ATP, esto se demostró al hidrolizar el ATP producido en la glucólisis y observar un incremento en el flujo glucolítico en cultivos aeróbicos con *E. coli*. (Koebmann et al., 2002). Los niveles de ATP funcionan como reguladores alostéricos en varias enzimas de la glucólisis (Neidhart et al; 1990) y en la acetato cinasa (Suzuki et al; 1969). Por lo que en la cepa LL26 se esperaba que en conjunto el requerimiento de ATP y el incremento en la actividad de una enzima, en este caso LDH incrementarían el flujo glucolítico y ello se reflejaría en mayores velocidades de consumo de sustrato y de producción de lactato. Sin embargo, lo que se encontró es que aún cuando existe limitación de ATP en la cepa por la inactivación en *pflB* y el incremento del nivel de actividad de L-LDH, no hay un incremento en el consumo de glucosa o de xilosa en la cepa LL26. Estos resultados sugieren que el control del flujo de carbono no se encuentra en la vía de conversión de piruvato a lactato y que probablemente este control se encuentre repartido en varios pasos de las vías de la glucólisis o de las pentosas fosfato.

7.8 Comentarios finales

A nivel industrial es deseable que una cepa productora de lactato cuente con las siguientes características: elevada productividad volumétrica y alto rendimiento en la obtención del isómero ópticamente puro, tolerancia a títulos altos de lactato y capacidad para fermentar diversos sustratos. La productividad específica de un biocatalizador reside en el flujo de la fuente de carbono a través de las distintas interconversiones hasta llegar al producto de interés mientras que la productividad volumétrica conjunta la productividad específica y la densidad celular. Los lactobacilos presentan productividades volumétricas entre 1 y 4 g/L h de lactato en cultivos en medios ricos usando glucosa como fuente de carbono (Axelsson, 2004). En este trabajo el L-lactato se obtuvo ópticamente puro con una productividad

volumétrica de 1.14 y 1.33 g/L h durante la fase de crecimiento en medio mineral con glucosa 40 y 80 g/L, respectivamente, mientras que en xilosa alcanzaron valores de 1.25 y 0.42 g/L h con 40 y 80 g/L, respectivamente (Tabla 7). La diferencia en los medios utilizados (rico vs mineral) y la utilización de xilosa permiten proponer a *E. coli* modificada como una alternativa que permite competir con tecnologías actuales de producción de lactatos como precursores para la formación de polilactatos. Sin embargo, con otras cepas de *E. coli* productoras de L-lactato (ver anexo), se han obtenido valores de productividad volumétrica superiores a los de la cepa LL26. En este contexto es factible mejorar la productividad volumétrica de producción de L-lactato con LL26, ello se reflejará en la reducción del tiempo de fermentación con lo cual se disminuirán los costos del proceso. Sería conveniente evaluar el desempeño de la cepa empleando algunas estrategias de cultivos, como la alimentación de la fuente de carbono.

8. CONCLUSIONES

La cepa LL26, con una copia en el cromosoma de *lctE*, bajo la regulación del promotor nativo *ldhA*, presenta un crecimiento similar al de la cepa isogénica productora de D-lactato (JU15), demostrando que la expresión cromosomal de la L-lactato deshidrogenasa de *B. subtilis* en *E. coli* no causa efectos tóxicos y por lo tanto es viable para la producción de L-lactato ópticamente puro.

Aún cuando las velocidades específicas de crecimiento son superiores al utilizar glucosa respecto a xilosa con la cepa LL26 con 40 g/L, el rendimiento de conversión en ambos casos es similar a las 48 horas del cultivo: 95% respecto al teórico. Sin embargo, a una concentración de 80 g/L de azúcar, se reducen alrededor del 70%: la velocidad de crecimiento, biomasa y rendimiento. Al parecer este efecto puede ser atribuible a la presión osmótica y la toxicidad del lactato.

Los resultados obtenidos permiten concluir que aún cuando en todas las fermentaciones evaluadas el mayor valor de actividad específica L-LDH corresponde a la cepa LL26 -conferido por las propiedades intrínsecas de la enzima-, no hay un incremento en el flujo glucolítico que se refleje de manera directa en la productividad de lactato, por lo que el control del flujo no reside en la actividad de L-LDH.

La cepa LL26 es en términos prácticos homofermentativa. La generación de acetato es atribuible a que la cepa está empleando vías alternas en la generación de acetil-CoA y acetato en respuesta a: las inactivaciones en los genes *pfl* y *adhE*; baja disponibilidad de ATP; probable actividad de los complejos piruvato deshidrogenasa y piruvato oxidasa; así como la regulación genética y alostérica de genes y enzimas en el proceso evolutivo de la cepa.

9. PERSPECTIVAS

Con el fin de alcanzar mayores concentraciones de lactato, manteniendo el rendimiento de conversión por arriba del 90%, minimizar el efecto de presión osmótica utilizando cultivos alimentados. Otra manera para contender con este efecto es la adaptación evolutiva de la cepa LL26 en elevadas concentraciones de azúcares.

Se sugiere medir las actividades de las enzimas en la red metabólica propuesta para la cepa LL26 con la finalidad de determinar la(s) enzima(s) que controla(n) el flujo glucolítico y modularlo en función del uso de un promotor inducible como lo es *trc*.

Otro aspecto relevante para cepas productoras de lactato es su tolerancia al producto y a valores de pH ácidos. Se propone, mediante evolución adaptativa, en presencia de concentraciones crecientes de ácido láctico y de valores de pH ácido evolucionar a las cepas productoras para seleccionar mutantes tolerantes a lactato y pH ácido.

Con base en los rendimientos que muestra la cepa LL26, se sugiere el escalamiento en la etapa de fermentación con la finalidad de complementar el comportamiento de la cepa.

.

10. REFERENCIAS

1. Alexeeva S., Kort B., Sawers G., Hellingwerf K., Teixeira de Mattos M. 2000. **Effects of Limited Aeration and of the ArcAB System on Intermediary Pyruvate Catabolism in *Escherichia coli***. J. Bacteriol. 182 (17) 4934-4940.
2. Ajioka M., Enomoto K., Suzuki K., Yamaguchi A. 1995 **Basic properties of polylactic acid produced by the direct condensation polymerization of lactic acid**. Bull. Chem. Soc. Jpn. 68: 2125-2131.
3. Axelsson L. 2004 **Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology**. En: Salminen S. von Wright A, Ouwehand A. (Eds.) Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3a rev. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
4. Bailey E. J. 1991. **Toward a science of metabolic engineering**. Science. 252: 1668-1674.
5. Beall D.S Ohta K., Ingram L. O. (1991) **Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli***. Biotechnol. Bioeng. 38: 296-303.
6. Benninga H. 1990. **A History of Lactic Acid Making**. Dordrecht, The Netherlands Kluwer Academic; 1990.
7. Blattner F. R., Plunket G., C. A. Bloch, Perna N.T., Burland M., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew K., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. **The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12**. Science 277(5331): 1453-1474.
8. Bock A y Sawers 1996. ***E.coli* and Salmonella, Cellular and molecular biology**
9. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., 2001. **The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. lactis IL1403**. Letter 11:731–53 (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
10. Bianchi M., Brambilla-Leiva, L. Portani F. Liu. C., Lievevense J., Porro D. 2001. **Efficient homolactic fermentation by *Kleuyveromyces lactis* strains defective in piruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene**. Appl. Environ. Microbiol. 67 (12) 5621-5625.
11. Boswell C., 2001. **Bioplastics aren't the stretch they once be seemed, Dupont, Cargill Dow and Metabolix bring sustainability to plastics manufacture**, Chemical Market Report Schnell Publishing 260:15-18.
12. Bradford MM 1976. **A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem. 72: 248-254.
13. Bulut S., Elibol M., Ozer D., 2004. **Effect on different carbon source on L (+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae*** Biochem. Eng. Journal 21 33-37.

14. Bunch P.K Mat Jan F. Lee N. and Clark D.P 1997. **The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*** Microbiology 143 187-195.
15. Chang, Y., Wang A., Cronan, J. Jr. 1994a. **Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS (katF)* gene.** Mol. Microbiol. 11:1019-1028.
16. Chang D-E., Jung H-C., Rhee J-S., Pan-J, 1999b. **Homofermentative production of D or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1.** Appl. Environ Microbiol. 65: 1384-1389.
17. Chaplin M. F, Kennedy J.F. 1987 **Carbohydrate analysis: a practical approach.** IRL Press Washington D.C. 1:3.
18. Clark 1989. **The fermentation pathways of *Escherichia coli*** FEMS Microbiology Reviews 63 223-234.
19. Collins M., Jones D., Farrow A., Klipper-Bälz R., Scheleifer K. 1984. ***Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* nom. rev., comb. nov.; *E. maloduratus* nom. rev., comb. nov.;** Int. J Syst Biol 34 220-223.
20. Datta R, Tsai S., Patrick B., Moon S., Frank J. 1993a. **Technological and economic potential of polylactic acid and lactic acid derivatives.** International Congress on Chemistry from Biotechnology, Hannover, Alemania p1-8.
21. Datta R., M. Henry., 2006b. **Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies.** J. of Chem. Tech and Biotechnol. 81(7) 1119-1129.
22. Datsenko KA, B.L. Wanner 2000. **One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.** Proc Natl. Acad. Sci USA 97: 6640-6645.
23. Davis E., Henderson P. 1987. **The cloning and DNA sequence of the gene *xyle* for xylose-proton symport in *Escherichia coli* K12.** J. Biol Chem 262(29):13928-32.
24. Dien B., Nichols N., Bothast R., 2001a. **Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27:259-264.
25. Dien B., Nichols N., Bothast R., 2002b. **Fermentation of sugar mixture using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29:221-227.
26. Dong-Mei B, Xue Ming Z., Xin Gran L., Shi Min X. **Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over production of L(+) lactic acid and metabolic flux analysis of mutants.** Biochem. Eng. J.18 41-48.
27. Elena S., Lenski R., 2003. **Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation.** Nat Rev Genet. 4:457-469.

28. Fong S., Joyce R., Palsson B. 2005. **Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states.** Genome Res. 2005 15: 1365-1372.
29. Flores H. Ellington A. D. 2005. **A modified consensus approach to mutagenesis inverts the cofactor specificity of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase .** Protein Eng. Des Sel, 18 (8) 369-377.
30. Fukushima K, Youn-Hee C, Kimura Y., 2007. **Enhanced stereocomplex formation of poly(L-lactic acid) and poly(D-lactic acid) in the presence of stereoblock poly(lactic acid).** Macromol. Biosci. 7: 829-835.
31. Fukuzaki H., Yoshida M., Asano M., Kumakura M. 1989. **Synthesis of copoly (D, L-lactic acid) with relative low molecular weight and in vitro degradation.** Eur Polym J;25:1019–26.
32. Garvie E. I. 1980. **Bacterial lactate dehydrogenases.** Microbiol Rev. 44: 106-139.
33. Hasona A., Kim Y., Healy F., Ingram L., Shanmugam K., 2004. **Pyruvate Formate Lyase and Acetate Kinase Are Essential for Anaerobic Growth of *Escherichia coli* on Xilose.** J Bacteriol 22: 7593-7600.
34. Hieto Tsuji. 2005. **Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, structure, properties, degradation and applications.** Molec. Biosci 5: 569-597.
35. Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal H., **Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources.** Enzyme Microb. Technol. 26: 87-107.
36. Huerta-Beristain G., Utrilla J., Hernández-Chávez G., Bolívar F., Gosset G., Martínez A. 2008. **Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase** J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 15 (1) 55-64
37. Ingram L O. Altherthum F.1989. **Efficient ethanol production from glucose, lactose and xylose by recombinant *Escherichia coli*** Appl. Environ. Microbiol 55 (8) 1943-1948
38. Ingram L. O, Aldrich H. C., Borges C. C., Causey T. B., Martínez A., Morales F., Zaldivar J., Zhou S. 1999a. **Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production.** Biotechnol. Progress. 15: 855-866.
39. Ingram L., Aldrich H.C., Borges A., Causey. T. B. Martínez A., Morales. F., Saleh A., Underwood S. A., Yomano L.P., York. S.W., Zaldivar J., Zhou S. 1999b. **Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production.** Biotechnol. Prog. 15: 855-866.
40. Kohonen H., Helminen A., J.V.Seppälä. 2001. **Synthesis of polylactides in the presence of co-initiators with different numbers of hydroxyl groups.** Polymer 42: 7541-7549
41. Litchfield J., 1996. **Microbial production of lactic acid** Appl. Microbiol. 42: 45-95.

42. Lippinsky E., Sinclair R. 1986. **Is lactic acid a commodity chem?** Chemical engineering 82:26-32.
43. Maniatis T. Fritsch E., Sambrook J. 1982. **Molecular Cloning: A laboratory manual** Cold Spring N.Y. Cold Spring N.Y. Cold spring laboratory press pp 68-69.
44. Martínez A., Grabar T.B., Shanmugam K.T., Yomano L.P.; York S.W., 2007a. **Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B.** Biotechnol Lett 29 397-404.
45. Martinez A., Rodríguez M.E., York S. W., Preston J. F., Ingram L.O. 2000b. **Effects of Ca(OH)₂ treatments (“Overliming”) In the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hidrolysates.** Biotechnology and Bioengineering. 69 (5) 526-536.
46. Mayer C., Boos W. 2009. **Hexose/Pentose and Hexitol/Pentitol Metabolism. *Escherichia coli* and *Salmonella*** Cellular and Molecular Biology. ASM Press Online version. Online Edition.
47. Neidhardt, F., Curtiss III., Ingraham L., Lin E., Low K., Magasanik B., Reznikoff W., Riley M., Schaechter, Umberger H. 1996. ***Escherichia coli* and *Salmonella*:** Cellular and Molecular Biology, 2a Ed.
48. Murata K., Innoue Y., Rhee H., Kimura A., 1989. **2-Oxaldehyde metabolism in microorganisms.** Can J. Microbiol. 35 (4): 423-431.
49. Neves A., Ramos A., Costa H., van Swam II., Hugenholtz J., Kleerebezem M. 2002. **Effect of different NADH oxidase levels on glucose metabolism by *Lactococcus lactis*: kinetics of intracellular metabolite pools determined by in vivo nuclear magnetic resonance.** Appl Environ Microbiol 68:6332–42.
50. Niel E., Hahn-Hägerdal 1999. **Nutrient requirements of lactococci in defined growth media.** Appl. Microbiol. And Biotechnol. 52: 617-627.
51. Otha K. Beall D. S. Mejia., Shanmigan K.T., Ingram L.O. 1991. **Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding piruvate decarboxilase and alcohol deshydrogenase II** Appl. Environ. Microbiol. 57: 893-900.
52. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente 1996.(PNUMA) TIERRAMÉRICA Suplemento de Medio Ambiente para América Latina y el Caribe
53. Pranamuda H., Tokiwa Y. 1999a. **Degradation of poly (L-lactide) by strains belonging to genus *Amycolatopsis*.** Biotechnol. Lett. 21:901–905.
54. Pranamuda H, Tokiwa Y, Tanaka H. 1997b. **Poly lactide degradation by an *Amycolatopsis* sp.** Appl Environ Microbiol 63:1637–40.
55. Pranamuda H., Tsuchii A., Tokiwa Y. 2001c. **Poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp.** *Macromol. Biosci.* 1: 25–29.
56. Pedersen S., Bloch P., Reeh S., Neidhardt F. 1978. **Patterns of protein synthesis in *E. coli*: a catalog of amounts of 140 individual proteins at different growth rates.** Cell 14:179–190.

57. Peng L., and Shimizu K., 2003 **Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement.** App. Microbiol. 61: 163-178.
58. Romero García S., Merino E., Bolívar F., Gosset G., Martínez A. 2007a. **Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: Lactate Dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism.** Appl. Environ. Microbiol. 73:5190-5198.
59. Romero García S., Hernández-Bustos C., Merino E., Gosset G., Martínez A. 2009b. **Homolactic Fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*.** Microb. Cell. Fact. 21:8-23.
60. Rojan P.J., 2007. **Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives** Appl. Microbiol Biotechnol. 74:524-534.
61. R. Lal; 2008. **Crop residues as soil amendments and feedstock for bioethanol production** Waste Management 28 (4) 747-758.
62. Russ W., Meyer-Pittroff R. 2004 **Utilizing waste products from the production and processing food industries.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition 44: 57-62.
63. Saha B. C. 2003. **Hemicellulose conversion.** Ind. Microbial Biotechnol. 30: 279-291.
64. Saulnier B., Ponsart S., Coudane J., Garreau H., Vert M. 2004. **Lactic acid-based functionalized polymers via copolymerization and chemical modification.** Macromol. Biosci. 4: 232-237.
65. Schar H., Zuber H., Rossmann M., 1982. **Crystallization of lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*** J. Mol Biol (154) 349-353.
66. Shalel-Levanon S., San K.Y., Bennet G.N 2005. **Effect of ArcA and FNR on the expression genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions.** Biotechnol. Bioeng. 92(2):147-159
67. Sonenshein A.L. 1993. ***Bacillus subtilis* and other Gram Positive Bacteria Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics.** American Society of Microbiology. Washington.
68. Skory C., D. 2003. **Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate deshydrogenase gene.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 22-27.
69. Sneath P. 1984. **Bergey's manual of systematic bacteriology** Vol II Williams and Wilkins Baltimore London.
70. Stephanopoulos G. 1998. **Metabolic engineering.** Biotechnol Bioeng. 58:119-120.

71. Singh S., Ahmed S., Pandey A. 2006. **Metabolic engineering approaches for lactic acid production.** Process Biochemistry 41: 991-1000.
72. Suzuki, T. 1969. **Phosphotransacetylase of *Escherichia coli* B, activation by pyruvate and inhibition by NADH and certain nucleotides.** Biochim. Biophys. Acta 191:559-569.
73. Taniguchi M., Tokunaga T., Horiuchi K., Hoshino K., Sakai K., Tanaka T. 2004. **Production of L-Lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacteria** Appl. Microbiol. Biotechnol.66: 160-165.
74. Tarmy E.M., Kaplan N.O., 1968. **Kinetics of *Escherichia coli* B D-Lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation** The J. Biol. Chem. 243: 2587-2596.
75. Teusink B., Smid E. J., 2005. **Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria.** Food Microbiol.4: 46-56.
76. Tomita K, Kuraki Y, Nagai K. 1999. **Isolation of thermophiles degradating poly (L-lacticacid).** J Biosci Bioeng. 87:752–755.
77. Torres A., Li S., Roussos S., Vert M. 1996. **Screening of microorganisms for biodegradation of poly (lactic acid) and lactic acid-containing polymers.** Appl. Environ. Microbiol. 62:2393–2397.
78. Utrilla J., Gosset G., Martinez A. 2009a **ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* increases glucoytic flux to D-lactate.** J. Ind. Microbiol Biotechnol 36 (8) 1057-1062.
79. Utrilla Carreri J. 2009b. **Ingeniería metabólica en *Escherichia coli* para la conversión eficiente de xilosa a D-lactato.** Tesis de Doctorado en Proceso. UNAM. Instituto de Biotecnología.
80. van Niel Ed WJ., Palmfeldt J., Martin R., Paese M., Hahn-Hagerdal B. 2004. **Reappraisal of the regulation of lactococcal L-lactate dehydrogenase.** Appl Environ Microbiol 70:1843–6.
81. Vázquez-Limón C., Vega-Badillo J., Martínez A., Espinosa- Molina G., Gosset G., Soberón X., López-Munguía A., Osuna J. 2007a. **Growth rate of a non-fermentative *Escherichia coli* strain is influenced by NAD⁺ regeneration.** Biotechnol. Lett. Dec; 29 (12) :1857-1863.
82. Vázquez Limón C. 2009b. **Manipulación de las rutas fermentativas de *Escherichia coli* para la producción de metabolitos.** Tesis de Doctorado. UNAM. Instituto de Biotecnología.
83. Vega Badillo J. 2009. **Evolución dirigida de la L-(+) lactato deshidrogenasa (LctE) de *Bacillus subtilis* para mejorar sus propiedades catalíticas y nivel de expresión en *Escherichia coli*.** Tesis de Maestría.UNAM. Instituto de Biotecnología.
84. Vemuri G., Eitman M., Altman E. 2002. **Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*.** Appl. Environ. Microbiol 68: 1715-1727.

85. Vijayendran C., Barsch A., Friehs K., Niehaus K., Becker K., Flaschel E. 2008. **Perceiving molecular evolution processes in *Escherichia coli* by comprehensive metabolite and gene expression profiling.** *Genome Biology* 2008.
86. Yang Y., T. Bennett G., San K., 2000. **The effects of feed and intracellular piruvate levels on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*.** *Metab. Eng.* 3, 115-123
87. Yoshida A, 1965 **Enzymic Properties of LDH of *B.subtilis*** *Biochim. Biophys. Acta* 99: 66-67.
88. Yun J., Wee Y., Ryu H. 2003. **Production of optically pure L-(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1.** *Enz. Microbial. Tech.* 33:416–23.
89. Zhou S., Shanmugam K. T., Ingram L. O. 2003a. **Functional replacement of the *Escherichia coli* D- (-)-Lactate Dehydrogenase gene (*ldhA*) whit the L-(+)-Lactate Dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2237-2244.
90. Zhou S., Causey T. B., Hasona A., Shanmugam K. T., Ingram L. O. 2003b. **Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110.** *Appl. Environ. Microbiol.* 69:399-407.
91. Zhu Y., Eiteman M. A., DeWitt K., Altman E. 2007. **Homolactate fermentation by metabolically engineered *Escherichia coli* strains.** *Appl. Environ. Microbiol.* 73:456-464.
92. Zhu J., Shimizu K. 2004. **The effect of *pfl* genes knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:367-375.
93. Zhu J., Shimizu K. 2005. **Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition.** *Metabolic Engineering* 104-115.
94. Zuber H., Schar H; Hoopé–Seyler Z. 1979. **Structure and Function of L-Lactate Dehydrogenase from Thermophilic and Mesophilic Bacilli.** *Physiol Chem* 360:795-807.

PAGINAS CONSULTADAS EN INTERNET:

http://www.pemex.com/files/dcpe/informe_pemex_2002.pdf

http://www.pemex.com/files/dcf/dcf_er_0212_e.pdf

<http://www.genolist.pasteur.fr/Colibri/>

<http://www.ecocyc.org/ECOLI/>



11.1 APENDICE A

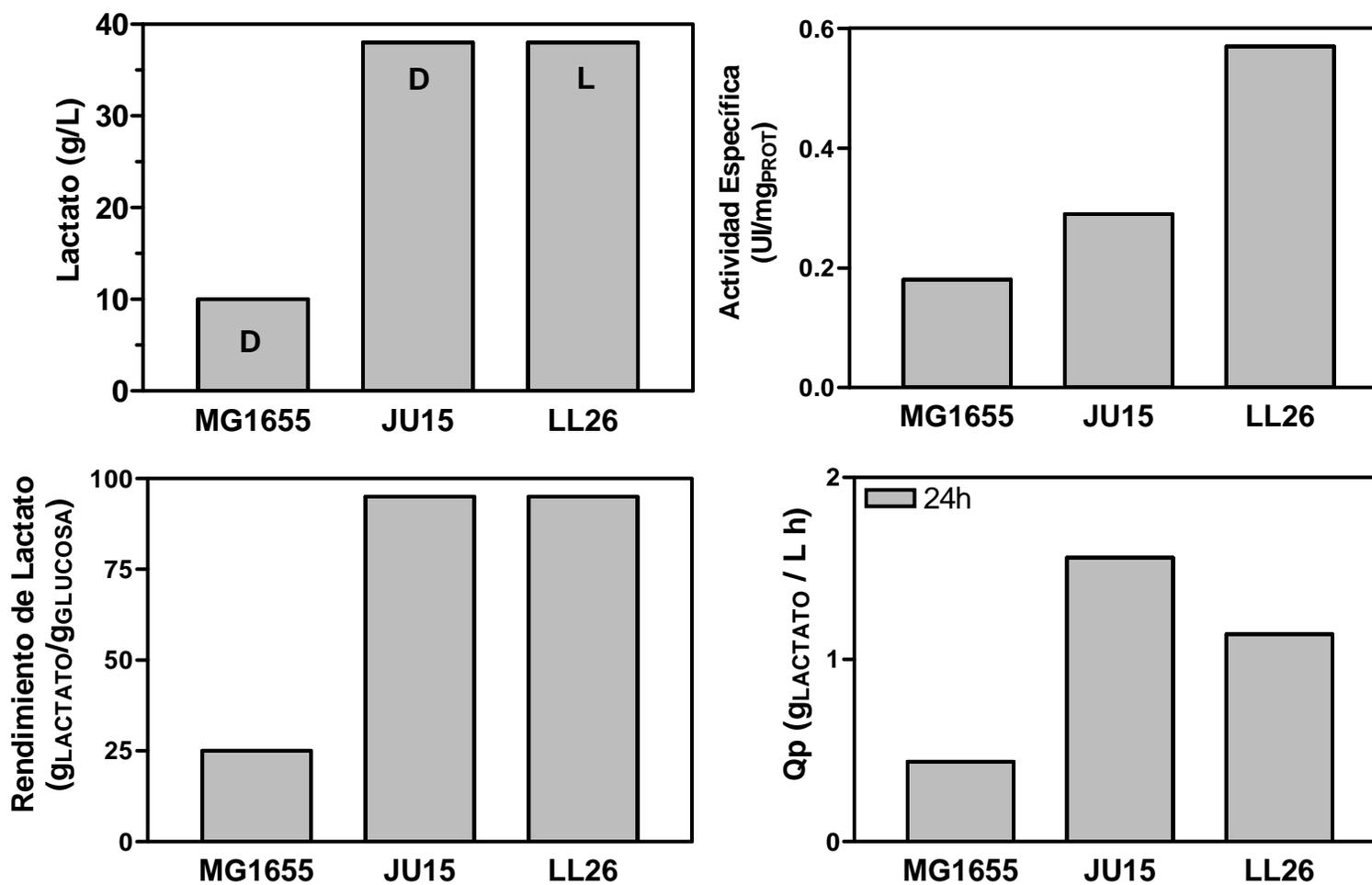


Figura 35. Comparación de las cepas MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en glucosa 40 g/L.

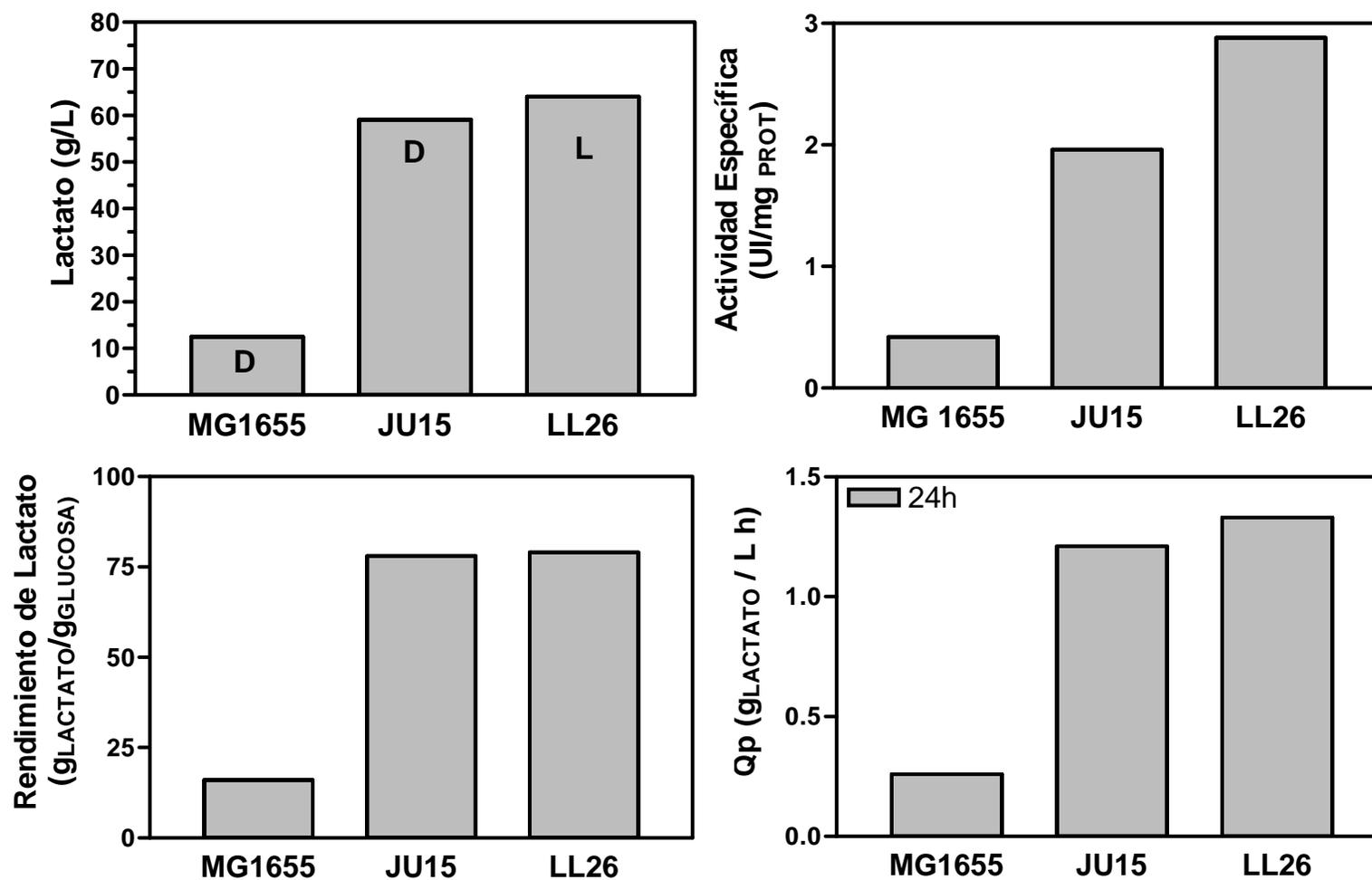


Figura 36. Comparación de las cepas MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en glucosa 80 g/L.

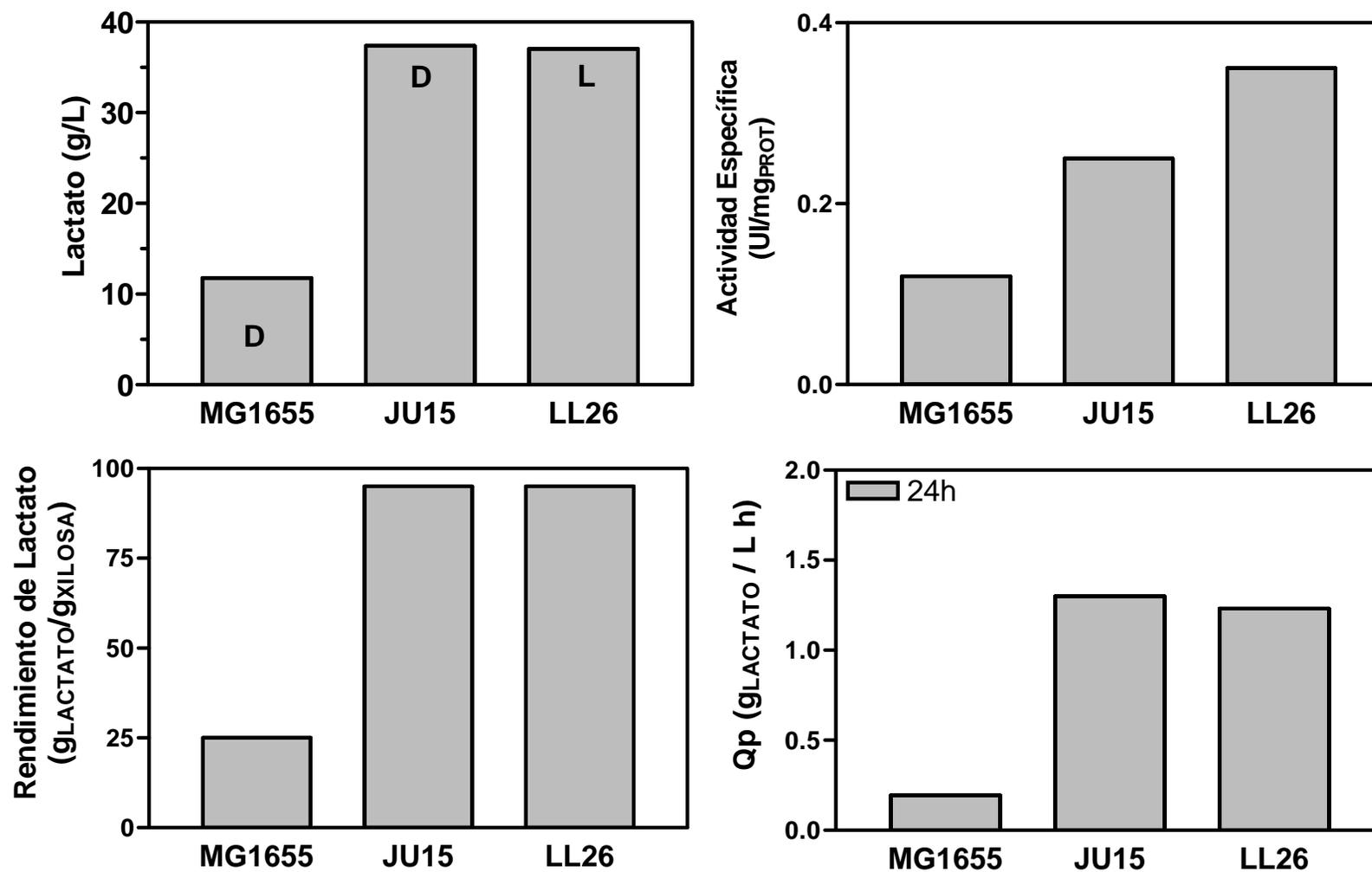


Figura 37. Comparación de las cepas MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en xilosa 40 g/L.

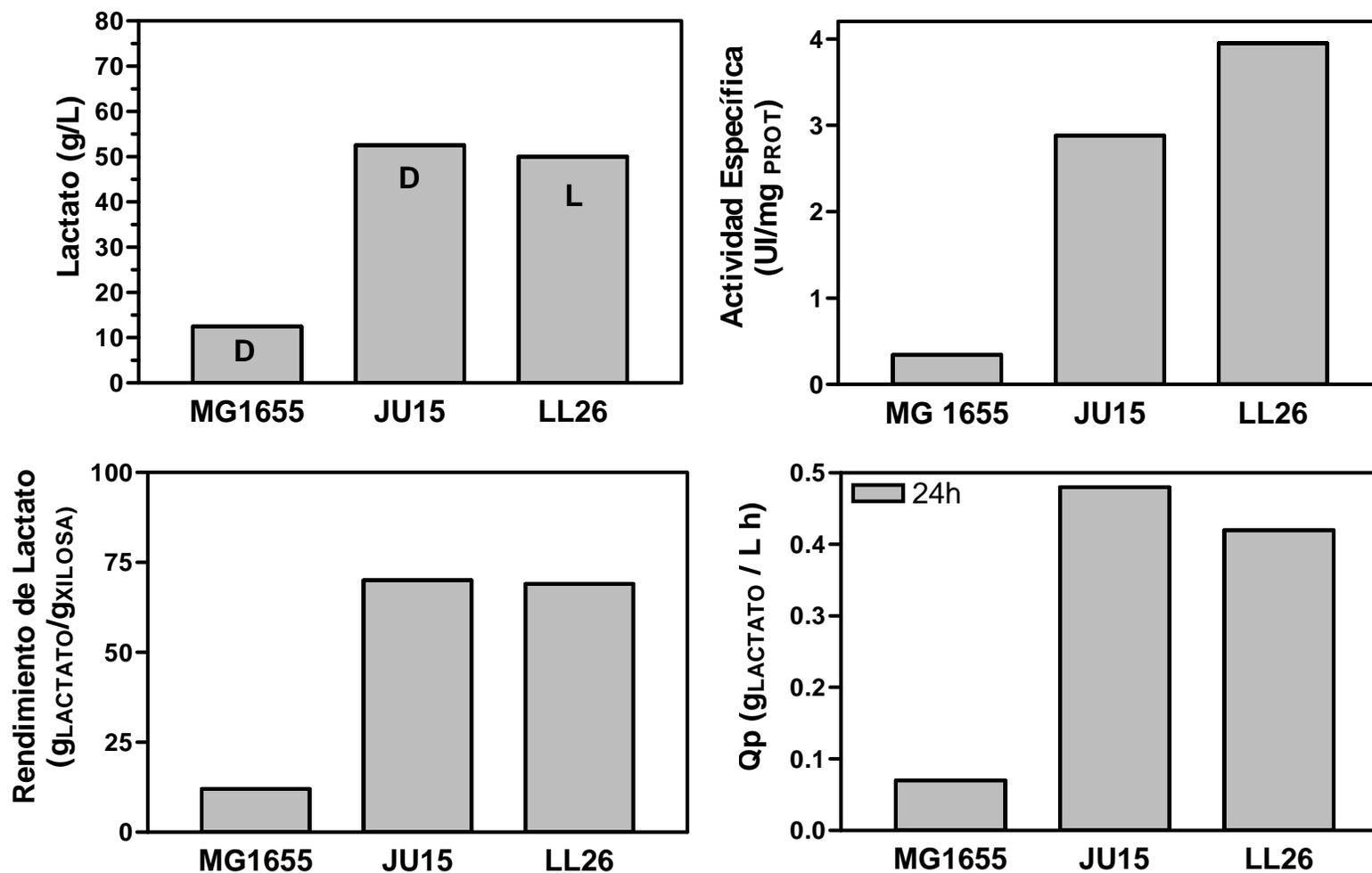


Figura 38. Comparación de las cepas MG1655, D-lactogénica JU15 y L-lactogénica LL26 en xilosa 80 g/L.

11.2 APÉNDICE B

Tabla 8. Cepas de *E. coli* recombinantes productoras de lactato

Cepa	Cepa progenitora	Genotipo	Tipo de integración	Tipo de Cultivo	Isómero	Medio	Fuente de Carbono	Q _p (g/Lh)	Y g _{LACTATO} /g _{CHO}	Autor
<i>E. coli</i> JP201	<i>E. coli</i> RR1	Δpta	Cromosoma	Alimentado	D-lactato	LB-Rico	Glucosa	1.09	0.54	Chang, 1999
<i>E. coli</i> JP203	<i>E. coli</i> JP201	$\Delta pta \Delta ppc$	Cromosoma	Alimentado	D-lactato	LB	Glucosa	1.04	0.9	Chang, 1999
<i>E. coli</i> JP204	<i>E. coli</i> JP202	$\Delta pta \Delta ldhA::ldhL$ (<i>L. casei</i>)	Cromosoma	Lote	L-lactato	LB	Glucosa	0.7	0.3	Chang, 1999
<i>E. coli</i> JP205	<i>E. coli</i> JP204	$\Delta pta \Delta ppc \Delta ldhA::ldhL$ (<i>L. casei</i>)	Cromosoma	Lote	L-lactato	LB	Glucosa	0.146	-	Chang, 1999
<i>E. coli</i> FBR9	<i>E. coli</i> K12-FMJ39	$\Delta pflB \Delta ldhA::ldhL$ (<i>S. bovis</i>)	Plásmido (bajo número de copias)	Lote	L-lactato	LB	Glucosa	0.48	0.63	Dien, 2001
							Xilosa	0.47	0.67	
<i>E. coli</i> FBR 10	<i>E. coli</i> B-NZN111	$\Delta pflB \Delta ldhA::ldhL$ (<i>S. bovis</i>)	Plásmido (bajo número de copias)	Lote	L-lactato	LB	Glucosa	0.70	0.61	Dien, 2001
<i>E. coli</i> FBR 11	<i>E. coli</i> K12-ND10	$\Delta pflB \Delta ldhA::ldhL$ (<i>S. bovis</i>)	Plásmido (bajo número de copias)	Lote	L-lactato	LB	Glucosa	2.2	0.93	Dien, 2001
							Xilosa	0.73	0.78	
<i>E. coli</i> FBR 12	<i>E. coli</i> B-ND10	$ptsG+ \Delta pflB \Delta ldhA::ldhL$ (<i>S. bovis</i>)	Plásmido (alto número de copias)	Lote	L-lactato	LB	Glucosa Xilosa 1:1	-	0.47	Dien, 2002

<i>E. coli</i> FBR 17	<i>E. coli</i> K12- NZN111	<i>ptsG- ΔpflB</i> <i>ΔldhA::ldhL</i> (<i>S. bovis</i>)	Plásmido (alto número de copias)	Lote	L-lactato	LB	Glucosa Xilosa 1:1	-	0.62	Dien, 2002
<i>E. coli</i> FBR 18	<i>E. coli</i> B- ND10	<i>ptsG- ΔpflB</i> <i>ΔldhA::ldhL</i> (<i>S. bovis</i>)	Plásmido (alto número de copias)	Lote	L-lactato	LB	Glucosa Xilosa 1:1	-	0.35	Dien, 2002
<i>E. coli</i> FBR 19	<i>E. coli</i> K12- NZN111	<i>ptsG-ΔpflB</i> <i>ΔldhA::ldhL</i> (<i>S. bovis</i>)	Plásmido (alto número de copias)	Lote	L-lactato	LB	Glucosa Xilosa 1:1	-	0.77	Dien, 2002
<i>E. coli</i> W 3110	Cepa silvestre			Lote	D-lactato	M9	Glucosa	0.21	0.47	Zhou, 2003
<i>E. coli</i> SZ40	<i>E. coli</i> W3110- SZ35	<i>ΔpflB Δfrd</i>	Cromosoma	Lote	D-lactato	M9	Glucosa	0.58	0.99	Zhou, 2003
<i>E. coli</i> SZ58	<i>E. coli</i> W3110- SZ40	<i>ΔpflB Δfrd</i> <i>Δ adhE</i>	Cromosoma	Lote	D-lactato	M9	Glucosa	0.66	0.97	Zhou, 2003
<i>E. coli</i> SZ63	<i>E. coli</i> W3110	<i>ΔpflB Δfrd</i> <i>ΔadhE</i> <i>ΔackA</i>	Cromosoma	Lote	D-lactato	M9	Glucosa	0.54	0.98	Zhou, 2003
<i>E. coli</i> SZ85	<i>E. coli</i> W3110	<i>ΔpflB Δfrd</i> <i>ΔadhE</i> <i>ΔackA</i> <i>ΔldhA::ldhL</i> (<i>P.</i> <i>acidilactici</i>)	Cromosoma	Lote	L-lactato	M9	Glucosa	0.65	0.95	Zhou, 2003
							Xilosa	0.32	0.93	
<i>E. coli</i> SZ 132	<i>E. coli</i> W3110	<i>ΔpflB Δfrd</i> <i>ΔadhE</i> <i>ΔackA</i> <i>ΔldhA::ldhL</i> (<i>P.</i> <i>acidilactici</i>)	Cromosoma	Lote	D-lactato	LB NBS + Bet	Glucosa Glucosa Sacarosa	- - -	0.9 0.55 0.93	Zhou, 2005

<i>E. coli</i> SZ 194	<i>E. coli</i> W3110	$\Delta pflB \Delta frd$ $\Delta adhE$ $\Delta ackA$ $\Delta IdhA::ldhL$ (<i>P. acidilactici</i>)	Cromosoma	Lote	L-lactato	NBS + Bet	Glucosa	2.1	0.95	Zhou, 2006
<i>E. coli</i> TG 108	<i>E. coli</i> B SZ 194	$\Delta pflB \Delta frd$ $\Delta adhE$ $\Delta ackA$ $\Delta IdhA::ldhL$ (<i>P. acidilactici</i>) Mejora en crecimiento y act LDH	Cromosoma	Lote	L-lactato	NBS + Bet	Glucosa	2.3	0.98	Grabar, 2006
<i>E. coli</i> TG114	<i>E. coli</i> B	SZ 194 $\Delta msgA$	Cromosoma	Lote	D-lactato	NBS + Bet	Glucosa	2.88	0.98	Grabar, 2006
<i>E. coli</i> YYC 202		$\Delta pfl \Delta poxB$ Δpps $\Delta aceEF$	Cromosoma	Lote alimentado	D-lactato	GAM	Glucosa	5.6	0.95	Zhu, 2007
<i>E. coli</i> ALS 974	<i>E. coli</i> YYC202	$\Delta pfl \Delta poxB$ Δpps $\Delta aceEF$ $\Delta frdABCD$	Cromosoma	Lote alimentado	D-lactato	GAM	Glucosa	6.3	0.99	Zhu, 2007
<i>E. coli</i> JU15	<i>E. coli</i> MG1655	$\Delta pflB,$ $\Delta adhE,$ $\Delta frdA,$ $\Delta xyIFGH$	Cromosoma	Lote	D-lactato	AM2	Glucosa (40g/L)	1.6	0.95	Este trabajo
							Glucosa (80g/L)	1.21	0.78	
<i>E. coli</i> JU15	<i>E. coli</i> MG1655	$\Delta pflB,$ $\Delta adhE,$ $\Delta frdA,$ $\Delta xyIFGH$	Cromosoma	Lote	D-lactato	AM2	Xilosa (40g/L)	1.3	0.95	Este trabajo
							Xilosa (80g/L)	0.48	0.7	

<i>E. coli</i> LL26	<i>E. coli</i> MG1655	$\Delta pfB, \Delta adhE,$ $\Delta frdA,$ $\Delta xyIFGH$ $\Delta IdhA::lctE$	Cromosoma	Lote	L-lactato	AM2	Glucosa (40g/L)	1.14	0.95	Este trabajo
							Glucosa (80g/L)	1.33	0.79	
<i>E. coli</i> LL26	<i>E. coli</i> MG1655	$\Delta pfB,$ $\Delta adhE, \Delta frdA,$ $\Delta xyIFGH$ $\Delta IdhA::lctE$	Cromosoma	Lote	L-lactato	AM2	Xilosa (40g/L)	1.23	0.95	Este trabajo
							Xilosa (80g/L)	0.42	0.69	

11.3 APÉNDICE C

La presentación del presente trabajo en foro nacional fue:

Laura J. Leal Reyes, Gerardo Huerta Beristain, Guillermo Gosset Lagarda, Alfredo Martínez Jiménez. Presentación oral “**INGENIERÍA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA PRODUCIR L-LACTATO**”. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco Guerrero México. Junio 2009.



INGENIERÍA METABÓLICA DE *Escherichia coli* PARA PRODUCIR L-LACTATO

Laura J. Leal Reyes, Gerardo Huerta Beristain, Guillermo Gosset Lagarda, Alfredo Martínez Jiménez
 Instituto de Biotecnología-UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa. Cuernavaca Mor. 62210
 Fax: 317 2388. Correo electrónico: lauleal@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Escherichia coli*, L-lactato, L-lactato deshidrogenasa.

Introducción. Una aplicación del lactato es la obtención de plásticos biodegradables a partir de su polimerización a polilactato (PLA), cuyas propiedades físicas y de degradación están conferidas por una elevada proporción del isómero L (1). La producción biotecnológica actual de lactatos es a partir de lactobacilos, los cuales requieren medios de cultivo complejos, que resultan caros para la obtención a gran volumen de PLA. *Escherichia coli* fermenta azúcares, en medios minerales simples, a una mezcla de productos de fermentación, incluyendo el D-lactato a partir de piruvato y la enzima estereoespecífica LDHA.

El objetivo del presente trabajo fue integrar en *E. coli* no fermentativa (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta ldhA$) el gen que codifica para la LDH (enzima estereoespecífica para L-Lactato de *Bacillus subtilis*), bajo el control del promotor nativo del gen *ldhA* y evaluar la producción de L-lactato en medio mineral.

Metodología. La integración cromosomal de *ldh* de *B. subtilis* en *E. coli* no fermentativa se llevó a cabo por el método reportado en (2). La cepa lactogénica generada (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta ldh::ldh_{bs}$) se caracterizó en mini-fermentadores (200 mL) no aireados, en medio mineral-40 g/L de glucosa, 37°C, 150 rpm controlándose a pH de 7 por medio de la adición de KOH 2N. Mediante HPLC se cuantificaron la glucosa y los productos de fermentación, y el L-lactato se confirmó con el analizador enzimático estereoespecífico para L-lactato.

Resultados y discusión. Los resultados obtenidos con el analizador bioquímico y por HPLC indican que la cepa modificada es capaz de producir L-Lactato ópticamente puro a partir de glucosa, demostrando que la integración de *ldh* de *B. subtilis* es funcional. La cepa convierte el 95% de la glucosa en L-lactato con tan solo 1.5 g/L de células en 48 h (Fig.1), sólo una mínima fracción (2 g/L) es transformada a acetato y succinato (datos no mostrados). La cepa progenitora (*E. coli* MG1655) cultivada en las mismas condiciones presenta una velocidad de crecimiento de 0.42 h⁻¹, mientras que la cepa L-lactogénica crece a 0.29 h⁻¹, probablemente debido a que la interrupción en el gen que codifica para la piruvato formato liasa (*pflB*) disminuye la generación de Acetil-CoA y de ATP en la vía de síntesis de acetato. En la cepa obtenida se inactivaron los genes que compiten por la disponibilidad del piruvato, por lo tanto la única vía para regenerar NAD⁺ y mantener el equilibrio redox es a través de la enzima heteróloga.

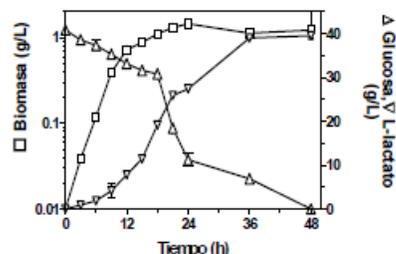


Fig. 1. Caracterización de la cepa L-lactogénica en medio mineral-glucosa 40 g/L en condiciones de fermentación.

Los lactobacilos presentan productividades volumétricas entre 1 y 4 g/L h de lactato en cultivos lote en medios ricos. En este trabajo el L-lactato se obtuvo ópticamente puro con una productividad volumétrica de 1.33 g/L h durante la fase de crecimiento. Trabajos previos (3) han demostrado que es posible generar cepas de *E. coli* productoras de L-lactato al reemplazar el gen *ldhA* de *E. coli* B con el gen *ldh* *Streptococcus bovis*. Estos autores obtuvieron un rendimiento de 0.61 g_{L-LACTATO}/g_{GLUCOSA} y una productividad volumétrica de 0.70 g/L h en medio rico-glucosa. Esto demuestra que *E. coli* modificada es una alternativa que permite competir con tecnologías actuales de producción de L-lactato, pero empleando condiciones y medios de cultivo simples.

Conclusiones. La cepa lactogénica es en términos prácticos homofermentativa y produce L-lactato a partir de glucosa con rendimientos del 95% respecto al teórico. La presencia de acetato es atribuible a que la cepa está empleando vías alternas de generación de acetil CoA y acetato.

Agradecimiento Fondos CONACyT-SAGARPA-2004-C01-22 y UNAM: PAPIIT-DGAPA-IN220908.

Bibliografía.

- Hieto, T. (2005). Polylactide stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation and applications. *Molec. Biosci.* 5: 589-597
- Datsenko, K, Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl. Acad. Sci USA.* 97: 6640-6645
- Dien, B. S. Nichols, N. (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 27: 259-264

Así mismo este trabajo se presentó en foro internacional:

Laura J. Leal-Reyes, Gerardo Huerta-Beristain, Guillermo Gosset Lagarda, Alfredo Martínez Jiménez. **L-LACTATE PRODUCTION USING METABOLICAL ENGINEERED *E. coli* STRAIN**. Society for Industrial Microbiology Annual Meeting 2009. Toronto, Ontario Canadá. Julio 2009.



Westin Harbour Castle - Toronto, ON Canada
July 26 - 30, 2009

Society for Industrial Microbiology 60th Anniversary 1949 - 2009

SIM Annual Meeting and Exhibition

Industrial Microbiology and Biotechnology

Sunday, July 26, 2009
P105

L-LACTATE PRODUCTION USING METABOLICALLY ENGINEERED *Escherichia coli*

Laura J. Leal-Reyes, Gerardo Huerta-Beristain, Guillermo Gosset, and Alfredo Martínez. Ingeniería Celular y Biotatálisis, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad 2001, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Cuernavaca, Mexico

Key words: *Escherichia coli*, *L-lactate*, *lactate dehydrogenase*

Lactate is being used to obtain the renewable and biodegradable polymer called PoliLactic Acid (PLA). PLA requires higher proportions of L-lactate to confer adequate physical and biodegradation properties. Currently, lactate is produced mainly by *Lactobacillus* species requiring complex media. Inexpensive media and simple conditions might be used with *E. coli* as biocatalyst. Under fermentative conditions, *E. coli* produces a mixture of compounds including D-lactate. The aim of this work was to engineer the *E. coli* metabolism to obtain a homolactic strain, with L-lactate as main product. For this purpose, a D-lactate producing strain was engineered using *E. coli* MG1655 as the progenitor strain. Pathways that compete for carbon availability were eliminated and the gene that codes for the L-lactic acid dehydrogenase gene (*ldhE*) from *B. subtilis* was used to replace the D-*ldhA* native gene. Previous works, using multicopy and inducible plasmids, had proven a cell toxicity effect when lactate dehydrogenase genes from *Bacillus* species are over-expressed in *E. coli*. The resulting strain (MG1655 *DpflB*, *DadhE*, *DfrdA*, *DldhA::ldhE*) was evaluated in non-aerated cultures using mineral medium containing 40 g/L of glucose. This strain converts 95% of glucose in optically pure L-lactate in 48 h with only 1.4 g/L of cells with a productivity of 0.8 g/ L.h. Our single copy construction into the *E. coli* chromosome showed very similar growth rates compared to the wild type strain, demonstrating non toxic effects and reliability for the production of the L-isomer.

–

Web Page: 132.248.32.1/~alfredo/

 PDF file

See more of Poster Session 1
See more of Posters

See more of The Annual Meeting and Exhibition 2009 (July 26 - 30, 2009)

En la participación en este evento, el trabajo fue acreedor al:

Best Outstanding Student Poster Presentation Award in Metabolic Engineering Area obtenido el 28 de Julio de 2009