



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

**EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE MEMBRANA GatC Y
SU APLICACIÓN EN *Escherichia coli* LACTOGÉNICA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. INGRID ALEXANDRA RONCANCIO SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ (IBT - UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. HUMBERTO FLORES SOTO (IBT-UNAM)

Dr. JOSÉ UTRILLA CARRERI (CCG-UNAM)

Cuernavaca, enero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente **Dr. LORENZO SEGOVIA FORCELLA**

Secretaria **Dra. CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA**

Vocal **Dr. LUIS CASPETA GUADARRAMA**

Vocal **Dra. CINTHIA ERNESTINA NÚÑEZ LÓPEZ**

Vocal **Dr. GERARDO CORZO BURGUETE**

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la realización del mismo se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto apoyado por el FONCICYT: SMIBIO - ERANet-LAC Número C0013 – 248192.

DEDICATORIA

A Dios, porque siempre tiene mejores planes que los míos.

A mi familia por su amor y apoyo.

A mis sobrinos Sofia y Gabriel.

En aquel Imperio, el Arte de la Cartografía logró tal Perfección que el mapa de una sola Provincia ocupaba toda una Ciudad, y el mapa del Imperio, toda una Provincia. Con el tiempo, estos Mapas Desmesurados no satisficieron y los Colegios de Cartógrafos levantaron un Mapa del Imperio, que tenía el tamaño del Imperio y coincidía puntualmente con él.

Menos Adictas al Estudio de la Cartografía, las Generaciones Siguietes entendieron que ese dilatado Mapa era Inútil y no sin Impiedad lo entregaron a las Inclemencias del Sol y los inviernos. En los desiertos del Oeste perduran despedazadas Ruinas del Mapa, habitadas por Animales y por Mendigos; en todo el País no hay otra reliquia de las Disciplinas Geográficas.

Suárez Miranda, *Viajes de Varones Prudentes*, Libro Cuarto, Cap. XLV, Lérica, 1658.

Jorge Luis Borges.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, por la oportunidad y confianza, al permitirme trabajar en su grupo, enseñarme de ingeniería metabólica e ampliar la frontera de mi conocimiento con sus valiosos aportes, por mejorar mi formación con sus críticas constructivas, regaños en buen sentido, gracias por su paciencia y sus consejos de vida.

A mi comité tutorial, por sus aportes y críticas mediante los exámenes tutorales:

Dr. Humberto Flores Soto, por su asesoramiento en la construcción de la librería, por los aportes y correcciones a este documento.

Dr. José Utrilla Carreri, por su asesoramiento en el desarrollo de este trabajo

A mi comité evaluador por sus aportes, especialmente a la Dra Claudia Martínez, la Dra Cinthia Núñez y Dr. Luis Caspeta por sus anotaciones y sustanciales mejoras de este documento.

A Q.I Luz María Martínez, por su apoyo técnico y su cariñoso valor personal.

A Aure y Manuel, gracias por su trabajo y dedicación, este siempre facilitó mi trabajo.

A M.C. Georgina Hernández, por el apoyo técnico con los equipos de HPLC y otros.

A todos mis compañeros de laboratorio, por sus aportes en los seminarios de grupo, seminarios del consorcio y por su compañía en el laboratorio.

Al Dr. Guillermo Gosset por su asesoramiento y aporte en los seminarios del consorcio.

Al Dr. Adelfo Escalante por su apoyo, cuidado, protección en el laboratorio y su aporte en los seminarios del consorcio.

A mi familia especialmente a mi mamá por su amor y fuerza incondicional, a mi papá por sus tiernas lágrimas de preocupación, a mis papos (Gabriel y Sofía) por su dulzura, sabiduría y amor incondicional, a sus mamás, por sus tiernos miedos, a mi esposo por su compañía, paciencia y amor incondicional a pesar de la distancia, gracias por recordarme el buen sentido del humor de Dios.

A mis amigos de siempre que comprenden mi necesidad vital de cambio y desde la distancia siempre me acompañaron en los días de nostalgia (Ana María Sotomonte Nieto, Marien Villamil, Dorita, Profe Ceci, Liz Murcia, Juanito, Victoria Grosso, Caro Wilches y Soul Anne)

A mis amigos y compañeros mexicanos que me han hecho replantear el sabor del café, las celebraciones alrededor de la comida, a apreciar las aguas de verduras con frutas, a extrañar el bullicio de los domingos en el tiangis, aprender de la dulzura de las consentidoras mamás mexicanas y ante todo la bondad y tesón ante la adversidad que hacen único y grande a México (Lizecilla, Aris, Che María, Julito María, Mike (Equipo), Yisús María, Erik María, Sinuhé, Joss y Nidia) y a los que suavizaron la nostalgia de la tierrita (Lina y Yerli).

A todos aquellos que de alguna u otra manera contribuyeron en el desarrollo de este trabajo.

Mil Gracias.

RESUMEN

La producción de ácido láctico a partir de residuos lignocelulósicos es posible por ingeniería metabólica al redirigir el flujo metabólico en la fermentación, mediante la eliminación selectivamente de las vías metabólicas que compiten con su producción. En *E. coli* MG1655 mediante la eliminación de los genes de *pfl* (piruvato formato liasa), *adh* (alcohol deshidrogenasa) y *frd* (fumarato reductasa) se generó la cepa CL3 (MG1655: $\Delta pflB \Delta adhE \Delta frd$) obteniendo rendimientos en la producción de lactato del 94% a costa de un 32% de la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre. Mediante la eliminación en CL3 del transportador XylFGH dependiente de ATP se mejoró la velocidad de crecimiento a un 47% manteniendo los rendimientos, al someter esta última cepa a un proceso de evolución adaptativa en medio de selección se generó la cepa JU15 con una mejora en velocidad de crecimiento de 67%, manteniendo los rendimientos.

Del análisis del genoma de JU15, se encontró que el efecto más significativo en la velocidad de crecimiento fue debido a una mutación puntual S184L en el gen de un transportador PTS-permeasa de galactitol (*gatC*). En ensayos de gen knockout de *gatCS84L* se demostró que su pérdida afecta prominentemente la velocidad de crecimiento en D-xilosa de la cepa de JU15. Esta mutación en este transportador permitió inferir que el transporte de azúcares al interior de *E. coli*, es crucial para disminuir los tiempos de fermentación y mejorar la productividad de los procesos biotecnológicos implicados en la obtención del producto de interés (ácido láctico) a partir de D-xilosa.

En este trabajo, se aplica la ingeniería metabólica y la ingeniería de proteínas para evaluar el efecto de la capacidad de transporte de D-xilosa sobre el rendimiento y los parámetros de la fermentación de la cepa *E. coli* CL3. Para esto se diseñó un fondo genético con capacidad disminuida para el transporte de D-xilosa. En el proceso se evaluó, el aporte en el transporte de D-xilosa de diferentes permeasas. El fondo diseñado se usó para estudiar por complementación el efecto en la fermentación de las variantes de un banco de mutantes del gen *gatC* y *gatCS184L* generado por evolución dirigida.

En la primera parte de este estudio se diseñó un fondo genético a partir de la cepa de *E. coli* CL3, inactivando metódicamente todas las permeasas reportadas implicadas en el transporte de D-xilosa, primero los genes del componente permeasa de los sistemas de transporte - ABC dependiente de ATP, genes *xyIFH* y *araH*, después, los genes de los simportes *xylE*, *araE*, *galP* y por último el gen de estudio la PTS permeasa galactitol *gatC*. En cada inactivación se valoró la capacidad de transporte de la mutante generada mediante la evaluación de los parámetros (μ , q_s y q_p) en fermentación microaerobia en minifermentadores en medio de selección.

A las condiciones de trabajado la evaluación de la velocidad específica de consumo de D-xilosa (q_s) permite inferir que la supresión del gen de la permeasa (*xyIH*) del transportador XylFGH es responsable de la pérdida del 80% de la velocidad de transporte de D-xilosa; sin embargo, la eliminación del gen de la permeasa (*araH*) del transportador AraFGH, restituye el 73% de la velocidad de transporte de D-xilosa, lo que parece sugerir que este transportador está regulando a XylFGH o hay un efecto metabólico debido al ATP. Luego, la eliminación del transportador XylE muestra una pérdida del 15%, muy inferior al reportado en la literatura del 70%, sin embargo, la eliminación del simporte AraE muestra una pérdida del 53% de la velocidad del transporte. La supresión del transportador GalP sugiere también un efecto regulatorio de este, ya que restituyó en un 30% la velocidad de transporte de la D-xilosa. Por último, la supresión del gen GatC disminuye en un 84% la velocidad de transporte de D-xilosa.

La medición de q_s a las condiciones de este estudio sugiere que las permeasas GatC y AraE transportan más D-xilosa, que el transportador específico XylE. La evaluación de estas mutantes parece sugerir que el transporte es un proceso complejo, que no depende solo de la afinidad por el sustrato de las diferentes permeasas, si no del efecto regulatorio de estas. La mutante Δ^6G (CL3:: $\Delta xyIF$, $\Delta araH$, *xylE*, $\Delta araE$, $\Delta galP$, $\Delta gatC$) que contiene todas las eliminaciones de los genes de las permeasas conocidas para el transporte de D-xilosa mantiene un 16% de velocidad de transporte con respecto a la cepa parental CL3 y muestra que hay otros mecanismos (pasivo o activos) involucrados en el transporte.

En la segunda parte de este estudio se usó la séxtuple mutante Δ^6G como hospedera de las clonas pCLGatC, pCLGatCS184L y plásmido pCL1920, a las cuales se le evaluaron los

parámetros cinéticos y como hospedera para complementar la actividad de un banco de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L generadas mediante epPCR, usando una tasa alta y baja probabilidad de mutación. El banco transformado y restituido se tamizo mediante enriquecimiento en cultivo en lote en medio de selección y espectomicina (50 mg/mL) en minifermentadores a condiciones microaerobias, 37°C, 150 rpm. Como parámetro de recambio de cada pase se usó como tope máximo una $O.D_{600\text{ nm}} \approx 1.0$, al alcanzarla se crioconservo una alícuota del cultivo y el resto se usó de inóculo para iniciar el siguiente pase de cultivo a una $O.D_{600\text{ nm}} \approx 0.01$. Se realizaron siete pases de enriquecimiento a los que se les evaluó la velocidad de crecimiento (μ). El rango de μ vario desde el primer pase de 0.037h^{-1} alcanzando un máximo en el pase 4 de 0.22h^{-1} y en los últimos pases se mantuvo en 0.18h^{-1} . Se aislaron 51 variantes de los pases 1, 4, 6 y 7, al extender la dilución 1×10^7 en cajas de agar LB con espectomicina 50 mg/mL

Se secuenciaron 5 variantes al azar del pase 1 tres derivadas de la clona GatCS184L (IR12, IR13, IR16) y dos derivadas de la clona GatC (IR18, IR19); 5 variantes del pase 4 todas derivadas de la clona GatCS184L (IR41, IR44, IR46, IR48, IR47); una variante del pase 6 derivada de la clona GatCS184L (IR61) y una variante del pase 7, derivada de la clona GatC (IR71). En el primer pase se encontraron varias mutantes con marco de lectura truncado, que codifican para una proteína pequeña no funcional al parecer, porque en los últimos pases todas las variantes secuenciadas conservan el tamaño original de la permeasa GatC.

Se midieron los parámetros cinéticos ($Y_{p/s}$, μ , q_s y q_p), a las clonas originales (pCL1920, pCLGatC y pCLGatCS184L) obteniendo en los tres casos $Y_{\text{lac/xil}}$ alrededor de 74% y μ respectivas de ($0.048 \pm 0.009\text{ h}^{-1}$, $0.106 \pm 0.009\text{ h}^{-1}$ y $0.134 \pm 0.010\text{ h}^{-1}$), q_s respectivas de ($1.58 \pm 0.58\text{ g/g}^*\text{h}$, $2.65 \pm 0.33\text{ g/g}^*\text{h}$ y $3.86 \pm 0.16\text{ g/g}^*\text{h}$) y q_p respectivas de ($0.036 \pm 0.020\text{ g/g}^*\text{h}$, $0.079 \pm 0.010\text{ g/g}^*\text{h}$ y $0.199 \pm 0.017\text{ g/g}^*\text{h}$) y a las variantes evolucionadas de los últimos pases (IR41, IR44, IR46, IR48, IR47, IR61 y IR71) tuvieron $Y_{\text{lac/xil}}$ superiores a 74%, μ que oscilan entre $0.214 \pm 0.008\text{ h}^{-1}$ a $0.166 \pm 0.002\text{ h}^{-1}$, q_s que oscilan entre $9.57 \pm 0.405\text{ g/g}^*\text{h}$ a $5.48 \pm 0.327\text{ g/g}^*\text{h}$ y q_p que oscilaron entre $0.208 \pm 0.009\text{ g/g}^*\text{h}$ a $0.139 \pm 0.026\text{ g/g}^*\text{h}$, lo que significa que todas las variantes aisladas en el últimos pases presentan una velocidad de consumos de D-xilosa mejorada con respecto a las permeasas parentales. Analizando los parámetros cinéticos se

observa que el aumento en la velocidad de consumo de D-xilosa permite mejorar la productividad volumétrica del proceso por arriba del doble del proceso comparado con el transportador silvestre GatC, estas variantes en el fondo genético diseñado tienen una ventaja de 8 a 18 h con respecto a la fermentación de las permeasas parentales.

Contenido

ABREVIACIONES	i
INTRODUCCIÓN	1
Revisión de literatura	4
Biorrefinerías	4
Lignocelulosa	4
Xilosa	5
Mecanismo de transporte de azúcares en <i>E. coli</i>	6
Transporte de D-xilosa en <i>E. coli</i>	9
Transportador ABC de alta afinidad – dependiente de ATP (XylFGH).....	9
Transportador simporte D-xilosa:H ⁺ , XylE	12
Estrategias para mejorar la fermentación de D-xilosa en <i>E. coli</i>.	13
Evolución dirigida	14
Error prone – PCR.....	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS.	19
Cepas, oligonucleótidos y plásmidos.	19
MÉTODOS DE INGENIERÍA GENÉTICA	22
Construcción del fondo genético de la librería.	22
Construcción del plásmido con las variantes parentales GatC y GatCS184L.....	23
MÉTODOS DE INGENIERÍA PROTEÍNAS.	27
Evolución dirigida del transportador GatC - epPCR.....	27
Vector pCL	29
Preparación de librería de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L.....	30
Librería de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L	32
Selección de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L.....	33
Selección de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L.....	34

Evaluación estructural de las variantes seleccionadas de las permeasas GatC y GatCS184L	34
MÉTODOS DE INGENIERA BIOQUÍMICA.....	35
Fermentación y condiciones de cultivo.....	35
Cultivos y determinación de los parámetros de la cinética de crecimiento de las cepas.	36
Métodos analíticos.....	37
Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cinéticas de crecimiento de las cepas.	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
CARACTERIZACIÓN DEL FONDO GENÉTICO	39
Eliminación de las permeasas de D-xilosa conocidas en la cepa de <i>E. coli</i> CL3.	39
Caracterización genotípica de las mutantes generadas y del fondo genético Δ^6G	44
Evaluación cualitativa del transporte de D-xilosa en medio MacConkey con D-xilosa 0.2% y en medio AM2 sólido con D-xilosa (0.2%).	47
Evaluación del efecto del transporte de D-xilosa en fermentación con el medio AM2	51
EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LA PERMEASA GatC Y SU DERIVADA GatCS184L.....	61
Clonación de las permeasas GatC y GatCS184L en el plásmido pCL	61
Caracterización de la capacidad de transporte de D-xilosa de las permeasas GatC y GatCS184L.....	64
Efecto de la velocidad de transporte de las cepas $\Delta^6G/pCLGatC$ y $\Delta^6G/pCLGatCS184L$ en microplacas a diferentes concentraciones de D-xilosa.	64
Evaluación de los parámetros cinéticos de las variantes parentales $\Delta^6G/pCLGatC$ y $\Delta^6G/pCLGatCS184L$ en minifermentadores en medio mínimo mineral AM2 con D-xilosa 40 g/L.	2
Construcción de la Librería de variantes epPCR de los genes parentales <i>gatC</i> y <i>gatCS184L</i>.	5
epPCR de los genes <i>gatC</i> y <i>gatCS184L</i>	5
Diversidad de la librería de los genes <i>gatC</i> y <i>gatCS184L</i>	7
Tamizado de la librería de variantes de la permeasa GatC y GatCS184L.	9
Selección y caracterización estructural de las variantes de la librería GatC y GatCS184L	10
Caracterización de los parámetros cinéticos de las variantes seleccionadas de la librería.	12
Análisis topológico de las variantes aisladas de GatC y GatCS184L	15
RESUMEN DE RESULTADOS	18
CONCLUSIÓN	21
PERSPECTIVAS.....	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
APÉNDICES.....	i

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Constantes de afinidad de los transportadores específicos de D-xilosa en <i>E. coli</i>	9
Tabla 2. Cepas usadas	19
Tabla 3. Cepas generadas	19
Tabla 4. Cepas donadoras usadas para la transducción con el fago P1	20
Tabla 5. cebadores empleados	20
Tabla 6. Plásmidos utilizados en el presente trabajo	21
Tabla 7. Condiciones de la mezcla de reacción de la epPCR usada para generar el banco de variantes (Leung, Chen, & Goedel, 1989).	27
Tabla 8. Condiciones de amplificación de la epPCR mutagénica usadas en este estudio.	28
Tabla 9. Reacciones de digestión	28
Tabla 10. Eficiencia de amplificación de la epPCR	29
Tabla 11. Cantidades evaluadas para probar el efecto de la relación <<inserto – vector>>	30
Tabla 12. Condiciones de ligación.	30
Tabla 13. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas evaluadas en minifermentadores usando medio AM2 suplementados con 40 g/L de D-xilosa y control de pH automatizado con KOH 2N a 37°C y 150 rpm	57
Tabla 14. Mutaciones presentes en la librería del gen <i>gatC</i>	6
Tabla 15. Mutaciones presentes en la librería del gen <i>gatCS184L</i>	6
Tabla 16. Tamaño de la librería	7
Tabla 17. Composición de librería de mutantes estimada con PEDEL-AA usando los parámetros estimados en la secuenciación de epPCR	8
Tabla 18. Mutaciones en las variantes Seleccionadas y Secuenciadas de la librería	10
Tabla 19 Comparación de los parámetros cinéticos entre las permeasas <i>GatC</i> y <i>GatCS184L</i> y las variantes seleccionadas de los últimos pases.	14

ÍNDICE DE FIGURAS


Figura 1 Biorefinerías de segunda generación, la lignocelulosa puede ser convertida a bioproductos a través de hidrólisis seguida por fermentación o en un bioproceso consolidado que combina los dos procesos en un solo reactor (Modificado de Menon & Rao, 2012).	4
Figura 2. Ilustración de los principales sistemas de transporte de azúcares en <i>E. coli</i> . La mayoría de los carbohidratos son internalizados por tres sistemas de transporte principales: Transportadores dependientes de ATP, Simportes de protones y transportadores dependientes del PEP (Modificado de Naftalin & De Felice, 2012).....	6
Figura 3. Mecanismo de regulación de AraC y XylR del metabolismo de pentosas. (Modificado de (Groff et al., 2012)).	8
Figura 4. Esquema de la organización modular del transportador XylFGH (Jojima et al., 2010).	10
Figura 5. Organización del operón de D-xilosa. Los genes <i>xylAB</i> codifican las enzimas del catabolismo de la D-xilosa y los genes <i>xylFGH</i> codifican el componente de transporte (transportador XylFGH). El gen <i>xylR</i> codifica el regulador transcripcional de los genes <i>xyl</i> (Choudhary, 2008; Keseler et al., 2013).....	11
Figura 6. A) Representación eestructural del simporte MFS de D-xilosa que cotransporta protones () (Jojima et al., 2010) y B) organización del operón monocistrónico <i>xylE</i> inducible por D-xilosa, por predicción mediante dos posibles promotores dependientes de σ_{24} se realiza su transcripción (Keseler et al., 2013).	12
Figura 7. Mecanismo propuesto del efecto de los iones divalentes en la especificidad de la enzima ADN polimerasa durante la replicación, I) El Mn^{+2} altera la conformación del sustrato al formar un complejo coordinado con los grupos fosfatos del sustrato, II)El ion Be^{+2} induce cambios en la conformación de la enzima y estabiliza la formación de un complejo de coordinación del ion Mg^{+2} con los grupos fosfatos del sustrato y III) a alta concentración de Mn^{+2} rodea a las Tiaminas de la hebra de ADN de templado e inducen alteraciones en la especificidad de la enzima por la base. (Zakour et al., 1981)	16
Figura 8. Estrategia de clonación general del gen de la permeasa <i>GatC</i> en el vector de expresión pCL1920.	23
Figura 9. Esquema de la estrategia usada para la construcción del plásmido pCLGatCS184L.....	25
Figura 10. Esquema general de la construcción de la librería de variantes del gen <i>gatC</i> y <i>gatCS184L</i>	31
Figura 11. Transducción con el fago P1. En la fila (a) se observan las células lisadas de la cepa KEIO 1897 (cajas 2-4) con el fago P1 junto al control negativo de células y fagos (cajas 1 y 5), los fagos generados en este paso fueron usados en la fila (b) donde se pueden ver colonias de la cepa receptora CL3 Δ xylF (Δ F) transformadas con el fenotipo de resistencia a Km^{40} (caja 2-4) y los controles positivos de células y fagos (cajas 1 y 5).	39
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la comprobación mediante PCR de la eliminación del gen <i>xylF</i> con los oligos para región del gen <i>xylFGH</i> 1.Escalera_1Kb_Invitrogen® 2.Cepa_MG1655 3.Cepa_CL3 4.Cepa_KEIO_xylF 5.Colonia_ΔF#1 6.Colonia_ΔF#2 7.Colonia_ΔF#15 8.Colonia_ΔF#22 9.Clon_ΔF::Km#1 10.Clon_ΔF::Km#2.....	40
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para comprobar la eliminación del gen <i>araH</i> con los oligos para la región del gen <i>araFGH</i> 1.Escalera_1Kb_Invitrogen® 2.Cepa_MG1655 3.Cepa_CL3 4.Cepa_ΔF 5.Cepa_KEIO_AraH 6.Clones_Δ ² H::Km(1-10) 7.Clon_Δ ² H#4 8.Clon_Δ ² H#6 9.Clones_Δ ² H(10-15) 10.Clones_Δ ² H (15-20)	40
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para comprobar la eliminación del gen <i>xylE</i> 1.Escalera_1Kb_Invitrogen® 2.Cepa_MG1655 3.Cepa_Cl ₃ 4.Cepa_JU15ΔΔ::Cm 5.Cepa_KEIO_XylE 6.Cepa_Δ ² H 7.Clones_Δ ³ E::Km(1-5) 8.Clones_Δ ³ E::Km(6-10) 9.Clones_Δ ³ E(1-5) 10.Clones_Δ ³ E(6-10).	41
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para comprobar la eliminación del gen <i>araE</i> 1.Escalera_1Kb_Invitrogen®, 2_Cepa_MG1655, 3.Restrictión_BsaHI_MG1655, 4.Cepa_Δ3E, 5.Restrictión_BsaHI_Δ3E, 6.Clones_Δ4E::Km_(1-5), 7.Clones_Δ4E::Km_(6-10), 8.Restrictión_BsaHI_Δ4E::Km_(1-5), 9.Restrictión_BsaHI_Δ4E::Km_(6-10) , 10.Clon_Δ4E:Km#1_pCP20.....	42

Figura 16 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para detectar la eliminación del gen *gatC* en las clonas aislados de la transducción de la clona Δ^4E . MP. Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.Clonas 1_5 2.Clonas 6_10 3.Clonas del 11_15 4.Clonas del 16_20 5.Clonas 21_25 6.Clonas 26_30 7.Cepa MG1655 8.Cepa CL3. 9. Cepa JU15. 42

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR eliminación del gen *galP* en las clonas aislados de la transducción de clon Δ^5G con el oligo K2 y el oligo GalPrv 1.Clonas 1_4 2.Clonas 5_8 3.Clonas del 9-13 4.Clonas del 14-18 5.Clonas 19_23 6.Clonas 24_28 7.Clonas 29_32 8.Cepa CL3 9.Cepa silvestre. 10.Clona #4 11.Cepa KEIO ECK2938 PM.Escalera_1Kb_Invitrogen®. Se comprueba la eliminación porque en la cepa silvestre MG1655 y parental CL3 no hay amplificación por la ausencia del gen de resistencia a Kanamicina presente en las clonas aisladas. 43

Figura 18. Confirmación por PCR del fondo común MG1655: Δ pfl Δ adhE Δ frdA El orden de las muestras en todos los geles es 1. Escalera_1Kb_Invitrogen® 2. Cepa MG1655 3. Cepa CL3 4. JU15 5. Δ F 6. Δ^2H 7. Δ^3E 8. Δ^4E 9. Δ^5P 10. Δ^6G . Se observa la pérdida en todas las cepas mutantes del gen presente en la cepa silvestre MG1655. 44

Figura 19. Confirmación por PCR de la eliminación del gen *xylF* MP.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G . Se observa la pérdida del gen a partir de la clona Δ F y su presencia en las cepas posteriores, en el caso de la cepa JU15 el tamaño de la banda es menor porque no tiene el operón completo *xylFGH*. 44

Figura 20. Confirmación por PCR de la eliminación del gen *araH* MP.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G . Se observa la pérdida del gen a partir de la clona Δ^2H y el mantenimiento de la eliminación en las cepas posteriores a esta cepa. 45

Figura 21. Confirmación por PCR de la eliminación del gen *xylE* MP.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G . Se observa la pérdida del gen a partir de la clona Δ^3E y la conservación de esta característica en las clonas posteriores. 45

Figura 22. Confirmación por PCR de la eliminación del gen del simporte *AraE* MP. Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3. JU15 4. Δ F 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G . Se observa la eliminación del gen a partir de la clona Δ^4E y la conservación de esta característica en las clonas posteriores. 45

Figura 23. Confirmación por PCR de la eliminación del gen *galP* 1.MG1655 2.CL3 3. JU15 4. Δ F 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G . MP. Escalera_1Kb_Invitrogen® Se observa la eliminación del gen *GalP* desde la clona Δ^5P y la conservación de esta característica en las clona posterior, no hay amplificación en las cepas finales porque los oligos se unen a una región interna del gen que se pierde en la recombinación con el gen de resistencia a Km. 46

Figura 24. Confirmación por PCR de la eliminación del gen *gatC*. MP.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G 46

Figura 25. Cajas de Petri de cultivos en medio MacConkey suplementado con D-xilosa 2g/L. 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G 47

Figura 26. Crecimiento aerobio de las mutantes en medio MacConkey suplementado con D-xilosa 2 g/L. Las mutantes se crecieron a la misma $O.D_{600nm} \approx 1$ y se sembraron a un factor de dilución de 1×10^{-6} . Se observa que a partir de la pérdida del transportador *XylE* (Δ^3E) hay una pérdida de la capacidad de consumo de D-xilosa, por la variación de la coloración de rojo a rosado. 48

Figura 27 Contexto genético del gen *yggI*. Se observa al final de gen *galP* hay dos sitios promotores (*yggp3* y *yggp6*) dentro del gen *galP*, los cuales fueron eliminados durante la transducción con el fago P1 (tomado <https://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG12122#tab=TU>). 50

Figura 28. Velocidad de crecimiento y efecto del acondicionamiento en el crecimiento de las mutantes con capacidad de transporte de D-xilosa en AM2 suplementado con 5g/L de D-xilosa. a) sin acondicionamiento. b) con acondicionamiento,

resultados obtenidos después de 24h de desarrollo en microplacas de 96 pozos, cada respuesta es el promedio de 3 experimentos independientes.	52
Figura 29. Comparación de los parámetros cinéticos de las mutantes en medio AM2 suplementada con D-xilosa a 40 g/L velocidad de crecimiento (μ), velocidad de consumo de D-xilosa en fase exponencial (q_{s_ex}) y velocidad de consumo de D-xilosa en fase estacionara (q_{s_es}). Se observa una relación directa entre la velocidad de crecimiento y la velocidad de consumo	60
Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de restricción de los plásmidos pCLGatC y pCLGatCS184L. PM.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1_Inserto gen gatC 2. Plásmido pCLGatC 3_Plásmido pCLGatC digerido con PstI y NcoI 4. Plásmido pCLGatCS184L 5. Plásmido pCLGatCS184L digerido con PstI y NcoI 6. Plásmido pCLGatC digerido con PstI 7. Plásmido pCLGatCS184L digerido con NcoI.	61
Figura 31. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen gatC y gatCS184L.	63
Figura 32. Efecto de la concentración de D-xilosa en la velocidad de crecimiento de la cepa Δ^6G y cepas derivadas de la transformación con los plásmidos pCL1920, pCLGatC y pCLGatCS184L evaluadas en microplacas con medio AM2.....	i
Figura 33 Comparación de crecimiento máximo de las cepas Δ^6G y los plásmidos pCL1920, pCLGatC y pCLGatS184L en minifermentadores en medio AM2 suplementado con 40 g/L de D-xilosa a pH controlado.	3
Figura 34 Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas Δ^6G y los plásmidos pCL1920, pCLGatC y pCLGatS184L. ex: fase exponencial; s: fase estacionaria.	4
Figura 35 colonias recuperadas de 200 μ L de medio de recuperación SOC con células electrocompetentes Δ^6G transformadas con A) plásmido pCL1920, B) plásmido pCLGatC y C) plásmido pCLGatCS184L.	8
Figura 36. Gráfica de velocidad de crecimiento promedio durante el proceso de tamizaje de la librería mediante pases seriales en minifermentadores a pH controlado con el medio de selección. Los puntos en color (amarillo) son los pases que se eligieron para enviar a secuenciar variantes.....	9
Figura 37 Topología de las variantes con mayor actividad usando OCTUPUS.	16

ABREVIACIONES

A	Adenina	$\Delta^6\text{G/pCLGatC}$	Cepa $\Delta^6\text{G}$ transformada con el plásmido pCLGatC.
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos	$\Delta^6\text{G/pCL1920}$	Cepa $\Delta^6\text{G}$ transformada con el plásmido pCL1920.
bp	Pare de bases	$\Delta^6\text{G/pCLGatCS184L}$	Cepa $\Delta^6\text{G}$ transformada con el plásmido pCLGatCS184L.
BSA	Albumina de suero bovina		
°C	Grados Celsius		
C	Citocina		
Cb	Carbenicilina		
dATP	Desoxiadenosina trifosfato		
dCTP	Desoxicitocina trifosfato		
dGTP	Desoxiguanina trifosfato.		
dNTP	Desoxinucleotidos trifosfato (mezcla de dATP, dCTP, dTTP, dGTP)		
DNA	Ácido desoxirribonucleico.		
etBr	Bromuro de etidio		
epPCR	Error prone PCR		
G	Guanina.		
HF	Alta fidelidad		
h	Horas		
IPTG	Isopropyl- β -d-tiogalactopiranososa.		
Km	Kanamicina		
<i>Km^R</i>	Gen de resistencia a kanamicina.		
pCL	Plásmido pCL1920 con el operon de promotor <i>Lac</i> con el ORF al inicio del sitio <i>NcoI</i> .		
mL	Mililitro		
MgCl₂	Cloruro de magnesio		
MnCl₂	Cloruro de manganeso		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm		
SD	Desviación estándar.		
Spe	Espectomicina		
T	Tiamina		
UV	Radiación ultravioleta		
μL	Microlitro		

INTRODUCCIÓN

La D-xilosa es el segundo azúcar polimerizado más abundante de la lignocelulosa (5-25%) y su porcentaje de recuperación por hidrólisis ácida es superior al de D-glucosa (Khankal, Chin, & Cirino, 2008); sin embargo, la velocidad específica de consumo de D-xilosa de hidrolizados lignocelulósicos es menor en comparación con el de D-glucosa en medios de laboratorio. El enfoque clásico para incrementar la conversión de D-xilosa en otros compuestos de interés por microorganismos ha sido mediante ingeniería de vías metabólicas (IVM), al optimizar el flujo de carbono por sustitución, supresión y/o mejoramiento de enzimas de la vía metabólica. Sin embargo, pocos trabajos se han enfocado en el primer paso de la vía: el transporte de azúcares hacia el interior del organismo. Dicho proceso es crucial para disminuir los tiempos de residencia y mejorar la productividad de los procesos de fermentación, por esta razón, en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de nuevos transportadores de membrana y la optimización de los existentes, mediante evolución dirigida (Young, Comer, Huang, & Alper, 2012).

E. coli es un microorganismo ampliamente estudiado para la conversión de azúcares provenientes de la lignocelulosa en biocombustibles y compuestos químicos orgánicos. Su rápido crecimiento, conocimiento de su genoma, la capacidad de producción de un amplio rango de metabolitos, requerimientos nutricionales simples, facilidad de utilización genética y capacidad natural para fermentar azúcares (pentosas como hexosas). Esto último hacen posible el uso de hidrolizados lignocelulósicos (mezcla de D-xilosa, D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa y D-galactosa) como sustratos para la producción de combustibles y compuestos químicos (Khankal et al., 2008).

Muchas enzimas se han originado por un proceso de divergencia y la selección natural para llevar a cabo distintas actividades metabólicas específicas. En el caso de los transportadores de membrana, estos se han adaptado para controlar el flujo de nutrientes y pequeñas moléculas. En general, los transportadores de membrana se clasifican en transportadores de la familia ABC dependiente de ATP (Tarr, Tarling, Bojanic, Edwards, & Baldán, 2009), la

superfamilia de transportadores (MFS), las proteínas simporte – H⁺, las proteínas simporte/antiporte – Na⁺, las proteínas uniportes y el complejo de transporte de azúcares (PTS) - PEP; este último presente solo en bacterias (P. J. Henderson & Maiden, 1990).

E. coli presenta diferentes tipos de transportadores de D-xilosa de tipo específicos, como el simporte XylE de baja afinidad (K_M 63-70 μM), perteneciente a las superfamilia de transportadores (MFS) y el de las proteínas XylFGH de alta afinidad (K_M 0.2 – 0.4 μM), pertenecientes a la familia (ABC) dependientes de ATP (Young et al., 2012); también presenta transportadores inespecíficos como AraFGH (K_M 4.1 – 6.1 μM)(Jojima, Omumasaba, Inui, & Yukawa, 2010) de la familia ABC y los simporte AraE (K_M 150–320 μM) (K. R. Daruwalla, Paxton, & Henderson, 1981) y GalP (K_M 50–450 μM)(P. J. F. Henderson, 1990).

La afinidad de los transportadores de pentosas en *E. coli* por sus respectivos sustratos es alta, por esto han sido usados para mejorar la capacidad de transportar pentosas en otros organismos, tales como: *Z. mobilis* (Ren, Chen, Zhang, Liang, & Lin, 2009), *S. cerevisiae* (Jojima et al., 2010; Lian, Li, HamediRad, & Zhao, 2014; Wang, Shen, Hou, Suo, & Bao, 2013; Young et al., 2012), *C. glutamicum* y *B. subtilis* (Jojima et al., 2010)). Esto ha evidenciado, la importancia de estos en la optimización del consumo de pentosas y su conversión en productos de fermentación. Sorprendentemente, pocos estudios se han realizado en la caracterización molecular de nuevos transportadores en *E. coli* y su aplicación en mejorar la fermentación de pentosas.

En el laboratorio de Ingeniería Metabólica de Bacterias (Utrilla Carreri et al., 2012), usando ingeniería metabólica y un proceso de evolución adaptativa, obtuvieron la cepa de *E. coli* JU15 capaz de fermentar eficientemente D-xilosa (Xyl) a D-Lactato (Lac) (0.95 gLac/gXyl). Estudios de genómica y proteómica cuantitativa, mostraron que entre multiplex variaciones una mutación (S184L) en una proteína transportadora de galactitol GatC (35kDa, 427 aminoácidos), la cual ha sido propuesta como el componente IIC del sistema PTS - galactitol (4.A.5.1.1) (Nobelmann & Lengeler, 1996). La eliminación del gen *gatC* y *gatC* S184L, de las cepas progenitoras y

evolucionadas respectivamente, demostró que GatC participa del transporte de D-xilosa en condiciones de fermentación, y que la variante S184L es la responsable del fenotipo de mayor velocidad de consumo de D-xilosa (de 1.40 g_{XYL}/g_{CEL}.h a 2.70 g_{XYL}/g_{CEL}.h) y del aumento de la productividad volumétrica de conversión de D-xilosa a D-Lactato (de 0.53 gLac/L.h a 0.79 gLac/L.h) (Utrilla Carreri et al., 2012).

Con base en lo reportado (Utrilla Carreri et al., 2012), en este proyecto se generaron variantes de la proteína transportadora de membrana GatC obtenidas por mutagénesis aleatoria. Se identificaron variantes con una mayor velocidad de consumo y se logró un aumento del doble de la productividad en la fermentación de D-xilosa y producción de D-Lactato y los cambios presentes en ellas se ubicaron en un modelo topológico de la proteína.

REVISIÓN DE LITERATURA

Biorrefinerías

A nivel mundial, 10% de la basura es desecho agroindustrial. En países emergentes, gran

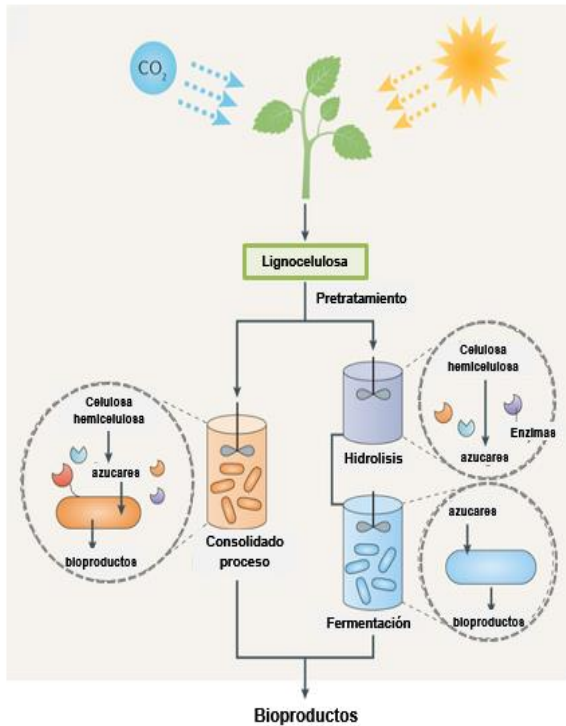


Figura 1 Biorrefinerías de segunda generación, la lignocelulosa puede ser convertida a bioproductos a través de hidrólisis seguida por fermentación o en un bioproceso consolidado que combina los dos procesos en un solo reactor (Modificado de Menon & Rao, 2012).

parte de estos residuos son quemados y eliminados a cielo abierto y son fuente de gases de efecto invernadero (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996). No obstante, estos pueden ser hidrolizados para la obtención de azúcares fermentables, lo que los convierte en una fuente de materia prima prácticamente inagotable para la generación de productos de alto valor agregado y base de una segunda generación de biorrefinerías basadas en la fermentación de hidrolizados de lignocelulosa (Figura 1); sin provocar los problemas económicos y sociales generados del aumento del precio de los alimentos usados para producir jugo de caña de azúcar y almidón de maíz, base de las biorrefinerías de primera generación (Menon & Rao, 2012).

Lignocelulosa

Los residuos lignocelulósicos son más de la mitad de fitomasa agrícola del mundo. Gran parte de estos residuos pueden usarse sin competencia con otras aplicaciones, convirtiéndolo en la fuente más abundante de biomasa inutilizada. El componente principal, la celulosa, es un homopolímero cristalino lineal conformado de D-glucosa. La lignocelulosa está compuesta de tres fracciones de biopolímeros, celulosa (40-50%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (15-20%) y otros componentes extraíbles. La hemicelulosa es un heteropolímero compuesto en su mayoría por xilosa (xilano). La lignina es un polímero de compuestos aromáticos no

fermentables, por eso solo la fracción de celulosa y hemicelulosa son usadas en la fermentación (Abramson, Shoseyov, & Shani, 2010).

Al hidrolizar la fracción hemicelulósica se produce una mezcla de azúcares de tipo hexosas (10%) como D-glucosa, D-manosa, D-galactosa y tipo pentosas (90%) como D-xilosa y L-arabinosa. La proporción y el tipo de azúcares varia, dependiendo de la planta usada y el pretratamiento usado. Aunque todos los azúcares pueden ser fermentados, las pentosas no son metabolizadas por todos los microorganismos (Khankal et al., 2008) y pocos poseen la batería enzimática necesaria para metabolizarlas completamente. En los organismos que las metabolizan, para obtener productos de interés comercial, se deben canalizar las vías existentes hacia la bioconversión de un único compuesto de interés, mediante ingeniería de vías metabólicas (IVM) y biología sintética, mediante la eliminación de vías alternas e introducción de enzimas o vías heterólogas que mejoren los rendimientos, productividad y concentración (Choudhary, 2008).

Xilosa

Constituye al menos el 30% del total de la biomasa y es el principal constituyente del xilano. Es el segundo azúcar más abundante en la naturaleza, comprende el 25% de la composición de las angiospermas. Es relativamente fácil liberar xilosa de la hemicelulosa mediante tratamientos térmicos e hidrolíticos, dependiendo del tipo de sustrato y las condiciones de reacción, se pueden recobrar entre un 60 – 90% de pentosas de los materiales lignocelulósicos. Al hidrolizar con ácidos diluidos se puede obtener rendimientos de D-xilosa (a partir de xilano) entre el 80% y 95% (Desai & Rao, 2010).

La D-xilosa después de la D-glucosa, es el azúcar más abundante en los hidrolizados lignocelulósicos y en la naturaleza; la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* metaboliza este azúcar inicialmente por la vía de las pentosas. Su contenido en hidrolizados de lignocelulosa varía dependiendo del origen de la biomasa, la cual contiene entre 5 – 20% de xilano (Li, Chen, Wang, & Qi, 2007). *E. coli* nativas o con vías metabólicas recombinantes para D-xilosa pueden metabolizarla a diferentes bioproductos. Esta se metaboliza por la vía de las pentosas fosfato

(PPP) y se conecta por algunos intermediarios al metabolismo intermedio y a la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas para generar productos finales del metabolismo, de la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos aromáticos y lípidos (Jeffries & Thomas W. Jeffries, 1998). Para reducir los costos de producción de compuestos con alto valor agregado desde lignocelulosa, es importante estudiar el metabolismo, transporte y mecanismos involucrados en la eficiente fermentación de D-xilosa y aunque ha sido el foco de investigación en los últimos años, hasta el momento, la utilización eficiente de pentosas es aún insatisfactoria para aplicaciones industriales.

Mecanismo de transporte de azúcares en *E. coli*

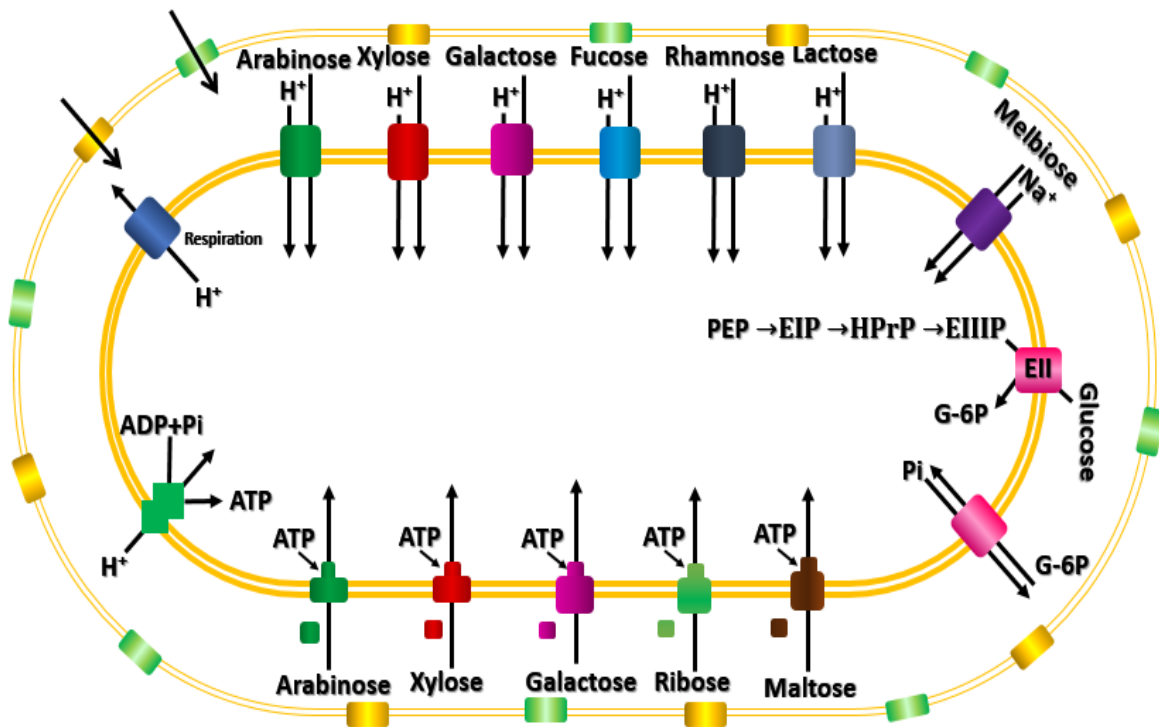


Figura 2. Ilustración de los principales sistemas de transporte de azúcares en E. coli. La mayoría de los carbohidratos son internalizados por tres sistemas de transporte principales: Transportadores dependientes de ATP, Simportes de protones y transportadores dependientes del PEP (Modificado de Naftalin & De Felice, 2012).

El transporte a través de la membrana celular es el primer paso en el metabolismo de cualquier carbohidrato y en gran medida este paso determina la velocidad de su utilización. El transporte de azúcares (Figura 2) puede llevarse a cabo principalmente por tres mecanismos: a) transporte

pasivo o difusión, el más simple de los procesos, el cual se incrementa con la concentración del soluto y es independiente del pH y agentes desacoplantes; b) difusión facilitada, el cual no requiere de energía metabólica, emplea un gradiente de concentración y está unido a un equilibrio de concentración dentro y fuera de la célula como la difusión pasiva, sin embargo, es mediada por una proteína cargadora que exhibe especificidad por el sustrato; y c) transporte activo, mediado por proteínas cargadoras que exhiben propiedades de saturación, especificidad de sustrato e inhibición específica; este proceso requiere de energía para transportar los azúcares, proveniente de la hidrólisis del ATP o por translocación de grupos como el fosfoenolpiruvato (PEP) (Jeffries & Thomas W. Jeffries, 1998).

La hidrólisis de compuestos lignocelulósicos genera una mezcla de azúcares (principalmente D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa). *E. coli* puede consumir todos estos azúcares; sin embargo, cuando se expone a una mezcla, selecciona la fuente de carbono que soporta la máxima velocidad de crecimiento. Para ello usa un sistema complejo que le permite percibir la presencia de cada nutriente, debido a esto su crecimiento presenta un desarrollo diauxico característico, donde ajusta su capacidad catabólica, para el consumo jerárquico de azúcares, especialmente D-glucosa antes de cualquier otro azúcar. Este mecanismo de regulación es llamado represión catabólica por carbono, CCR (por sus siglas en inglés: Carbon Catabolic Represion) (Gonzalez, Tao, Shanmugam, York, & Ingram, 2002), el cual involucra múltiples niveles de regulación que son dependientes de la concentración de estos azúcares, la especificidad de los transportadores y la velocidad de metabolización (Desai & Rao, 2010).

La habilidad de *E. coli* para metabolizar pentosas es muy baja (comparada con el de D-glucosa), y aunque se sobreexpresen los genes funcionales del catabolismo de las pentosas, la cantidad de azúcar metabolizado es insuficiente, debido a: 1) Al proceso de CCR, que lleva a un consumo secuencial e incompleto de azúcares; 2) El desbalance celular Redox en el metabolismo de las pentosas; y, 3) el transporte ineficiente de estos azúcares por la baja especificidad y velocidad de los transportadores de pentosas (Jojima et al., 2010).

El consumo simultáneo de azúcares en una mezcla es ventajoso en un proceso fermentativo, ya que puede eliminar el desarrollo en fases (crecimiento diaúxico) y reducir los tiempos de operación e incrementar la productividad. Sin embargo, así como *E. coli* consume preferencialmente glucosa también muestra jerarquía en el consumo de las pentosas. En el caso del metabolismo de la D-xilosa y L-arabinosa de forma similar, se ha reportado una preferencia.

En *E. coli* las pentosas D-xilosa y L-arabinosa son importadas mediante transportadores de alta

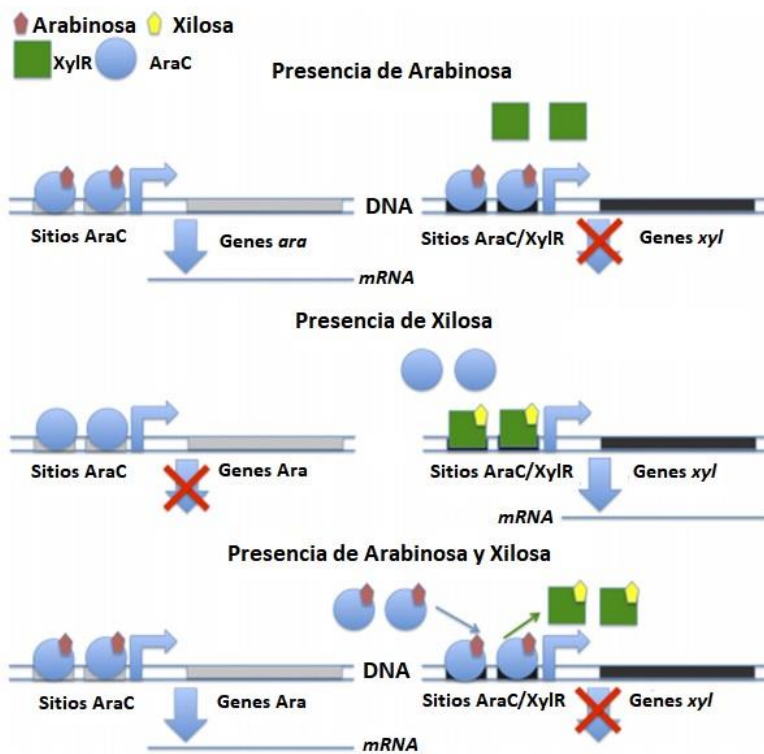


Figura 3. Mecanismo de regulación de AraC y XylR del metabolismo de pentosas. (Modificado de (Groff et al., 2012)).

afinidad tipo ABC dependientes de ATP, AraFGH para arabinosa y XylFGH para xilosa y adicionalmente tiene transportadores de baja afinidad tipo MFS dependientes del cotransporte de H⁺; para L-arabinosa (AraE) y para D-xilosa (XylE), respectivamente (Luo, Zhang, & Wu, 2014).

Los operones específicos de D-xilosa (*xylE*, *xylFGH*, *xylIAB*) son regulados por XylR y el sistema cAMP-Crp. A su vez estos operones son controlados por el gen de regulación global *Mlc* que controla primariamente al operon *pts* que

codifica a las enzimas I y HPr y a los genes *ptsG* para la toma de D-glucosa y *manXYZ* para la toma de manosa y son reprimidos por él, durante el crecimiento en D-xilosa (Gonzalez et al., 2002). Como se observa (Figura 3) cuando en el sistema también hay presencia de L-arabinosa

se expresa *araC* el cual reprime la transcripción de los genes *xyl*, y activa la transcripción de los genes del catabolismo de la L-arabinosa (V. Hernández-Montalvo, Valle, Bolivar, & Gosset, 2001). Como resultado de la regulación positiva de cAMP-Crp, cuando la D-xilosa se une a XylR activa la transcripción de los operones *xylFGH*, *xylAB* y *xylE* y reprime la transcripción del catabolismo de la L-arabinosa (Desai & Rao, 2010). XylR es un regulador positivo tipo-AraC y también activa la transcripción de los operones *araBAD*, *araE* y *araFGH* pero reprime la transcripción del operon *araC* (Song & Park, 1997).

Transporte de D-xilosa en *E. coli*

La D-xilosa es transportada en *E. coli* por tres rutas, a) La principal vía envuelve al transportador XylFGH de alta afinidad dependientes de ATP de la superfamilia de transportadores ABC, y es responsable del transporte de D-xilosa cuando la concentración fuera de la célula es baja (Sumiya, Davis, Packman, McDonald, & Henderson, 1995); b) La segunda vía es la del simporte XylE de baja afinidad responsable del paso de D-xilosa cuando la concentración fuera de la célula es alta (Jojima et al., 2010); c) la tercera vía no ha sido caracterizada, se presume que es mediante difusión o por un sistema complicado de transportadores inespecíficos (Khankal et al., 2008).

Tabla 1. Constantes de afinidad de los transportadores específicos de D-xilosa en *E. coli*

Transportador	K _M aparente	Referencia
XylFGH	0.2 -4.0 μM	(Sumiya et al., 1995)
XylE	63-170 μM	(Sumiya et al., 1995)

Transportador ABC de alta afinidad – dependiente de ATP (XylFGH)

El transportador XylFGH fue descubierto por David y Wiesmeyer en 1970 (Rosenfeld, Stevis, & Ho, 1984). Este transportador ABC es una proteína integral de membrana que traslada activamente D-xilosa contra el gradiente de concentración usando la energía de hidrólisis de ATP. Es codificado por el operón *xylFGH* y estructuralmente es un complejo proteico modular que consiste en la proteína XylG de unión a ATP, una proteína periplasmática XylF de unión a

sustrato y el componente de membrana del sistema transportador ABC, la permeasa XylH (Figura 4).

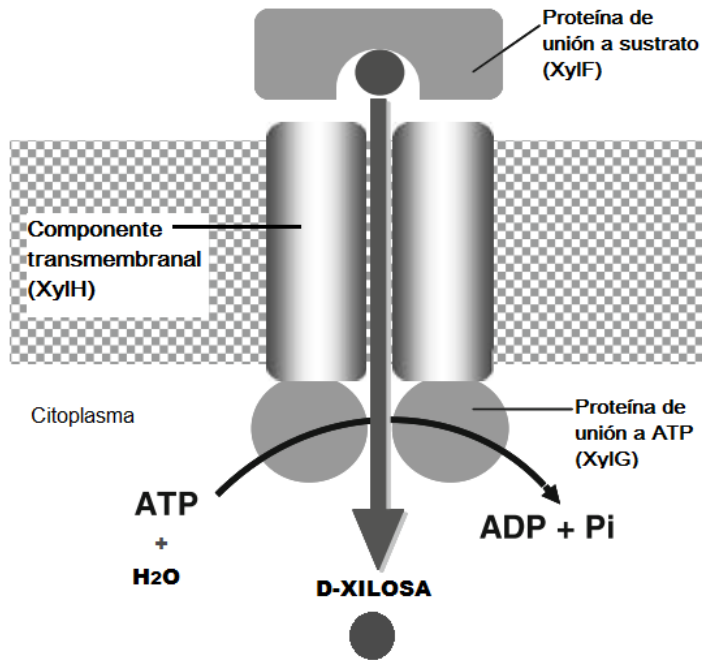


Figura 4. Esquema de la organización modular del transportador XylFGH (Jojima et al., 2010).

El transportador es sintetizado en respuesta a la presencia de D-xilosa, por acción del factor transcripción XylR, que se une a la región promotora de los operones *xylAB* y *xylFGHR*, activando su transcripción (Figura 5). En ausencia de D-glucosa o arabinosa, altas concentraciones del complejo cAMP-CRP, activan a XylR e activan el metabolismo de D-xilosa. Esto se logra al activar la expresión de los genes *xylA* y *xylB* que codifican para la D-xilosa isómerasa y xiluloquinasa, respectivamente, las cuales convierten D-xilosa en xilulosa-5-fosfato (Pratish Gawand, 2014).

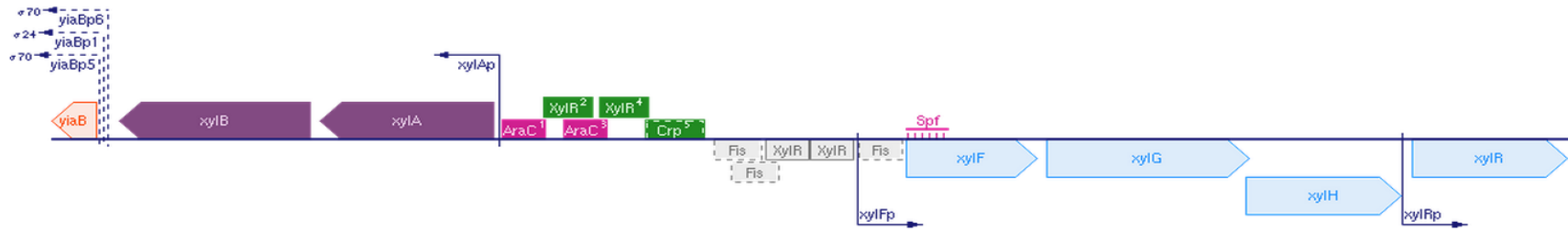


Figura 5. Organización del operón de D-xilosa. Los genes *xylAB* codifican las enzimas del catabolismo de la D-xilosa y los genes *xylFGH* codifican el componente de transporte (transportador *XylFGH*). El gen *xylR* codifica el regulador transcripcional de los genes *xyl* (Choudhary, 2008; Keseler et al., 2013).

Adicionalmente al mecanismo de regulación global cAMP-CRP, la utilización de D-xilosa es también regulada por el factor de transcripción AraC, involucrado en el transporte y metabolismo de arabinosa. Entre D-xilosa y L-arabinosa, *E. coli*, consume preferencialmente arabinosa (V. Hernández-Montalvo et al., 2001). El mecanismo de represión de D-xilosa mediado por arabinosa ocurre a nivel transcripcional por unión al factor AraC, que se une a la región promotora del gen *xylA* evitando de esta forma, la unión de XylR a la región promotora y por tanto la activación del metabolismo de la D-xilosa (Khankal et al., 2008).

Transportador simporte D-xilosa:H⁺, XylE

En 1979 Shamana y Anderson, dedujeron a partir de la caracterización cinética del sistema D-xilosa permeasa XylFGH la existencia de otro sistema de transporte (Shamanna, Sanderson, Shamannat, & Sanderson, 1979). En 1980 Lam y colaboradores, aislaron una proteína pequeña transportadora de D-xilosa, XylE, la cual mostró ser dependiente del pH, inhibida por agentes desacoplantes e insensible a arsenito (E. O. Davis, Jones-Mortimer, & Henderson, 1984; Elaine O. Davis & Henderson, 1987).



Figura 6. A) Representación eestructural del simporte MFS de D-xilosa que cotransporta protones (●⁺) (Jojima et al., 2010) y B) organización del operón monocistrónico *xylE* inducible por D-xilosa, por predicción mediante dos posibles promotores dependientes de σ_{24} se realiza su transcripción (Keseler et al., 2013).

XylE es un simporte de protones (Figura 6), que pertenece a la superfamilia de transporte facilitado (MFS), las cuales son proteínas capaces de transportar solutos en respuesta a un gradiente electroquímico ($\Delta\mu_{H^+}$; interior alcalino). XylE es una proteína altamente hidrofóbica y presenta un alto grado de identidad estructural con otros simportes como AraE, GalP y MglP. Este transportador inhibe la translocación de la D-xilosa en presencia de D-glucosa (Khankal, 2009).

Estrategias para mejorar la fermentación de D-xilosa en *E. coli*.

En el proceso de fermentación, las proteínas involucradas en la translocación de azúcares son el primer paso en la vía metabólica y son decisivas para el transporte tanto pasivo como activo de azúcares y otros elementos a través de la membrana. En los últimos años la elucidación y caracterización de nuevos transportadores se ha facilitado con la secuenciación completa de varios genomas bacterianos y ha permitido ampliar el espectro de los transportadores conocidos (Sasaki, Jojima, Kawaguchi, Inui, & Yukawa, 2009).

A nivel industrial, la caracterización y optimización de estos transportadores tiene un papel esencial en el diseño de cepas eficientes para la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos (Pratish Gawand, 2014). Entre los microorganismos usados a nivel industrial *E. coli*, es de los pocos que es capaz de metabolizar todos los azúcares presentes en los hidrolizados lignocelulósicos; desafortunadamente, los consume secuencialmente y selecciona preferencialmente a la D-glucosa e inhibe el transporte y metabolismo de los otros azúcares (hasta que se agota en el medio de cultivo la D-glucosa) mediante el proceso de CCR. En bacterias, la CCR es controlada por los estados de fosforilación de los componentes del sistema de transporte fosfotransferasa (PTS).

La estrategia clásica de la ingeniería de vías metabólicas para lograr el consumo simultáneo de la mezcla de azúcares ha sido diseñar cepas PTS⁻ o sobreexpresar transportadores no-PTS. Sin embargo, otra estrategia posible, complementaria y menos explorada, es la optimización de

proteínas transportadoras de azúcares mediante ingeniería de proteínas; sin embargo, hasta la fecha se han logrado pocos avances en este campo (Lian et al., 2014; Ren et al., 2009).

Evolución dirigida

Desde la década de los 70s se observó que las enzimas presentaban cierto grado de promiscuidad lo que les permitía reconocer diferentes sustratos. Esta ambigüedad fue interpretada como el potencial evolutivo que tienen las enzimas para adquirir nuevas especificidades. La deriva genética permite adquirir diversidad y de esta manera modificar los patrones de promiscuidad. Bajo esta premisa, en ausencia de detalles estructurales e información funcional de las proteínas, nuevas funciones pueden ser creadas por la introducción de mutaciones al azar, seguida de métodos de selección de variante que presenten las funciones deseadas (Lutz & Patrick, 2004).

Diferentes métodos se han usado para realizar mutaciones en sitios o regiones puntuales de un gen o para realizar cambios al azar en un gen específico. Los principales métodos de evolución dirigida son divididos en recombinantes y no recombinantes. El objetivo primario del diseño de proteínas es generar proteínas con mejores propiedades. Comúnmente se emplean dos estrategias para este fin: 1) la evolución dirigida; una poderosa herramienta para generar nuevas o mejores funciones moleculares, alterando la especificidad del sustrato o aumentando la estabilidad de la molécula; con un potencial para su aplicación en muchos campos, incluyendo la agricultura, medicina y la química (Cole & Gaucher, 2011). En esta se emplean librerías de variantes de una proteína y se busca aquella(s) con la propiedad(es) deseada(s); 2) el diseño racional, en el cual las proteínas son modificadas utilizando el conocimiento de la estructura y la función, con el fin de predecir el efecto que tendrá un cambio particular o un juego de cambios. Mientras la evolución dirigida es ampliamente apreciada por sus aplicaciones en diversos campos, la segunda estrategia es limitada por el insuficiente conocimiento que se tiene de la relación estructura – función de las proteínas. Este conocimiento aún es insuficiente para hacer un diseño racional robusto (Bocola, Schwaneberg, Zhao, Kardashliev, & Joe, 2014).

La diversidad de la librería es creada a través de mutagénesis y/o recombinación. Las librerías tradicionales han sido generadas por mutagénesis al azar (usando compuestos químicos mutagénicos, cepas mutagénicas, “error-prone PCR” (epPCR) o variantes de ésta) o por mutagénesis sitio dirigida. Estas librerías son tamizadas y la(s) mejor(es) variante(s) es(son) seleccionada(s) por ciclos de mutagénesis y selección, esto es debido a que la frecuencia de mutaciones beneficiosas es baja. La recombinación de mutaciones benéficas aumenta la probabilidad de mejorar la función original en cada ciclo de mutagénesis y selección, sin embargo, la probabilidad de mejora, decrece rápidamente cuando se realizan mutaciones múltiples (Copp, Hanson-Manful, Ackerley, & Patrick, 2014).

Error prone – PCR

Error prone – PCR (epPCR, PCR propensa al error), es un método usado para crear librerías de mutantes de un gen. Sirve para generar un fenotipo deseado (Figura 6). Está basado en que la mayoría de las polimerasas no son 100% fieles en la replicación del DNA. Entre las polimerasas, la Taq DNA polimerasa tiene la fidelidad más baja, con un tasa de error por nucleótido en la polimerización entre 0.001-0.02 % (Cadwell & Joyce, 1994; Pritchard, Corne, Kell, Rowland, & Winson, 2005) de ahí se entiende que esta enzima sea una de las más usadas. Sin embargo, esta tasa de error no es tan alta para inducir mutagénesis al nivel deseado.

No obstante, alterando las condiciones de reacción como concentración y diferentes tipos de catión divalente introducido (Figura 7), se reduce la especificidad del apareamiento de las bases y se incrementa la tasa de error hasta 0.66 ± 0.13 %, la adición de 0.7 mM de $MnCl_2$ incrementa 25 veces el error y cambios en la proporción estequiometría de dNTPs también lo incrementa (Zakour, Kunkel, & Loeb, 1981).

La enzima Taq DNA polimerasa tiene un sesgo intrínseco que induce mutaciones en las bases A y T e introduce más transiciones que transversiones; al modificar las condiciones de reacción se puede alterar este sesgo; sin embargo, cambios excesivos en las condiciones generan una pobre amplificación y artefactos. Por esto es necesario alcanzar un balance entre las

condiciones ideales para la mutagénesis y aquello que lleva a artefactos en la PCR. Por tanto, frecuentemente se usa la combinación de estas dos estrategias para orientar el sesgo de la mutación introducida (transversión o transición) (Copp et al., 2014).

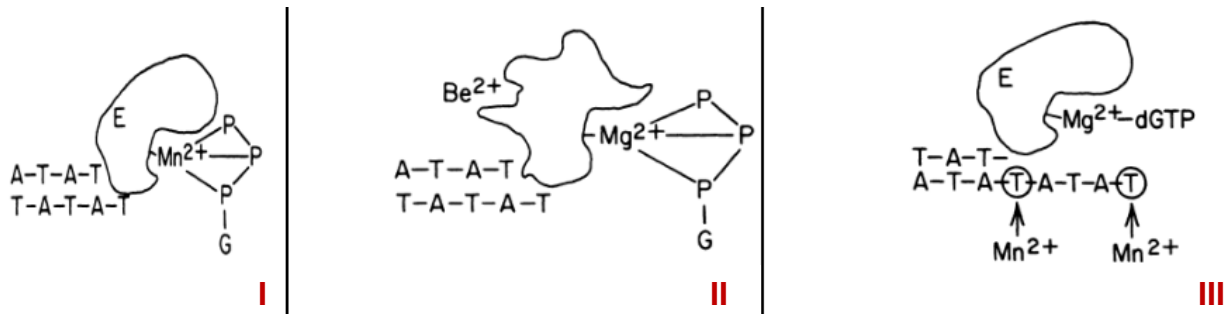


Figura 7. Mecanismo propuesto del efecto de los iones divalentes en la especificidad de la enzima ADN polimerasa durante la replicación, I) El Mn^{2+} altera la conformación del sustrato al formar un complejo coordinado con los grupos fosfatos del sustrato, II) El ion Be^{2+} induce cambios en la conformación de la enzima y estabiliza la formación de un complejo de coordinación del ion Mg^{2+} con los grupos fosfatos del sustrato y III) a alta concentración de Mn^{2+} rodea a las Tiaminas de la hebra de ADN de templado e inducen alteraciones en la especificidad de la enzima por la base. (Zakour et al., 1981)

Existen reportes que han medido el efecto de diferentes proporciones estequiométricas de dNTPs en la frecuencia y la calidad de las mutaciones; todo enfocado a generar una mayor diversidad de variantes y mantener la proporción de mutantes funcionales (Packer & Liu, 2015). La ventaja de este método *in vitro* es que incrementa la mutagénesis a través de varios ciclos de reacción. Así, el número de ciclos de reacción determinan el número de cambios que tengan las variantes de la mutagénesis en la reacción de PCR (Lutz & Patrick, 2004).

HIPÓTESIS

Variantes de la proteína transportadora, codificada por el gen *gatC*, obtenidas por mutagénesis al azar, permitirán mejorar la velocidad de consumo de D-xilosa y la velocidad de producción de D-Lactato en cepas derivadas de *E. coli* CL3.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar mutantes de la proteína transportadora GatC con diferentes capacidades de consumo de D-xilosa que mejoren la producción de D-lactato en fermentación de cepas de *E. coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir una cepa de *E. coli* con capacidad disminuida para transportar D-xilosa (MG1655: $\Delta pf1B \Delta adhE \Delta frd \Delta xy1FH \Delta araH \Delta xylE \Delta araE \Delta galP \Delta gatC$) a partir de la cepa CL3 (MG1655: $\Delta pf1B \Delta adhE \Delta frd$).
- Obtener una librería de variantes del gen *gatC* y su variante *gatCS184L* mediante mutagénesis aleatoria.
- Aislar variantes del gen *gatC* y *gatCS184L* con diferentes capacidades de consumo de D-xilosa en la cepa de *E. coli* productora de D-Lactato.
- Determinar la secuencia nucleotídica de las variantes del transportador aisladas.
- Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de conversión de D-xilosa a D-lactato, en cultivos lote, con la cepa disminuida para transportar D-xilosa transformada con las variantes de GatC seleccionadas.

- Realizar un análisis topológico de la estructura de la proteína transportadora GatC y de las variantes aisladas para tratar de entender su efecto sobre la capacidad para transportar D-xilosa.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas, oligonucleótidos y plásmidos.

Las cepas usadas y construidas en este trabajo se enlistan a continuación (Tabla 2). Estas fueron resembradas para los diferentes experimentos a partir del mismo cultivo crioconservado en glicerol al 40 % y mantenidas a -70 °C.

Tabla 2. Cepas usadas

Nombre	Genotipo relevante	Función	Referencias
MG1655	<i>K-12: F- λ- ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Cepa estándar ATCC 47076	(Blattner et al., 1997)
DHα	<i>F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Cepa receptora de plásmidos.	(Taylor, Walker, & McInnes, 1993)
CL3	<i>MG1655: ΔpflB ΔadhE Δfrd</i>	Cepa parental	(Utrilla, 2010)
JU01	<i>MG1655: ΔpflB ΔadhE Δfrd ΔxylFGH</i>	Cepa control	(Utrilla Carreri et al., 2012)
JU15	<i>JU01 evol Δreg 27.3 kb ΔamidarpA::GatCS184L</i>	Cepa control	(Utrilla Carreri et al., 2012)

*Abreviaturas usadas *adhE*: alcohol deshidrogenasa; *frdA*: fumarato reductasa; *pflB*: piruvato formato liasa; *xylFGH*: transportador ABC de D-xilosa; F -: no carga el plásmido F; *Δ(lacZYA-argF)*: eliminación parcial del gene de la β-d-galactosidasa que permite seleccionar colonias coloras en presencia XGal; *recA1*: mutación en el gene de recombinación de ADN; *endA1*: mutación que desactiva la endonucleasa no específica I; *hsdR17*: mutación en el sistema de metilación y restricción que permite reconocer el DNA extraño.

Tabla 3. Cepas generadas

Nombre	Genotipo.	Referencia
ΔFH	<i>Cl₃ ΔxylFH::FRT</i>	Este trabajo
Δ²H	<i>ΔFH ΔaraH::FRT</i>	Este trabajo
Δ³E	<i>Δ²H ΔxylE::FRT</i>	Este trabajo
Δ⁴E	<i>Δ³E ΔaraE::FRT</i>	Este trabajo
Δ⁵P	<i>Δ⁴E ΔgalP::FRT kan FRT</i>	Este trabajo
Δ⁶G	<i>Δ⁵P ΔgatC::FRT</i>	Este trabajo
ΔGpCL	<i>Δ⁶G pCL1920</i>	Este trabajo
ΔGpCLGat	<i>Δ⁶G pCLGatC</i>	Este trabajo
ΔGpGatS184L	<i>Δ⁶G pCLGatCS184L</i>	Este trabajo
pJG	<i>DH5α::pJetGatC</i>	Este trabajo

Para llevar a cabo la eliminación de los genes transportadores a cada cepa, se usaron como donadora la cepa correspondiente de la colección KEIO(Baba et al., 2006), las cuales se enlistan a continuación.

Tabla 4. Cepas donadoras usadas para la transducción con el fago P1

Clasificación	Característica genotípica	Cepa receptora
ECK3557	MG1655: $\Delta xylH::Km^R$	CL3
ECK3555	MG1655: $\Delta xylFH::Km^R$	CL3 $\Delta XylH$
ECK1897	MG1655: $\Delta araH::Km^R$	CL3 $\Delta XylFH$
ECK4023	MG1655: $\Delta xylE::Km^R$	CL3 $\Delta XylFH \Delta AraH$
ECK2839	MG1655: $\Delta araE::Km^R$	CL3 $\Delta XylFH \Delta AraH \Delta XylE$
ECK2938	MG1655: $\Delta galP::Km^R$	CL3 $\Delta XylF \Delta AraH \Delta XylE \Delta AraE$
ECK2085	MG1655: $\Delta gatC::Km^R$	CL3 $\Delta XylF \Delta AraH \Delta XylE \Delta AraE \Delta GalP$

Se hizo la confirmación de la interrupción cromosomal con el gen de resistencia a Kanamicina (km^R) de cada uno de los genes flanqueado por los sitios FRT y posterior eliminación de la resistencia de los transportadores de D-xilosa, con los siguientes oligonucleótidos.

Tabla 5. cebadores empleados.

Gen	Nombre	Secuencia*	Tm**	Referencia
xylFGH	XylFck5'	TGTCCTCTAACTACAGAAGGC	65	(Utrilla, 2010)
	XylFck3'	TATCAAAATCAAGAACGGCG		
araFGH	CAraFFw	TGG CTATGGTGGGAAAAACG	51	Este trabajo
	CAraFRv	TACACAAAACGACACTAAAGC		
xylE	XylEck5	TGTCCTCTAACTACAGAAGGC	58	(Utrilla, 2010)
	XylEck3	TATCAAAATCAAGAACGGCG		
araE	CAraEFw	ACAAACGCCTCAACGGCCAAG	63	Este trabajo
	CAraERv	CAC CTG CGTGAGTTGTTC ACG		
galP	CGalPFw	AACAGGGGCGGTCAAACAAGG	56	Este trabajo
	CGalPRv	CGGAATCTGCTTTAACGCCAC		
gatC	CgatCFw	ACCTATGTTTTTCAGAAGTCATGC	60	Este trabajo
	CgatCRv	TTATTCTGCGAGAACGACTTTC		
gatC	pBbtca5'	ATAACAATTTTACACAGGAAACAGCCATGG	55	Este trabajo
	pBbtca3'	CGGTACACCTCTAGAGTCGACCTGCAGTTA		

* Secuencia en dirección 5' → 3'.

**Temperatura experimental optima en °C empleadas en este trabajo.

Tabla 6. Plásmidos utilizados en el presente trabajo

plásmido	Función	Referencia
pCP20	Plásmido con flipasa FRT para eliminación de genes de resistencia.	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pKD46	Plásmido plantilla del gen de resistencia a <i>km^R</i> flanqueado por sitios FRT (1400 pb)	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD3	Plásmido plantilla del gen de resistencia a <i>Cm^R</i> flanqueado por sitios FRT (1200 pb)	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	Plásmido plantilla del gen de resistencia a <i>km^R</i> flanqueado por sitios FRT (1600 pb)	(Datsenko & Wanner, 2000)
pJet™2.1	vector de Clonación de productos de PCR	Invitrogen ®
pJetGatC	Plásmido de subclonación del gen <i>gatC</i>	Este trabajo
pCL1920	Vector de expresión de bajo número de copias	(Lerner & Inouye, 1990)
pCL	Vector de expresión derivado del pCL1920 con el Promotor Lac en marco con el sitio NcoI.	Este trabajo
pCLgatC	Plásmido de expresión del gen <i>gatC</i> silvestre clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLgatCS184L	Plásmido de expresión del gen <i>gatCS184L</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLIR41	Plásmido de expresión del gen <i>gatCS184L</i> , <i>R216C</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLIR44	Plásmido de expresión del gen <i>gatCS184L</i> , <i>K276E</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLIR46	Plásmido de expresión del gen <i>gatCS184L</i> , <i>V307A</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLIR47	Plásmido de expresión del gen <i>gatCS184L</i> , <i>I124I</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLIR48	Plásmido de expresión de gen <i>gatCS184L</i> , <i>N416D</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLIR61	Plásmido de expresión de gen <i>gatCS184L</i> , <i>F340L</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo
pCLIR71	Plásmido de expresión de gen <i>gatCI358V</i> clonado en el plásmido pCL.	Este trabajo

MÉTODOS DE INGENIERÍA GENÉTICA

Construcción del fondo genético de la librería.

La cepa homoláctica *CL3* (MG1655: $\Delta pf1B \Delta adhE \Delta frdA$) fue generada por interrupción de varios genes del metabolismo anaerobio de la cepa parental MG1655, esto disminuye la producción de etanol, formiato y succinato (Utrilla Carreri et al., 2012).

En el presente trabajo, a partir de la cepa *CL3* se generaron nuevas cepas (Tabla 3), a las que se les eliminó de manera secuencial los genes de los transportadores *XylF*, *XylH*, *AraH*, *XylE*, *AraE* mediante transducción, con el fago P1. Cada gen se intercambió por un gen de resistencia a Km^R flanqueado por sitios de reconocimiento de la flipasa FRT (Flp recognition target), procedentes de la cepa donadora de la colección KEIO del gen a eliminar (Baba et al., 2006) Estos fueron seleccionadas en placas de LB agar con kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ (Km^{50}).

A las colonias con el fenotipo Km^R escogidas al azar, se les comprobó mediante PCR que el tamaño del producto amplificado fuera consistente con el tamaño del gen km^R (≥ 1358 pb) y en el caso de la eliminación del gen *araE* cuyo tamaño es aproximadamente igual al producto de la amplificación del gen de km^R , que no presentara corte con la enzima *SbaI*.

Finalmente, se eliminó el gen de la resistencia mediante la FLP recombinasa codificada por el plásmido termosensible pCP20 (Datsenko & Wanner, 2000), se realizó una comprobación fenotípica de la pérdida de la resistencia en placas de LB Km^{50} y comprobación genotípica mediante el tamaño del producto amplificado por PCR, el cual que debe ser ≤ 500 pb.

Las restricciones y plásmidos usados en este trabajo fueron separados por electroforesis en agarosa al 1.2%; se empleó como referencia de peso molecular la escalera de 1 Kb INVITROGEN®. Todos los geles se corrieron a 8.7 mV/cm y se revelaron mediante tinción con Bromuro de Etidio (BrEt).

Construcción del plásmido con las variantes parentales *GatC* y *GatCS184L*

Para crear la biblioteca de variantes del gen *gatC*, este se clonó el gen *gatC*, con el marco de lectura directo al promotor del operón Lac (Promotor Lac) como se observa en la Figura 8. Para eso el promotor Lac y el gen *gatC*, se amplificaron con el kit KAPA HiFi PCR®, y con los oligos de clonación 859 OCLp5H TGT CGG AAG CTT CG TTG GCC GAT TCA TTA A y 860 oCLp3Nc AAC GCA TGA CTT CTG AAA CCA TGG CTG TTT CCT GTG TG para amplificar el promotor Lac y los oligos 861 oGat5E ATG GTT TCA GAA GTC ATG CGT T y 862 oGatCp GTC GAC CTG CAG TTA TTC TGC GAG AAC GAC TT para amplificar las variantes del gen *gatC*, con los sitios de restricción de la enzima *HindIII*, *NcoI*, *PstI* respectivamente, estos se usaron después para subclonar en el vector pCL1920 entre los sitios *HindIII* y *PstI*.

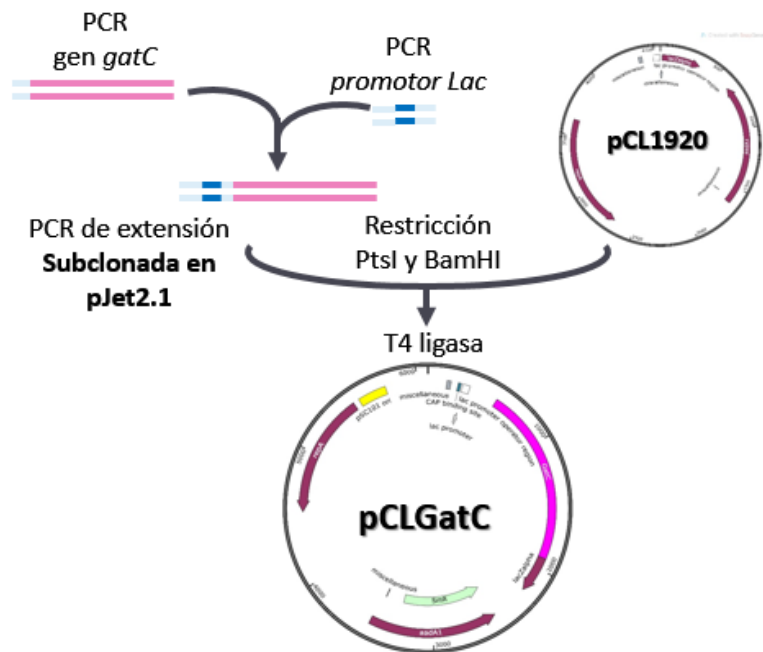


Figura 8. Estrategia de clonación general del gen de la permeasa *GatC* en el vector de expresión pCL1920.

La clonación del gen *gatC* unido al promotor *Lac* se realizó en dos pasos, 1) primero se amplificó independientemente la región del promotor *Lac* y el gen *gatC* por PCR y luego los productos se usaron para amplificar el segmento completo del promotor *Lac* unido al gen *gatC* por PCR de extensión. El producto purificado de PCR, se clonó en el plásmido pJet2.1 con el kit Clone jet PCR cloning®, en una reacción de 1 h, a 37 °C; la reacción se purificó al adicionar 20 µL de cloroformo y centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min; se tomó 1 µL de la fase acuosa para

transformar 50 μL de células de DH5 α por electroporación; las células se recuperaron incubándolas en 950 μL de medio SOC a 37 °C y 300 rpm por 15 min; se tomaron 200 μL del medio y se esparció en cajas de LB-Cm³⁰. Las UFC aisladas se evaluaron por PCR usando los cebadores T7, se seleccionaron las colonias que amplificaron el tamaño de inserto correcto (1,553 pb) y cumplieran con el patrón de restricción esperado usando las enzimas *HindIII*, *NcoI* y *PstI*.

Las células se cultivaron por 8 horas en 50 mL de medio LB en un matraz de 250 mL a una temperatura de 37 °C y a una agitación de 300 rpm. De estos cultivos se extrajo el plásmido con el “kit plasmid DNA isolation Invitrogen™”. Alrededor de $\cong 500$ ng de ADN plasmídico se enviaron a secuenciar en la unidad de síntesis y secuenciación del IBt - UNAM. Confirmada la correcta secuencia; la clona seleccionada se usó para obtener el inserto mediante digestión con las enzimas *HindIII* y *PstI* en 20 μL de reacción por 1 h a 37 °C en el amortiguador apropiado. El fragmento de interés se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y se purificó con el kit GeneJET Gel Extraction®. Finalmente, este inserto se usó para subclonar en el vector pCL1920, previamente digerido con las enzimas *HindIII* y *PstI*, en 20 μL de reacción por 1 h a 37 °C en el amortiguador apropiado. Los productos se separaron usando un gel preparativo de agarosa al 1.2% y se purificó usando el kit GeneJET Gel Extraction®. Se ligaron 15 ng del inserto y 35 ng del vector pCL usando 5 U de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas), 1xT4 en 50 μL de reacción. Esta fue incubada a 22 °C por 1 h y luego a 70 °C por 5 min para inactivar la enzima.

El producto de la ligación se purificó lavando con 5 μL de cloroformo; se centrifugó y se tomó 1 μL de la fase acuosa para transformar 50 μL de células electrocompetentes de DH5 α ; las células fueron recuperadas en 1 mL de medio SOC e incubadas a 37 °C por 1 h. Alícuotas de 100 μL , 200 μL y 500 μL del medio de recuperación fueron dispersadas en cajas de LB-Spe⁵⁰ e incubadas a 37 °C por 12 h. La presencia del plásmido en las colonias se confirmó por reacciones de PCR, usando los cebadores M13 y por su patrón de restricción usando las

enzimas HindIII, PstI, NcoI. De las clonas positivas se seleccionó una al azar para enviar a secuenciar.

El plásmido (pCLGatC) se usó para transformar 50 μ L de células electrocompetentes del fondo genético Δ^6G , las células fueron recuperadas en 1 mL de medio SOC e incubadas a 37 $^{\circ}$ C por 1 h; 100 μ L del cultivo se extendió en cajas de LB-Spe⁵⁰ y se incubó a 37 $^{\circ}$ C por 8 h. Un cultivo de 3 colonias al azar en LB- Spe⁵⁰ de 8 h, se rotuló adecuadamente y se crioconservó a -70 $^{\circ}$ C con glicerol al 40%.

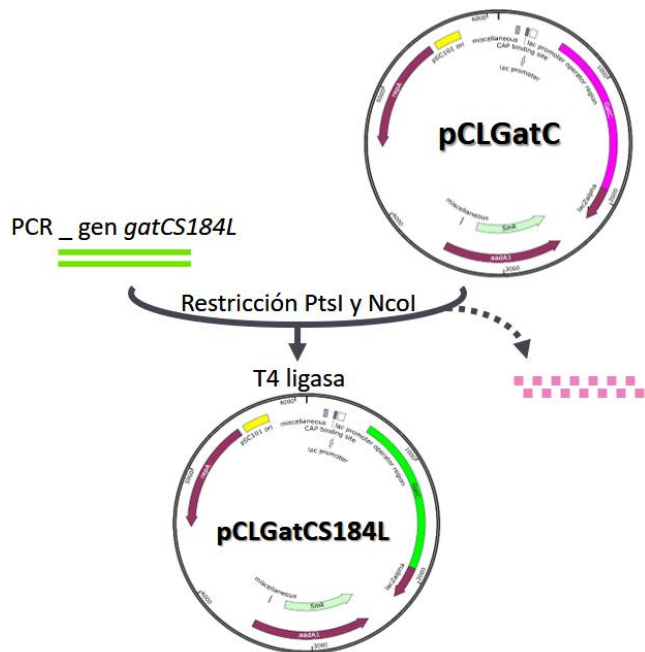


Figura 9. Esquema de la estrategia usada para la construcción del plásmido pCLGatCS184L.

El plásmido pCLGatC, se usó como base para clonar el gen *gatCS184L* como se observa en la Figura 9, a partir del ADN genómico de la cepa *JU15*, mediante reacción de PCR usando los oligos de clonación; forward 859 OCLp5H TGT CGG AAG CTT CGT TGG CCG ATT CAT TAA y reverse 860 oCLp3Nc AAC GCA TGA CTT CTG AAA CCA TGG CTG TTT CCT GTG TG. Se amplificó la variante en 50 μ L de la reacción de PCR usando el kit KAPA HiFi PCR®; la reacción de PCR se purificó con el kit GeneJET PCR Purification Kit ® y se recuperó en 35 μ L de H₂O milliQ; se digirió \cong 1.0 μ g del producto purificado con 10 U de las enzimas HindIII y PstI en 20 μ L de reacción por 1 h a 37 $^{\circ}$ C en el amortiguador 1X apropiado. El producto de la reacción se

purificó con el kit GeneJET PCR Purification Kit ® y se recuperó el producto en 30 µL de H₂O milliQ y se cuantificó después.

El plásmido pCLGatC fue extraído usando el QIAquick PCR Purification Kit; alrededor de $\cong 1.0$ mg del plásmido se digirió con 10 U de las enzimas HindIII y PstI en 20 µL de reacción por 1 h a 37 °C en el 1X amortiguador apropiado. El producto de la reacción se separó en un gel preparativo de agarosa 0.8%; se recuperó la banda de mayor peso se recuperó y se purificó con el kit GeneJET Gel Extraction®. La banda se recuperó en 30 µL de H₂O milliQ y se cuantificó; se mezclaron 35 ng del inserto digerido del gen *gatCS184L* con 15 ng del vector pCL, se ligaron usando 5U de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas), 1xT4 de amortiguador en 20 µL de reacción. Esta fue incubada a 22 °C por 1 h y luego a 70 °C por 5 min para inactivar la enzima.

El producto de la ligación se purificó mezclando con 20 µL de cloroformo; se centrifugó y se tomaron 10 µL de la fase acuosa para transformar 50 µL de células electrocompetentes de *DH5 α* . Las células se recuperaron en 950 µL de medio SOC y se incubaron a 37 °C por 1 h. Alícuotas de 100 µL, 200 µL y 500 µL de células se esparcieron en cajas con LB-Spe⁵⁰, estas se incubaron a 37 °C por 12 h. Se seleccionaron por PCR las UFC que presentaron inserto; se escogieron 3 colonias al azar y se enviaron a secuenciar para verificar que presentaran el gen *gatCS184L*.

El plásmido construido (pCLGatCS184L) se usó para transformar 50 µL de células electrocompetentes del fondo genético Δ^6G . Las células fueron recuperadas en 1 mL de medio SOC incubadas a 37 °C por 1 h. 100 µL del cultivo se extendieron en cajas de LB-espectomicina (30 µg/mL), las cuales se incubaron a 37 °C por 12 h. De cultivos de 8 h en LB con espectomicina (30 µg/mL) que contenían 3 colonias seleccionadas al azar, se tomaron muestras y se crioconservaron a -70 °C con glicerol al 40%.

El vector pCL1920 se usó para transformar 50 μL de células electrocompetentes del fondo genético $\Delta^6\text{G}$, las células fueron recuperadas en 1 mL de medio SOC y se incubaron a 37 °C por 1 h. Se extendieron 100 μL del cultivo en cajas de LB-Spe⁵⁰ que se incubaron a 37 °C por 12 h. se seleccionaron 3 colonias al azar para cultivarse en medio líquido LB-Spe⁵⁰ por 8 h, 800 μL de este cultivo se mezclaron con 800 μL de glicerol al 80% y se crioconservaron a -70 °C. Las tres cepas del fondo genético $\Delta^6\text{G}$, transformadas con pCL1920, pCLGatC, pCLGatCS184L se usaron para la caracterización cinética de estas cepas.

MÉTODOS DE INGENIERÍA PROTEÍNAS.

Evolución dirigida del transportador GatC - epPCR

Se generaron mutaciones al azar mediante PCR propensa al error en los genes *gatC* y *gatCS184L* con los plásmidos pCLGatC y pCLGatCS184L como plantilla. Para esto se usaron los cebadores pBbtca5' (4188) y pBbtca3' (4189), y las mezclas de reacción utilizadas se muestran en la Tabla 7. Se usaron dos concentraciones diferentes de iones divalentes para generar dos tasas de mutagénesis, como se muestran a continuación.

Tabla 7. Condiciones de la mezcla de reacción de la epPCR usada para generar el banco de variantes (Leung, Chen, & Goeddel, 1989).

Reactivos	Tasa alta Volumen (μL)	Tasa baja Volumen (μL)
Amortiguador Taq 10X-F (PCR Optimizer™ Kit) *	5	5
2.5 mM dNTP mix (Leung et al 1985)**	5	5
Oligonucleótido pBbtca5' 10 μM	2	2
Oligonucleótido pBbtca3' 10 μM	2	2
50 mM MgCl₂	5	5
5 mM MnCl₂	5	-
H ₂ O	21	26
Plantilla***	1	1
Taq polimerasa (1 U/μL) ****	4	4
Volumen total	50	50

* 10X amortiguador F red contiene 20 mM MgCl₂, 600 mM Tris - pH 9.0 y 150 mM sulfato de amonio.

** 10 mM dGTP, 2 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP.

*** Cantidad recomendada es 0.25 – 2.5 U por 50 μL , una concentración mayor aumenta la inespecificidad.

**** Se utilizaron 57.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de epPCR *gatC* y 35.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de *gatCS184L*.

Se realizaron 6 reacciones de amplificación usando las condiciones reportadas en la Tabla 8 con cada plantilla en cada condición (tasa alta y baja) y se comprobó la correcta amplificación de todas las reacciones mediante electroforesis de agarosa 1%

Tabla 8. Condiciones de amplificación de la epPCR mutagénica usadas en este estudio.

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	# ciclos
Desnaturalización	92	5.0	1
Desnaturalización	92	0.5	
Templado	55	0.5	
Extensión	72	1.0	
Extensión	72	5.0	1
Finalización	4	∞	1

Usando la mezcla de la reacción de la Tabla 9 se digirieron los productos de las PCRs toda la noche a 37 °C y se desnaturalizaron las enzimas manteniendo la reacción 15 min a 65 °C. después, los productos digeridos se recuperaron mediante separación en un gel preparativo de agarosa 1.0 %. Las bandas de interés (1402 pb) se cortaron y se purificaron desde la agarosa con el kit QI Aquick gel extraction kit ®Qiagen; todas las reacciones se unieron y se redisolviéron en 70 µL de agua MilliQ para su cuantificación.

Tabla 9. Reacciones de digestión

Reactivos	epPCR reacción* Volumen (µL)	pCLGatC** Volumen (µL)
Amortiguador NEB 3	6	2
ADN plantilla	50	15
Enzima NcoI	2	2
Enzima PstI	2	2

* 57.8 µg/µL de epPCR gatC y 35.7 µg/µL de gatCS184L.

** 84.7 µg/µL de pCLGatC.

Por último, se cuantificó el ADN, y se determinó la eficiencia de amplificación de la epPCR “*eff*” (es la probabilidad que una secuencia particular sea duplicada en un ciclo de PCR) se obtuvo usando la fórmula

$$eff = 2^{d/n} - 1$$

Donde $d = \frac{\log \frac{\text{Producto}}{\text{templado}}}{\text{Log2}}$ $n = \# \text{ ciclos de PCR}$

Tabla 10. Eficiencia de amplificación de la epPCR

<i>Plantilla - epPCR</i>	<i>d</i>	<i>Eficiencia</i>
GatC	3.4	0.082
GatCS184L	3.7	0.090

La eficiencia de la amplificación fue usada para estimar mediante el software [PEDEL-AA](#) las dimensiones de la librería generada en este trabajo.

Vector pCL

El plásmido pCLGatC se usó para aislar el vector pCL abierto (vector pCL) como se observa en la Figura 10, para esto se purificó el plásmido pCLGatC con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit ®Qiagen, a partir de 3 extracciones desde células DH5α/pCLGatC y se cuantificó la concentración de este con el NanoDrop 2000 spectrophotometer ® (Thermo Scientific).

Usando las proporciones reportadas en la Tabla 9; se liberó el vector pCL desde el plásmido pCLGatC con los extremos cohesivos PstI y NcoI. El producto de la reacción se separó mediante electroforesis de gel de agarosa preparativo 0.8%. Se cortó la banda superior que tenía el tamaño esperado del vector pCL y se recuperó el ADN con el kit QIAquick gel extraction kit ®Qiagen. Finalmente, las reacciones se disolvieron en 55 µL de agua MilliQ y se mezclaron para su cuantificación y su uso en la librería.

Preparación de librería de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L.

Antes de construir la librería, se hicieron pruebas para estandarizar las condiciones de ligación para obtener la máxima eficiencia de ligación, transformación y disminuir la religación del vector pCL. Para esto se calculó inicialmente la relación inserto- vector necesaria usando la fórmula:

$$\text{inserto (ng)} = \frac{\text{Vector (ng)} * \text{inserto (kb)}}{\text{Vector (kb)}} * \frac{a}{b}$$

donde a = proporción de inserto b = proporción de vector

La relación <<inserto – vector>> sugerida para extremos cohesivos es 3:1; sin embargo, también se evaluó y se usó finalmente otra proporción mayor 4:1.

Tabla 11. Cantidades evaluadas para probar el efecto de la relación <<inserto – vector>>.

Vector (kb)	Inserto (Kb)	vector pCL (ng)	Relación a/b	Inserto (ng)
4721	1402	100	3/1	89
4721	1402	100	4/1	119

Con las proporciones listadas en la Tabla 11 se hicieron pruebas sólo con los insertos de alta tasa de mutagénesis derivados de la epPCR del gen *gatC* y epPCR del gen *gatCS184L*; para esto se ligaron las cantidades de inserto/vector mostradas para cada proporción y se utilizaron los mismos componentes de la reacción de ligación listados en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de ligación.

Reactivos	epPCR** Volumen (µL)	pCL Volumen (µL)
Amortiguador T4 10X*	2	2
vector pCL (59.4 ng/µL) **	2.13	2.13
Inserto ***	x	-
T4 Ligasa	1	1
H ₂ O milliQ	Volumen →20	Volumen →20

* Composición 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C)

** en una prueba se varió la cantidad de este cuando se usó el plásmido fosforilado, en esos casos la concentración de ADN pCL fue 38 ng/µL.

*** la cantidad a colocar vario dependiendo de la cantidad de inserto calculado de acuerdo con la Tabla 11

Luego, se realizaron 4 reacciones (tasa alta o baja de mutagénesis para cada gen *gatC* o *gatCS184L*), siempre se realizó un control para evaluar la cantidad de colonias recuperadas al transformar con el vector pCL. Las reacciones de ligación se incubaron por 16 h a 16 °C y se inactivo la enzima por temperatura (65 °C por 15 min) como se observa en la Figura 10.

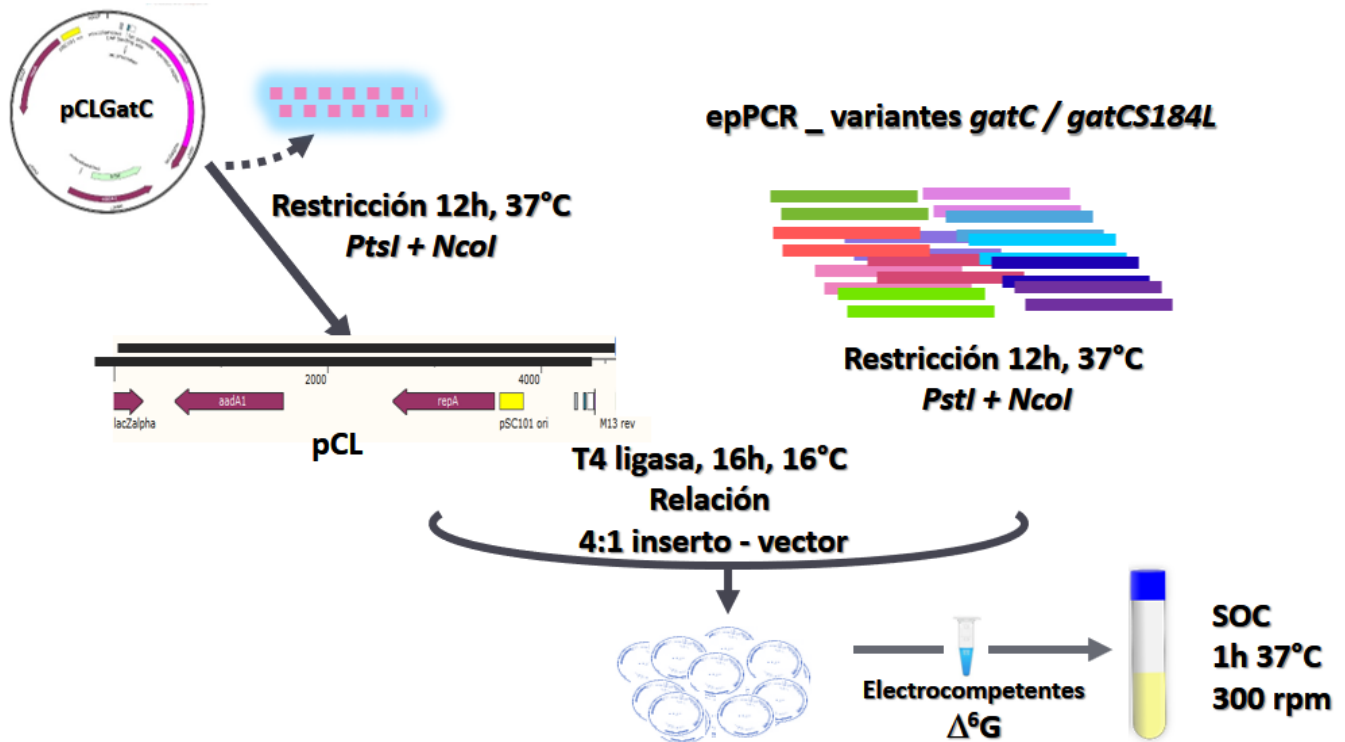


Figura 10. Esquema general de la construcción de la librería de variantes del gen *gatC* y *gatCS184L*.

Después de la reacción los 20 μL de la ligación fueron purificadas por adición de 500 μL de isopropanol, seguido de centrifugando a 13,000 rpm durante 10 min, luego se descartó el sobrenadante y el ADN se concentró al vacío con el ADN Savant™ a 60 °C por 30 min. Posteriormente, se suspendió en 10 μL de agua MilliQ, y alícuotas de 2 μL se usaron para transformar 100 μL de células electrocompetentes ($\text{DH5}\alpha$ o Δ^6G previamente preparadas y evaluadas de acuerdo con los fines de la prueba) en cubetas estériles nuevas (0.2 cm electrode gap, Bio-Rad) se usó el MicroPulser Electroporator ©Bio-Rad, 1.8 kV, 200 Ω y 25 μF con control de pulso. Las células electroporadas se suspendieron en 900 μL de medio SOC estéril

(Apéndice H) y luego las células se recuperaron por incubación a 37 °C y agitación por 1 h. Diferentes alícuotas (5 µL, 50 µL, 200 µL) del medio con las células recuperadas fueron sembradas en cajas de LB-agar con LB-Spe⁵⁰ e incubadas por 18 h. Al final de este tiempo se contaron las colonias desarrolladas en cada condición y en la caja de control del vector pCL para determinar las características de la librería o banco.

La primera transformación se hizo para evaluar la tasa de mutagénesis de la librería, para esto se aislaron 12 colonias al azar (3 de cada plantilla y reacción epPCR) para extraer su plásmido y secuenciar el inserto, las diferentes pruebas se enfocaron a:

- Minimizar la cantidad de vector pCL ligado sobre si en la librería (“background”); esto se logró mejorando las condiciones de digestión del vector y el inserto hasta obtener que la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de la caja control con células transformadas con el vector pCL ligado sobre si fuera menor al 1% con respecto al de UFC con plásmido.
- Maximizar la eficiencia de ligación; esta se logró con el aumento de la relación de inserto - vector (4:1).
- Maximizar la transformación, al optimizar la viabilidad de las células electrocompetentes Δ^6G ; las mejores condiciones se encontraron al preparar las células competentes a temperatura baja (-4°C).

Librería de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L

Después de las diferentes pruebas y de optimizar cada uno de los pasos de la construcción de la librería (Figura 10); se escaló el proceso para obtener la librería (≈ 500 ng). Para esto se realizaron múltiples transformaciones con alícuotas de 2 µL de ligación para 100 µL de células electrocompetentes (≈ 25 transformaciones), después de recuperarlas en 25 mL de SOC por 1 h en agitación a 37 °C; las células se centrifugaron 4,000 rpm por 5 min, luego se descartó el medio y se añadieron 25 mL de medio mínimo mineral AM2 suplementado con 40g/L de D-xilosa

y de ácido cítrico para una concentración final de 100 mg/L (Medio de selección), se agitó por 1 h más y se llevó a la condición de selección en los minifermentadores.

Selección de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L.

Para seleccionar las variantes, se sometió la librería (los 25 mL de medio AM2) a un proceso de enriquecimiento, para esto se usaron minifermentadores con 250 mL de medio de selección, a los cuales se les controló el pH por adición automática de KOH (2 N) durante todo el proceso; además, se agregó 70 μ M de IPTG para inducir la expresión de las variantes de las permeasas y se adicionó Spe⁵⁰ para evitar la segregación de los plásmidos y mantener la pureza del cultivo.

Cada vez que el cultivo alcanzaba una $O.D_{600nm} \approx 1.0$ se calculó la cantidad necesaria de células para iniciar otro pase e iniciar el cultivo a una $O.D_{600nm} \approx 0.1$. En cada pase, también se crioconservaron dos muestras del cultivo (800 μ L del cultivo se mezclaron con 800 μ L de glicerol al 80%), las cuales se rotularon con el número del pase y se refrigeraron a -70 °C.

A los cultivos se les midió continuamente la $O.D_{600nm}$ y se calculó su tasa máxima de crecimiento. Estos cultivos se finalizaron cuando estos agotaban la fuente de carbono (de forma práctica, se realizó cuando se detenía el consumo de base y el pH incrementaba por arriba de 7).

Como se deduce, se obtuvo un gradiente de variantes con distintas velocidades de crecimiento, estas se pueden aislar en cada fase del tamizaje; sin embargo, durante cada ciclo se va perdiendo diversidad, ya que las variantes con mayor velocidad de crecimiento se enriquecen y tienen más probabilidad de llegar al siguiente pase, mientras se van diluyendo el resto de las variantes de acuerdo a la velocidad de crecimiento. Con esta estrategia se espera que al final de múltiples pases las variantes aisladas tengan las velocidades de crecimiento más altas, pero se corre el riesgo que pocas variantes presenten una velocidad de crecimiento muy prominente, y éstas sean las únicas, que se encuentre en los últimos pases. Para tener “buenas” mutantes

sin perder diversidad y poder ganar información sobre efectos estructurales se tomó como valor de corte, para seleccionar, los pases donde la velocidad de crecimiento empezara a ser superior a 0.14 h^{-1} ; que es la velocidad de crecimiento de la cepa $\Delta^6\text{G/pCLGatCS184L}$.

Selección de variantes de las permeasas GatC y GatCS184L

Para aislar las clonas de los pases de selección, se extendió en cajas de agar LB-Spe⁵⁰ 200 μL de una dilución de 1×10^{-7} células de un cultivo desarrollado en 1 mL de medio de selección con Spe⁵⁰ inoculado con 100 μL del criovial del pase a caracterizar. Las cajas se dejaron por 16 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y las UFC de las variantes que crecieron se aislaron y se rotularon adecuadamente para su posterior caracterización, y crecimiento en medio líquido LB-Spe⁵⁰, el cual se usó para crioconservar a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Evaluación estructural de las variantes seleccionadas de las permeasas GatC y GatCS184L

De las clonas aisladas de los pases (4, 6 y 7) se seleccionaron para secuenciar 7 variantes al azar para secuenciarlas; para esto se tomaron 5 μL de medio de los viales crioconservados de las clonas seleccionadas (IR41, IR44, IR46, IR48, IR47, IR61 y IR71) las cuales se inocularon en tubos estériles con medio líquido LB-Spe⁵⁰ por 8h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 300 rpm. De estos cultivos se aislaron los plásmidos usando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit ® QIAGEN; y se cuantificaron usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 spectrophotometer ® Thermo Scientific. Se tomaron 600 ng de cada uno de los plásmidos purificados y se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación del IBt-UNAM, usando los cebador M13 forward (secuenciación directa) y M13 reverse (secuenciación reversa); que se encuentran flanqueando $\approx 50 \text{ pb}$ la secuencia del gen *gatC*. Después de verificar la calidad de las secuencias se eliminaron las zonas de baja calidad (normalmente al final y comienzo de la secuencia) y se determinaron las mutaciones presentes en cada clona.

MÉTODOS DE INGENIERA BIOQUÍMICA.

Fermentación y condiciones de cultivo

Crioconservación de las cepas

De una caja de agar-LB, con o sin antibiótico de acuerdo con la cepa, se tomó una colonia y se desarrolló en caldo LB con o sin antibiótico de acuerdo con la cepa a 37 °C y 300 rpm hasta alcanzar una $O.D_{600nm} \approx 1.5$, Este se diluyó en 800 μ L del cultivo 1:2 con glicerol al 80% en crioviales, los cuales se almacenaron a -70 °C.

Preinóculo

Desde el vial crioconservado a -70 °C de cada cepa; se estirió a una caja de LB con o sin antibiótico (Km^{50} o Spe^{50}) de acuerdo con la cepa a evaluar, y se incubó por 12 h a 37 °C. De estas cajas se aislaron tres colonias al azar y se inocularon en tubos estériles con 3 mL de medio LB con o sin antibiótico respectivamente y se incubaron por 3 h a 37 °C y 300 rpm.

Inóculos.

Inóculo microplacas

Se determinó la $O.D_{600nm}$ de los preinóculos; y se tomó el volumen necesario para iniciar en una $O.D_{600nm}$ de alrededor de 0.01 en 5 mL de medio mineral AM2 con MOPS 0.1 M pH 7.0, suplementado con ácido cítrico 100 mg/L y D-xilosa (2, 4, 10, 20 g/L de acuerdo al ensayo) como única fuente de carbono así como antibiótico de acuerdo a la cepa (Km^{50} o Spe^{30}); cada inóculo se incubó a 37 °C, 300 rpm por 12 h.

Inoculo minifermentadores

Se añadieron los 3 mL de preinóculo a 200 mL de medio mineral AM2 suplementado con D-xilosa (40 g/L) como única fuente de carbono (Medio de selección); también se adicionó antibiótico de acuerdo con la cepa (Km^{50} o Spe^{30}); y se controló automáticamente el pH a 7.0, mediante la adición de KOH 2 M. El cultivo se incubó en el minifermentador a 37 °C, 150 rpm, por 18 a 24 h de acuerdo con la velocidad de crecimiento de la variante.

Cultivos y determinación de los parámetros de la cinética de crecimiento de las cepas.

Microplacas

Para realizar la cinética de crecimiento de las cepas de estudio, se tomó una fracción de inóculo suficiente para tener una O.D_{600nm} cercana 0.01 en 2 mL. El volumen de inóculo calculado se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 2 ml de cultivo AM2 suplementado con 100 mM MOPS pH 7.0, a la concentración de D-xilosa necesario para el ensayo (2, 5, 10, 20 g/L) con o sin antibiótico (Km⁵⁰ o Spe³⁰) de acuerdo con la cepa.

En una placa de 96 pozos se colocaron 200 µL del medio con la cepa de interés y en cada columna de la placa (8 pozos) una variante; mediante ELx808™ Absorbance Microplate Reader se tomaron medidas de O.D_{630nm}, cada 20 min por 24 h a 37 °C y agitación media; cada experimento se realizó tres veces, siempre partiendo del mismo criovial.

Minifermentadores

Para realizar la cinética de crecimiento de cada cepa de estudio, se tomó una fracción de inóculo suficiente para tener una O.D_{600nm} cercana 0.1 en 200 mL de medio; la fracción tomada se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min a 25 °C; se desechó el sobrenadante y las células se suspendieron en 6 mL de medio de selección. De esta suspensión celular se vaciaron 2 mL en cada minifermentador el cual contenía 248 mL de medio de selección. Los cultivos se incubaron en condiciones sin aireación por 48 h a 37 °C, 150 rpm, y control de pH en 7.0 por adición controlada de KOH 2.0 N. El consumo de base, que es proporcional al ácido producido durante la fermentación, fue registrado durante todo el desarrollo del cultivo, cada condición de cultivo se determinó por triplicado.

Para determinar los parámetros cinéticos del cultivo, se aisló una muestra de 1.5 ml desde el momento en que se añadió el inóculo y después de cada 3 horas durante las primeras 12 h; luego, cada 12 h hasta completar 60 h. A cada muestra se le determinó la O.D_{600nm}, luego, se

centrifugó a 13,000 rpm por 2 min y el sobrenadante se filtró, pasando la muestra a través de filtros de membrana de Nylon de 0.2 μ m. Las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta determinar la concentración de metabolitos presentes por HPLC.

Métodos analíticos

De los minifermentadores se obtuvieron muestras de 1.50 mL a las que se les midió O.D_{600nm} con un espectrofotómetro (GENESYS™ 20 Visible Spectrophotometer - ThermoFisherScientific), con estos datos se determinó el peso seco de las células, multiplicando la absorbancia por un coeficiente de 0.37 g/L determinado previamente de una curva de peso seco (Utrilla Carreri et al., 2012). El resto de la muestra se centrifugó y se descartaron las células; el sobrenadante se filtró usando membranas de nylon con un tamaño de poro de 0.2 μ m, luego se tomaron 300 μ L de la muestra para analizarlos mediante HPLC (Bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, índice de refracción 2410 y detector de arreglo de fotodiodos 996, Waters Co., USA). Para la determinación de D-xilosa, D-lactato, piruvato y acetato, se empleó la columna Aminex (HPX-87H, BioRad, CA, USA 300x7.8 mm x 9 μ m). Las condiciones de corrida fueron: fase móvil 5 mM H₂SO₄, flujo 0.5 ml/min y temperatura 50 °C. El piruvato y el acetato fueron determinados por índice de refracción, mientras que lactato y la D-xilosa; fueron identificados por el detector de arreglo de diodos a 210 nm. La cuantificación de los analitos se hizo mediante integración del área del pico de la muestra en el cromatograma y comparación de este con las curvas de calibración obtenidas de soluciones de diferentes concentraciones conocidas de los analitos a cuantificar. El análisis y procesamiento de cada cromatograma se realizó mediante el software Millenium.

Determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cinéticas de crecimiento de las cepas.

En la cuantificación de cada analito de la fermentación (g/L, g/L D-xilosa, g/L lactato, g/L acetato y g/L piruvato), los valores determinados se ajustaron usando un factor de dilución (**Fd**), para corregir, la variación del volumen en el fermentador por la adición de base (KOH, 2 N)

Factor de dilución (Fd)

Este factor adimensional depende de la base adicionada (V_{KOH}) y el volumen de trabajo de partida (V_0). Para la corrección de los datos se multiplicó el factor de dilución por el valor crudo.

$$F_{d=\frac{(V_0+V_{KOH})}{V_0}}$$

Este dato fue calculado en cada toma de muestra a partir del volumen de base añadida por el sistema de control en el momento (t). Luego los datos se corrigieron de la siguiente manera

$$\text{Biomasa} = \text{Biomasa}_t (\text{DCW g/L}) * F_{d_t}$$

$$\text{Xilosa} = \text{xilosa}_t (\text{g/L}) * F_{d_t}$$

$$\text{Analito} = \text{analito}_t (\text{g/L}) * F_{d_t}$$

$$\text{Láctico} = \text{láctico}_t (\text{g/L}) * F_{d_t}$$

Los datos corregidos con el Fd se usaron para construir las cinéticas de crecimiento (Biomasa v/s Tiempo), consumo de D-xilosa (Xilosa v/s Tiempo) y producción de lactato (Lactato v/s Tiempo) a partir de estas se calcularon los parámetros cinéticos con las relaciones matemáticas enlistadas en el Apéndice G

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DEL FONDO GENÉTICO

Eliminación de las permeasas de D-xilosa conocidas en la cepa de *E. coli* CL3.

Se generó la cepa con el fondo genético disminuido para el transporte de D-xilosa, desde la cepa CL3 (*MG1655:: ΔpflB ΔadhE ΔfrdA*). Con la transducción con el fago P1 (Cherepanov & Wackernagel, 1995) se eliminaron los genes de las permeasas remplazándolos por un gen de resistencia obtenido de las cepas donadoras de la colección KEIO (Baba et al., 2006).

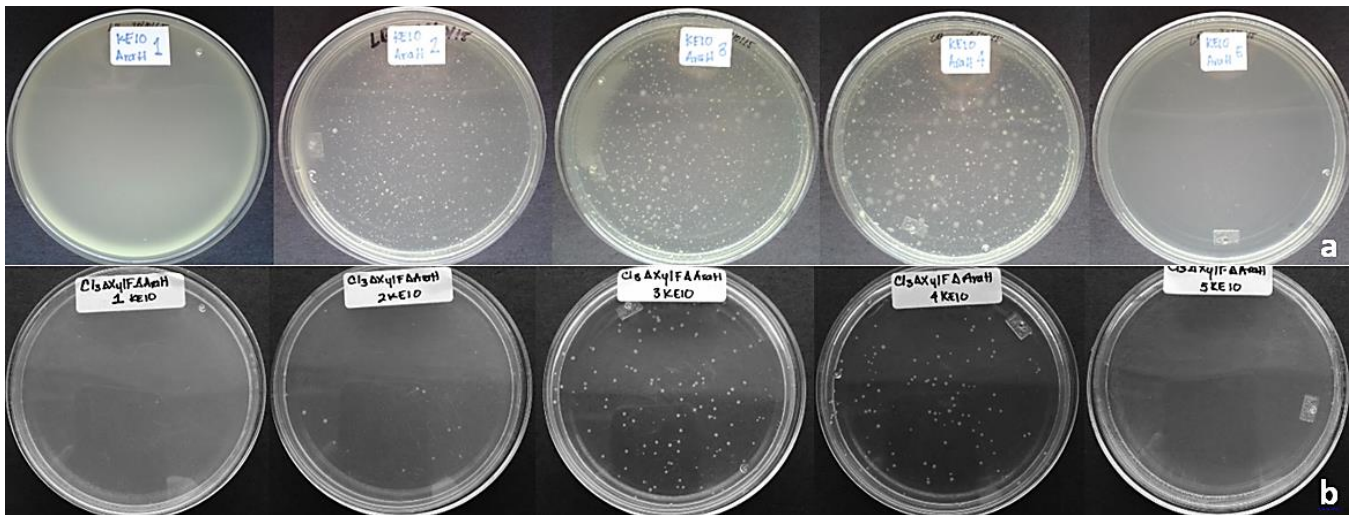


Figura 11. Transducción con el fago P1. En la fila (a) se observan las células lisadas de la cepa KEIO 1897 (cajas 2-4) con el fago P1 junto al control negativo de células y fagos (cajas 1 y 5), los fagos generados en este paso fueron usados en la fila (b) donde se pueden ver colonias de la cepa receptora CL3ΔxyIF (ΔF) transformadas con el fenotipo de resistencia a Km^{40} (caja 2-4) y los controles positivos de células y fagos (cajas 1 y 5).

En la Figura 11 se observan las cajas obtenidas de la traducción con el fago P1 con la cepa KEIO 1897 de la eliminación del gen *araH* (Sumiya et al., 1995). De forma secuencial se eliminaron los genes que codifican para cada uno de los transportadores conocidos de D-xilosa: *xyIF* (Sumiya et al., 1995), *xyIH* (Sumiya et al., 1995), *araH* (Scripture et al., 1987), *xyIE* (Wisedchaisri, Park, Iadanza, Zheng, & Gonen, 2014), *araE* (Stoner & Schleif, 1983), *galP* (P.

J. Henderson, Giddens, & Jones-Mortimer, 1977), *gatC* (Nobelmann & Lengeler, 1996; Utrilla Carreri et al., 2012).

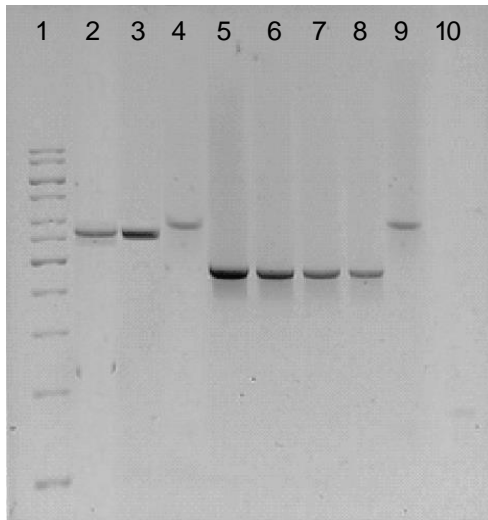


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la comprobación mediante PCR de la eliminación del gen *xylF* con los oligos para región del gen *xylFGH*
 1.Escalera_1Kb_Invitrogen® 2.Cepa_MG1655 3.Cepa_CL3
 4.Cepa_KEIO_xylF 5.Colonia_ΔF#1 6.Colonia_ΔF#2 7.Colonia_ΔF#15
 8.Colonia_ΔF#22 9.Clon_ΔF::Km#1 10.Clon_ΔF::Km#2

La eliminación del gen *xylF* se llevó a cabo usando la cepa *KEIO ECK3555* y como receptora la cepa *CL3*; solo la clona *CL3ΔxylF::Km#1* se utilizó para desactivar el gen de *km^R*. Se comprobó mediante PCR la correcta eliminación en cromosoma (Figura 12)

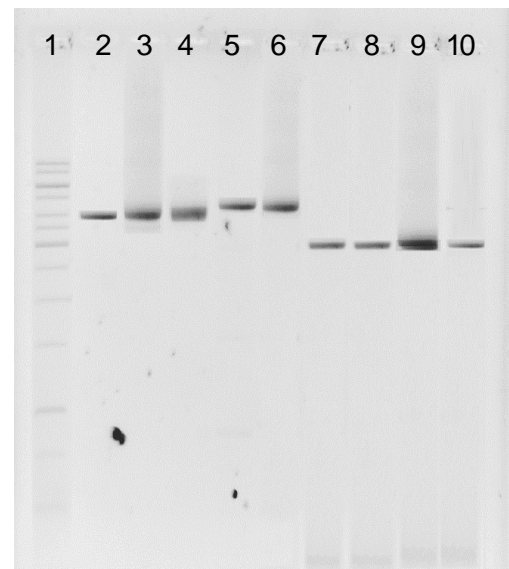


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para comprobar la eliminación del gen *araH* con los oligos para la región del gen *araFGH*
 1.Escalera_1Kb_Invitrogen® 2.Cepa_MG1655 3.Cepa_CL3
 4.Cepa_ΔF 5.Cepa_KEIO_AraH 6.Clones_Δ²H::Km(1-10) 7.Clon_Δ²H#4
 8.Clon_Δ²H#6 9.Clones_Δ²H(10-15) 10.Clones_Δ²H(15-20)

La colonia *CL3ΔxylF#1* (ΔF) se usó como base para generar la siguiente eliminación del transportador *XylH* desde la cepa donadora la cepa *KEIO ECK3557*. Se aislaron 6 colonias y se evaluó el fenotipo por PCR y todas presentaron la pérdida, por lo que la colonia

CL3ΔxyIFH::Km#1 se utilizó para recombinar y desactivar el gen de *km^R*; la cepa resultante se usó como cepa receptora para la eliminar la permeasas AraH y como cepa donadora se utilizó la *KEIO ECK1897*.

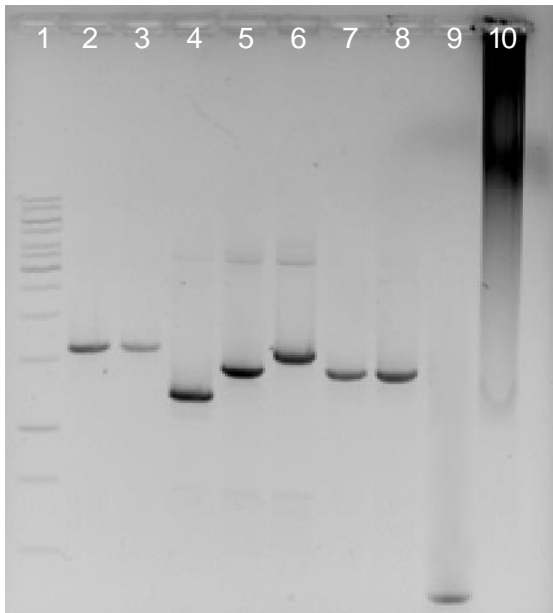


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para comprobar la eliminación del gen *xylE*
1.Escalera_1Kb_Invitrogen® 2.Cepa_MG1655 3.Cepa_Cl3
4.Cepa_JU15ΔΔ::Cm 5.Cepa_KEIO_XylE 6.Cepa_Δ²H
7.Clones_Δ³E::Km(1-5) 8.Clones_Δ³E::Km(6-10) 9.Clones_Δ³E(1-5)
10.Clones_Δ³E(6-10).

Siguiendo la misma metodología se construyó la cepa *CL3ΔxyIFH ΔaraH#6* (Δ²H) y por PCR se evaluó la eliminación de la permeasa (Figura 13). La cepa Δ²H#6 se usó como cepa receptora de la eliminación del transportador XylE usando como donadora a la cepa *KEIO ECK4023*. La cepa resultante *CL3ΔXyIFHΔAraHΔXylE* (Δ³E) se evaluó en función del tamaño de su producto de PCR (Figura 14).

Se eliminó AraE partiendo de la cepa Δ³E#1 usando la cepa de *KEIO ECK2839* como donadora. El tamaño de los productos de PCR del gen *araE* (1419 bp), es semejante al gen de resistencia *km^R* (1400 pb). Por lo que se confirmó su eliminación mediante restricción de los productos de PCR, con la enzima *BsaHI*, que hace dos cortes en el gen *araE*, y no tiene sitio de restricción en el gen *km^R*.

En la (Figura 15), se comprobó que la recombinación se llevó a cabo; no obstante, la pérdida del gen *km^R* no se observa en el producto de PCR, por lo que, se evaluaron más clonas hasta hallar una con el genotipo deseado *CL3ΔxylFHΔaraHΔxylEΔaraE (Δ⁴E)*.

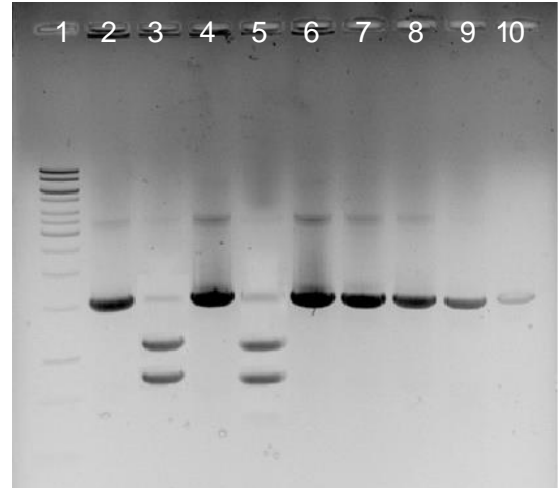


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para comprobar la eliminación del gen *araE*
 1.Escalera_1Kb_Invitrogen®, 2.Cepa_MG1655,
 3.Retricción_BsaHI_MG1655, 4.Cepa_Δ3E,
 5.Retricción_BsaHI_Δ3E, 6.Clones_Δ4E::Km_(1-5),
 7.Clones_Δ4E::Km_(6-10), 8.Retricción_BsaHI_Δ4E::Km_(1-5),
 9.Retricción_BsaHI_Δ4E::Km_(6-10)
 10.Clon_Δ4E:Km#1_pCP20.

Luego se inactivo el gen del simporte GalP; por transducción con la cepa *KEIO ECK2938*; de este evento se obtuvieron varias clonas, se analizó el producto en función de su patrón de restricción y se comprobó la pérdida del gen de resistencia por fenotipo y sus productos de PCR.

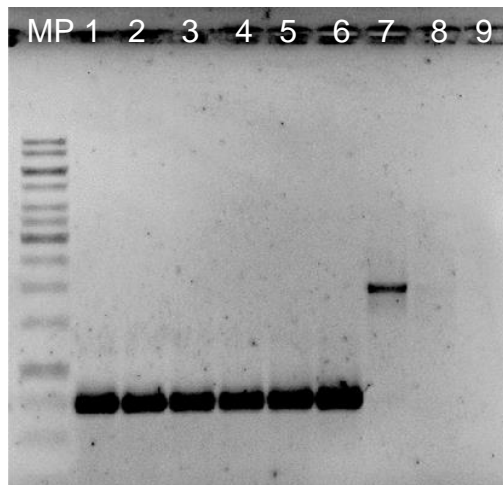


Figura 16 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para detectar la eliminación del gen *gatC* en las clonas aislados de la transducción de la clona Δ^4E . MP. Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.Clonas 1_5 2.Clonas 6_10 3.Clonas del 11_15 4.Clonas del 16_20 5.Clonas 21_25 6.Clonas 26_30 7.Cepa MG1655 8.Cepa CL3. 9. Cepa JU15.

Se hizo transducción con la cepa *KEIO ECK2085* para desactivar finalmente el gen de la permeasa GatC. Sin embargo, en repetidos eventos de transducción no se aislaron colonias

transformadas de la cepa Δ^5P ; se comprobó la viabilidad de los fagos con la cepa silvestre *MG1655*, y se obtuvieron colonias. Esto nos hizo suponer que la cepa Δ^5P presentaba resistencia a la transducción. Se intentó realizar la eliminación con el método de desactivación de Datsenko – Wanner, pero tampoco se obtuvo el fenotipo buscado, por lo cual se decidió cambiar el orden del evento de la transducción y de esta manera comprobar si el problema era el fenotipo $\Delta^5P::\Delta GatC$.

Desde la cepa Δ^4E se realizó la eliminación de la permeasa *GatC* mediante transducción con la cepa *KEIO ECK2085* y después de inducir la recombinación del gen de resistencia y comprobar el fenotipo mediante PCR de la región (Figura 16); se realizó la eliminación del gen *galP* mediante transducción con la cepa *KEIO ECK2938*.

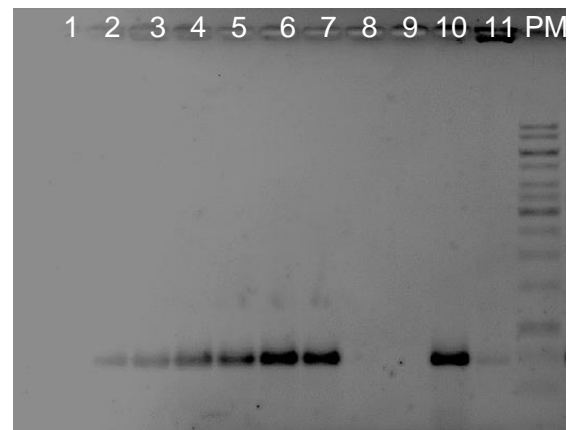


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR eliminación del gen *galP* en las clonas aislados de la transducción de clon Δ^5G con el oligo *K2* y el oligo *GalPrv* 1.Clonas 1_4 2.Clonas 5_8 3.Clonas del 9-13 4.Clonas del 14-18 5.Clonas 19_23 6.Clonas 24_28 7.Clonas 29_32 8.Cepa *CL3* 9.Cepa silvestre. 10.Clon #4 11.Cepa *KEIO ECK2938* PM.Escalera_1Kb_Invitrogen®. Se comprueba la eliminación porque en la cepa silvestre *MG1655* y parental *CL3* no hay amplificación por la ausencia del gen de resistencia a Kanamicina presente en las clonas aisladas.

La cepa resultante *CL3:: $\Delta xyIF \Delta araH \Delta xyIE \Delta araE \Delta galP::FRT-KmR-FRT \Delta gatC$* ; se le evaluó la presencia del gen de resistencia por PCR usando los oligos *K2* y *K1*, los cuales se unen a la región intermedia del gen de *kmR*; y por amplificación con los oligos “forward” y “reverse” correspondiente de la región flanqueante se confirmó el fenotipo de interés como se observa en la Figura 17, un cultivo de la clona # 4 con el fenotipo *CL3 $\Delta xyIF \Delta araH \Delta xyIE \Delta araE \Delta galP::FRT-Km^R-FRT \Delta gatC$ (Δ^6G)* se crioconservo a $-70^{\circ}C$ para su posterior caracterización.

Caracterización genotípica de las mutantes generadas y del fondo genético Δ^6G

En todas las cepas el fondo genético común el cual es derivado de la cepa parental CL3 (Tabla 5), se confirmó, mediante la verificación de la eliminación de las regiones de los genes *frdA*, *adhE* y *pfl* mediante PCR con los oligos apropiados de cada una como se observa en la Figura 18.

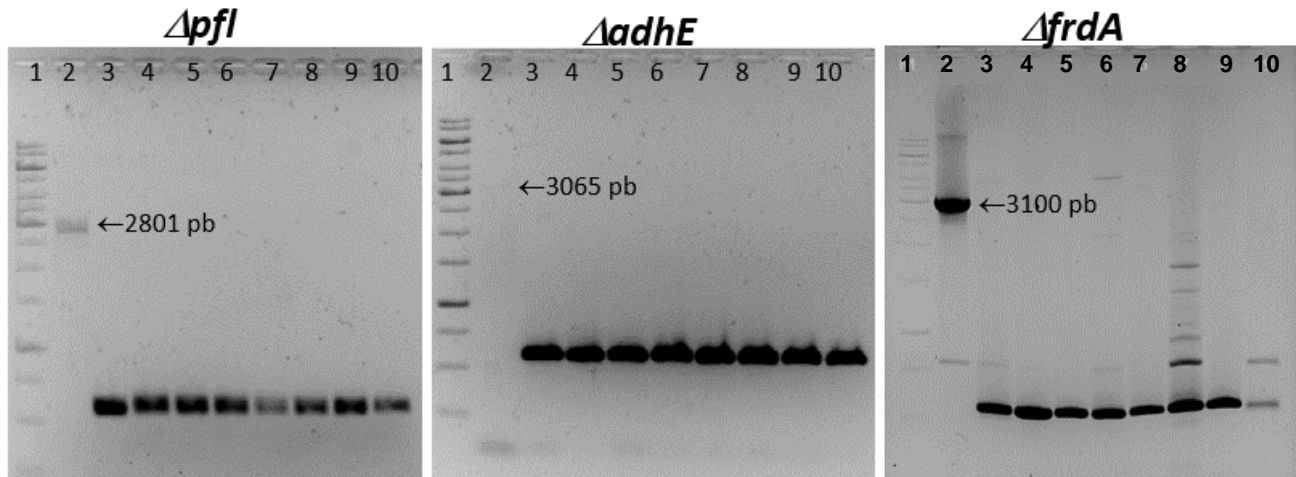


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del fondo común MG1655: Δpfl $\Delta adhE$ $\Delta frdA$ El orden de las muestras en todos los geles es 1. Escalera_1Kb_Invitrogen® 2. Cepa MG1655 3. Cepa CL3 4. JU15 5. ΔF 6. Δ^2H 7. Δ^3E 8. Δ^4E 9. Δ^5P 10. Δ^6G . Se observa la pérdida en todas las cepas mutantes del gen presente en la cepa silvestre MG1655.

Luego se confirmaron en todas las cepas las eliminaciones de los genes de los transportadores y se verificó que las eliminaciones se conservaran en las cepas posteriores a la cepa que tuvo la pérdida.

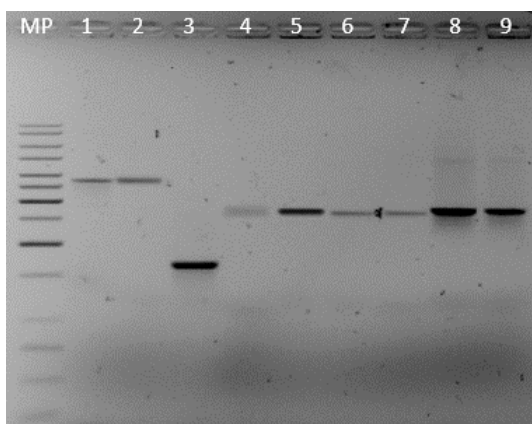


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la eliminación del gen *xylF* MP. Escalera 1Kb Invitrogen® 1. MG1655 2. CL3 3. JU15 4. ΔF 5. Δ^2H 6. Δ^3E 7. Δ^4E 8. Δ^5P 9. Δ^6G . Se observa la pérdida del gen a partir de la clona ΔF y su presencia en las cepas posteriores, en el caso de la cepa JU15 el tamaño de la banda es menor porque no tiene el operón completo *xylFGH*.

Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la eliminación del gen *araH* MP.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ^2 H 6. Δ^3 E 7. Δ^4 E 8. Δ^5 P 9. Δ^6 G. Se observa la pérdida del gen a partir de la clona Δ^2 H y el mantenimiento de la eliminación en las cepas posteriores a esta cepa.

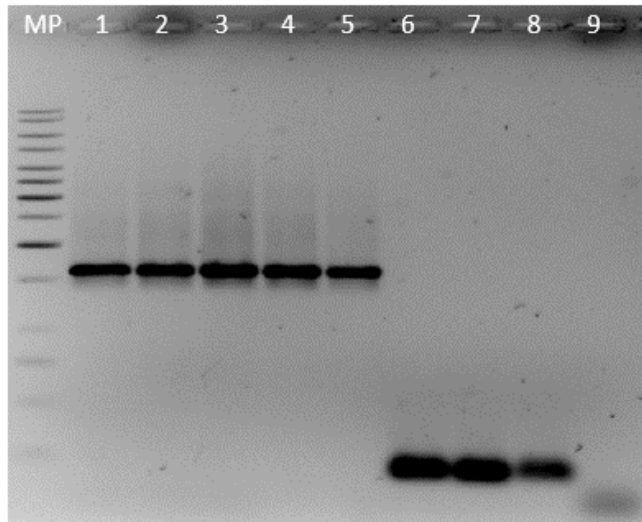
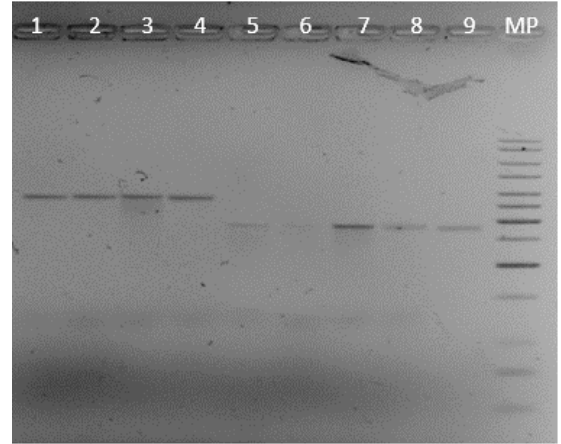
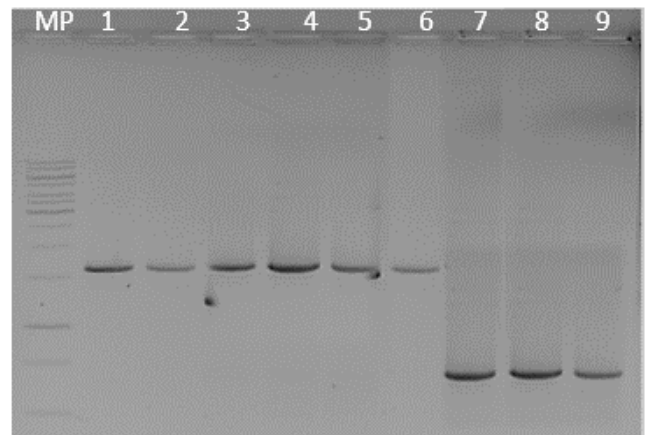


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la eliminación del gen *xylE* MP.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ^2 H 6. Δ^3 E 7. Δ^4 E 8. Δ^5 P 9. Δ^6 G. Se observa la pérdida del gen a partir de la clona Δ^3 E y la conservación de esta característica en las clonas posteriores.

Figura 22. . Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la eliminación del gen del simporte *AraE* MP. Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3. JU15 4. Δ F 5. Δ^2 H 6. Δ^3 E 7. Δ^4 E 8. Δ^5 P 9. Δ^6 G. Se observa la eliminación del gen a partir de la clona Δ^4 E y la conservación de esta característica en las clonas posteriores.



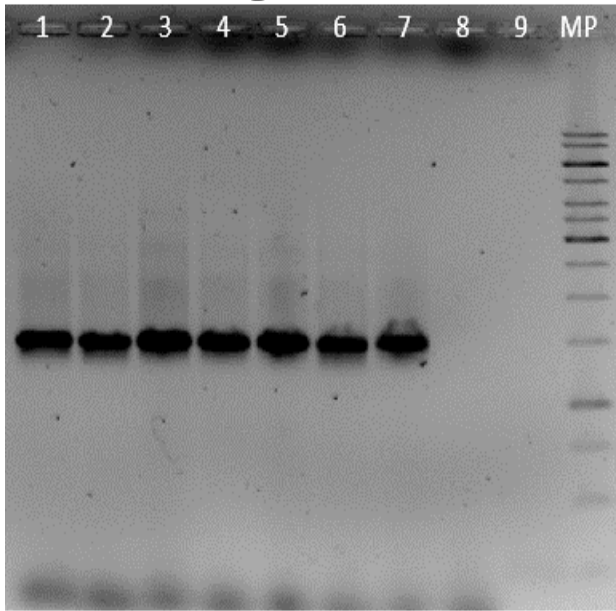


Figura 23. . Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la eliminación del gen galP 1.MG1655 2.CL3 3. JU15 4.ΔF 5.Δ²H 6.Δ³E 7.Δ⁴E 8.Δ⁵P 9.Δ⁶G. MP. Escalera_1Kb_Invitrogen® Se observa la eliminación del gen GalP desde la clona Δ⁵P y la conservación de esta característica en las clona posterior, no hay amplificación en las cepas finales porque los oligos se unen a una región interna del gen que se pierde en la recombinación con el gen de resistencia a Km.

Como se observa en las Figuras 19 a 23, todas las cepas generadas presentan los tamaños esperados de los productos de PCR, lo cual confirma las eliminaciones correspondientes de cada permeasa en las cepas correspondientes y en la cepa final Δ⁶G (Figura 24). Esta última cepa Δ⁶G se usó como fondo genético para las pruebas de complementación fenotípica con las variantes de la permeasa GatC generadas por epPCR en este trabajo.

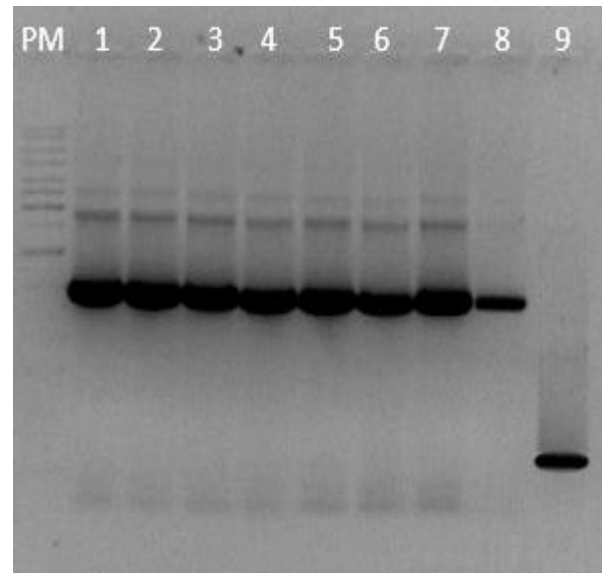


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la eliminación del gen gatC. MP.Escalera_1Kb_Invitrogen® 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4.ΔF 5.Δ²H 6.Δ³E 7.Δ⁴E 8.Δ⁵P 9.Δ⁶G.

Evaluación cualitativa del transporte de D-xilosa en medio MacConkey con D-xilosa 0.2% y en medio AM2 sólido con D-xilosa (0.2%).

El medio MacConkey es un medio selectivo y diferencial para bacterias gram negativas de la familia Enterobacteriaceae. Sin embargo, en este ensayo sirvió para caracterizar cualitativamente el consumo de D-xilosa de las mutantes del fondo genético y evaluar su sensibilidad como posible método de selección para el tamizado de las variantes de la librería. Normalmente este medio es suplementado con lactosa como fuente de carbono; pero para esta prueba se usó sin lactosa y se suplementó con D-xilosa.

Rutinariamente, el medio MacConkey es usado para diferenciar bacterias Gram negativas fermentadoras de las no fermentadoras. En este ensayo se buscó generar una prueba cualitativa rápida para diferenciar el transporte de D-xilosa debido al efecto de la eliminación de las permeasas y su conversión, por fermentación a ácido láctico (producto principal de la cepa progenitora CL3). Observado por el viraje del indicador rojo neutro del medio MacConkey, desde un color rojo sangre ocasionado por la producción de ácidos orgánicos producto del catabolismo de la D-xilosa cuando es transportada y luego fermentada a ácido láctico, a un color amarillo cuando la bacteria no puede transportar la D-xilosa y debe consumir los aminoácidos de la peptona que al desaminarse liberan amoniac y llevan al aumento del pH del medio.

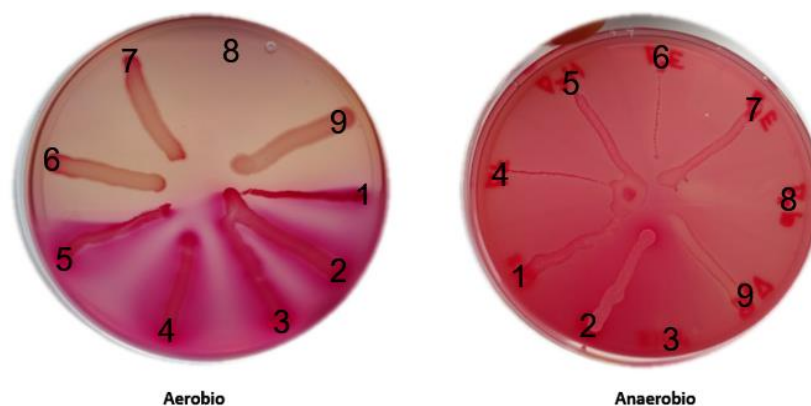


Figura 25. Cajas de Petri de cultivos en medio MacConkey suplementado con D-xilosa 2g/L. 1.MG1655 2.CL3 3.JU15 4. Δ F 5. Δ ²H 6. Δ ³E 7. Δ ⁴E 8. Δ ⁵P 9. Δ ⁶G.

En este ensayo (Figura 25) todas las cepas (exceptuando la *MG1655*) tienen la misma vía metabólica fermentativa, heredada de la cepa homoláctica parental *CL3*, que tiene una eficiencia de conversión de azúcares a ácido láctico del 95%(Utrilla Carreri et al., 2012), lo que implica que todas las cepas generadas tienen la misma capacidad de catabolizar la conversión de D-xilosa a ácido láctico. Sin embargo, no tienen la misma capacidad de consumo de D-xilosa (varía dependiendo de los transportadores que expresen y que, por la eliminación secuencial de los genes de los diferentes transportadores entre cada cepa, no deber ser igual).

En la (Figura 25) se observa el efecto del metabolismo aerobio y anaerobio en las cepas. En el metabolismo aerobio hay un cambio notorio desde la cepa con el metabolismo intacto (*MG1655*) hasta la cepa con todas las eliminaciones (Δ^6G). En este caso, como el metabolismo no se dirige únicamente a la producción de ácido láctico (también se puede dar la formación de ácido acético en condiciones aerobias) y se suman efectos de los diferentes metabolitos, el viraje es notorio y parece permitir ver el efecto de la pérdida de los transportadores mejor que en metabolismo anaerobio.

Luego, se realizó una prueba que buscó minimizar los efectos de la biomasa y del estado metabólico de la cepa; al desarrollar todas las cepas a una misma $O.D_{600nm} \approx 1.0$ y a una misma dilución 1×10^{-6} .

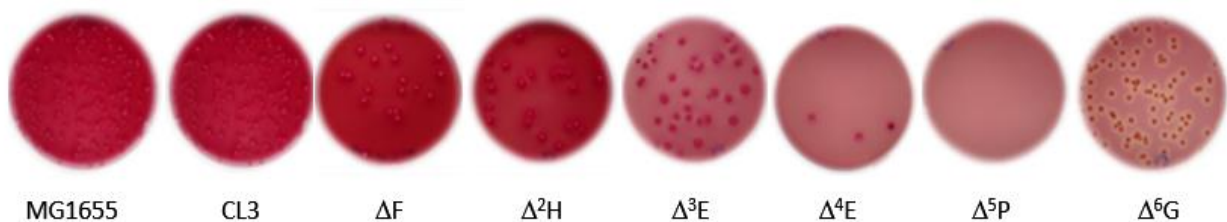


Figura 26. Crecimiento aerobio de las mutantes en medio MacConkey suplementado con D-xilosa 2 g/L: Las mutantes se crecieron a la misma $O.D_{600nm} \approx 1$ y se sembraron a un factor de dilución de 1×10^{-6} . Se observa que a partir de la pérdida del transportador *XylE* (Δ^3E) hay una pérdida de la capacidad de consumo de D-xilosa, por la variación de la coloración de rojo a rosado.

En la Figura 26 se observó que la eliminación del transportador XylE reduce drásticamente la coloración roja; coherente con lo reportado (R. Daruwalla, 1980). Cabe recordar que XylE es el segundo transportador de D-xilosa; de ahí en adelante solo se vuelve a observar un cambio por la eliminación del transportador GalP (datos no mostrados). Se ha reportado (Verónica Hernández-Montalvo et al., 2003) que GalP puede transportar D-xilosa, lo cual se observa por la aparición de un halo amarillo alrededor de las colonias. Este permaneció constante cuando se eliminó la permeasa GatC. Sin embargo, el centro de las bacterias no era amarillo lo cual indica que en la sexta deleción aún hay transporte residual de D-xilosa.

En la literatura se reporta que los transportadores específicos XylFGH, XylE y los inespecíficos AraFGH, AraE, GalP y GatC pueden transportar D-xilosa. Las pruebas en cajas confirmaron cualitativamente estos resultados. Sin embargo, en el caso de la eliminación del transportador XylFGH no se observó un efecto al eliminarlo, lo que significa que la sensibilidad de este método es deficiente porque no permite diferenciar entre una variante con el transporte alto de uno medio.

Posteriormente se verificó el crecimiento de todas las cepas en medio sólido AM2 suplementado con D-xilosa (2 g/L); tanto en condiciones anaerobias y aerobias. Aquí se buscó correlacionar el tiempo de crecimiento de la colonia con el transporte diferencial de D-xilosa de las cepas debido a la pérdida de genes. Los resultados sugieren que las colonias pequeñas corresponden al fenotipo en anaerobiosis y las colonias grandes en aerobiosis, exceptuando la cepa Δ^4E que mostro colonias grandes en ambas condiciones. También se observó que en anaerobiosis todas las cepas tienden a crecer uniformemente a las 36 h aproximadamente después de la siembra. En aerobiosis la cepa silvestre *MG1655*, crece a las 12 h de siembra; mientras que el resto de las cepas crecen alrededor de las 18 h. Debido a lo anterior se descartó el uso de este método para el tamizado de la librería de variantes. En todas las condiciones la cepa Δ^5P no crece; a la fecha no tenemos una explicación experimental comprobada para este comportamiento.

Una explicación a este fenómeno podría ser por que la eliminación del gen *galP* afecta la expresión del gen *yggI*. Como se muestra en la Figura 27 por anotación bioinformática, al final del gen *galP* se predice la existencia de dos zonas promotoras (*yggIp3* y *yggIp6*), los cuales están implicadas en la regulación de la expresión del gen *yggI*; sin embargo, no es clara la función de este gen; un único reporte de R. Utsumi y T. Suzuki en GenBank D83644 lo relaciona con el regulon del factor de estrés *RpoS*, el cual, regula al morfogen *boIA*. Este último es importante en bacterias Gram-negativas porque regula genes implicados en la morfología y protección de la célula en condiciones de estrés; su desregulación perjudica la velocidad de crecimiento y altera las propiedades de la membrana externa (Aldea, Garrido, Hernández-Chico, Vicente, & Kushner, 1989).

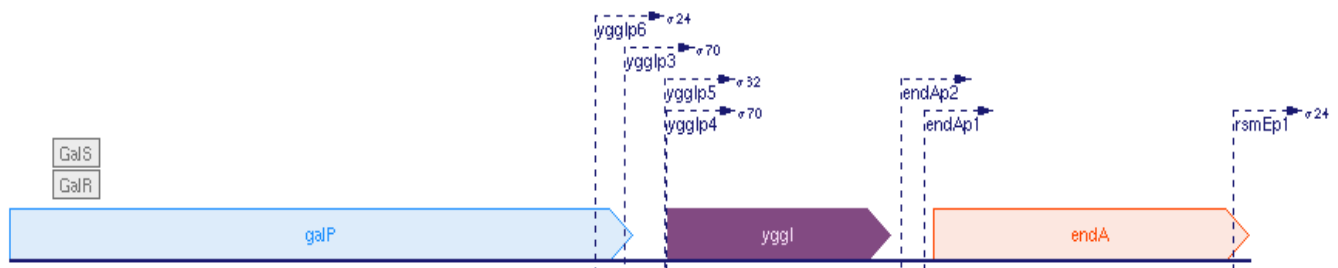


Figura 27 Contexto genético del gen *yggI*. Se observa al final de gen *galP* hay dos sitios promotorales (*yggIp3* y *yggIp6*) dentro del gen *galP*, los cuales fueron eliminados durante la transducción con el fago P1 (tomado <https://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG12122#tab=TU>).

También se ha sugerido que el factor *yggI* está involucrado en la respuesta a estrés osmótico e induce a la formación de biopelículas; al inducir cambios en la forma celular, tamaño y contenido de proteínas de la pared celular que la hacen menos permeable a agentes dañinos. Sin embargo, se requieren experimentos para correlacionarlo con el fenotipo observado en Δ^5P ya que en la cepa de *KEIO ECK2938* no se observa ni esta reportado este comportamiento en la mutante Δ^5P (se desarrolla bien en medios líquidos, pero se dificulta su crecimiento en sustratos sólidos). Además, este comportamiento no se presenta en la cepa $\Delta^5P::Km$ que tiene el gen de resistencia en la zona eliminada. Como este fenómeno se desvía de los objetivos y alcances de este trabajo, se minimizó manteniendo el gen de resistencia (Km^R) en todos los experimentos descritos con esta mutante y sus derivadas.

En el ensayo en medio sólido no se detectaron cambios significativos entre las cepas mutantes, la cepa parental y la cepa silvestre, por esta razón se usó otros métodos para caracterizar el aporte de cada transportador.

Evaluación del efecto del transporte de D-xilosa en fermentación con el medio AM2

Mediante la caracterización fenotípica se evaluó el efecto de cada uno de los cambios realizados en el genotipo; sin embargo, como se deduce del experimento anterior, la sensibilidad del método usado no fue suficiente. Por esta razón, se decidió evaluar el comportamiento de las mutantes en fermentación en medio líquido AM2 suplementado con 5 g/L de D-xilosa en microplacas bajo dos condiciones y determinar los parámetros de la fermentación con 40 g/L de D-xilosa en minifermentadores.

Evaluación de la capacidad de crecimiento de las mutantes en medio AM2 en microplacas.

En el ensayo en microplacas se hizo un seguimiento de la $O.D_{630nm}$ con respecto al tiempo. Con esta metodología se verificó la respuesta de todas las cepas (placa de 96 pozos) en una misma condición o en diferentes condiciones, en un mismo experimento. Para este experimento la primera condición que se evaluó fue el efecto del cambio de medio de crecimiento entre el preinoculo e inoculo en la cinética de crecimiento de las cepas con las permeasas eliminadas; en la figura 28 se muestra que las cepas tienen diferentes cinéticas de crecimiento en el medio de evaluación AM2 cuando el preinóculo es desarrollado en a) medio rico LB (sin acondicionamiento) o b) en el mismo medio de cultivo AM2 (acondicionado).

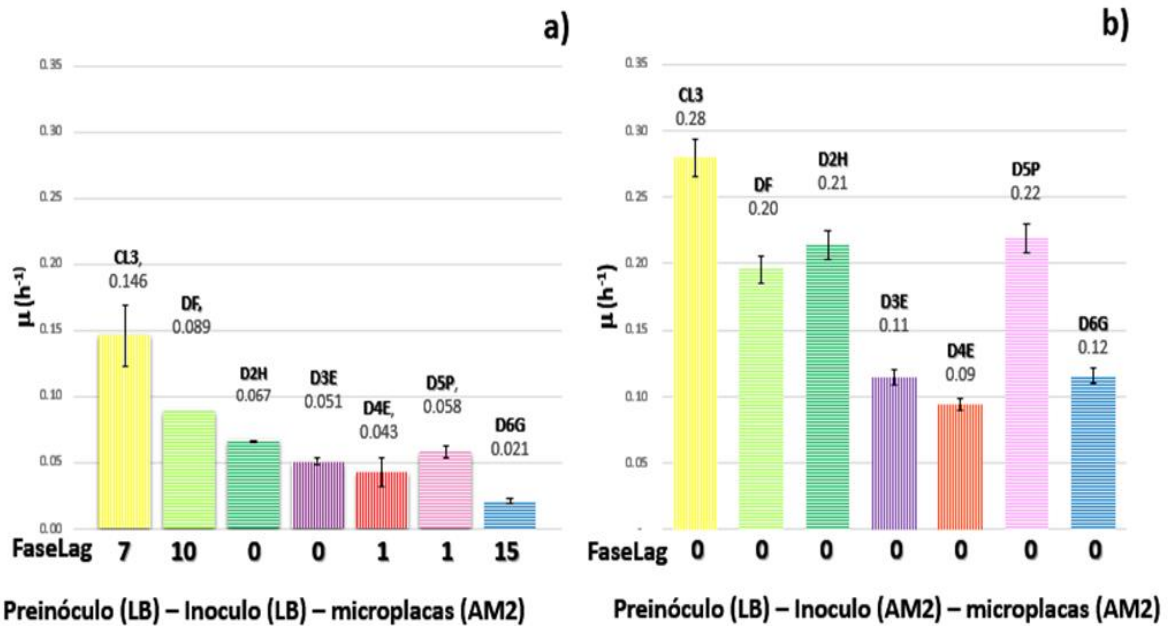


Figura 28. Velocidad de crecimiento y efecto del acondicionamiento en el crecimiento de las mutantes con capacidad de transporte de D-xilosa en AM2 suplementado con 5g/L de D-xilosa. a) sin acondicionamiento. b) con acondicionamiento, resultados obtenidos después de 24h de desarrollo en microplacas de 96 pozos, cada respuesta es el promedio de 3 experimentos independientes.

En la Figura 28, se observó que la mayoría de las mutantes crecidas en la condición sin acondicionamiento (a) presentaron fase lag, la cual se espera teniendo en cuenta que pasan de un medio rico (LB) a un medio mínimo mineral (AM2). Durante la fase lag, se ha reportado que la célula no se reproduce, presenta una indetectable actividad metabólica, gran parte de los operones permanecen inactivos excepto los que expresan proteínas involucradas con el consumo de la fuente de carbono presente, de esta manera, la bacteria enfoca toda la energía y carbono presente hacia la expresión de las proteínas que le permitan desarrollarse rápidamente en la siguiente fase (Madar et al., 2013).

En este experimento se pudo deducir indirectamente la capacidad de cada permeasa para transportar D-xilosa siguiendo la velocidad de crecimiento y en el tiempo que dura la fase lag. Como se observa en la Figura 28a, la cepa parental CL3 presentó una fase lag de 7 h y un 42% de la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre MG1655. Este comportamiento se debe a un déficit en la producción de ATP observado en cepas carentes de la enzima Pfl cultivadas en D-

xilosa y anaerobiosis (Hasona, Kim, Healy, Ingram, & Shanmugam, 2004; Utrilla, Gosset, & Martinez, 2009; Utrilla Carreri et al., 2012).

La eliminación del componente de unión XylF del transportador XylFGH se ha reportado genera una disminución de la velocidad de crecimiento de alrededor del 39% con respecto a la cepa parental CL3 (Song & Park, 1997; Sumiya et al., 1995). En esta prueba la inactivación de componente XylFH se manifiesta en una prolongada fase lag de 10 h.

La inactivación del transportador AraFGH por eliminación de la permeasas AraH disminuye en un 15% más la velocidad de crecimiento (Baldwin & Henderson, 1989; Novotny & Englesberg, 1966). En esta cepa no se observó fase lag, lo que implica que se ha compensado la carencia energética originada de la mutación Δpfl en la cepa parental CL3. Esto se quizás debido a que la pérdida de las permeasas de tipo ABC (XylFGH y AraFGH) que usan ATP en la internalización del azúcar, al eliminarlas, la bacteria usa esta energía para pasar a fase exponencial mientras la D-xilosa se transporta por el transportador XylE u otras permeasas inespecíficas.

Al eliminar el transportador XylE no se observó fase lag, pero se observa una disminución en la velocidad de crecimiento en un 11%. La cual es baja teniendo en cuenta que es el segundo transportador específico de D-xilosa. Esto podría deberse por la presencia de impurezas de arabinosa en el medio que inducen a la expresión del regulador AraC y reprimen el transporte de D-xilosa por este simporte.

La eliminación de AraE disminuyó en un 5% el transporte de D-xilosa, este valor cae en el rango de error del experimento. Por tal razón no se puede aseverar que haya un transporte D-xilosa como se ha reportado (Baldwin & Henderson, 1989). En la literatura se ha establecido que la D-xilosa y la L-arabinosa se reprimen mutuamente mediante los reguladores XylR y AraC, por lo que se esperaba que la eliminación de los transportadores AraFGH y AraE mejoraran la capacidad de transporte de D-xilosa (Desai & Rao, 2010); sin embargo, esto no se observó.

La eliminación del transportador GalP mantiene la misma fase Lag. Sin embargo, la velocidad de crecimiento mejoró en un 10% con respecto a la cepa anterior, lo que sugiere que GalP regula el transporte de D-xilosa, porque su eliminación mejoró el desarrollo de la cepa, pero, no hay reporte de este comportamiento con D-xilosa.

Por último, la eliminación de la permeasa GatC generará una fase lag larga de 15 h y una disminución del 36% en la velocidad de crecimiento. Esto sugiere que esta permeasa transporta D-xilosa probablemente tan eficiente como el transportador XylFGH y mucho más que el transportador XylE (Figura 28b).

En la segunda parte del ensayo el preinóculo se cultivó usando el mismo medio de crecimiento (Figura 28b); en este experimento se observó que la velocidad de crecimiento de todas las cepas es muy semejante y ninguna de las mutantes presentó fase Lag.

En el caso de las permeasas XylH, la cepa ΔF disminuyó ligeramente su velocidad de crecimiento con respecto a la cepa parental (29%), mostrando que este transportador tiene una respuesta rápida; y a un cierto rango de concentración pierde esta eficiencia, contrario a la respuesta del transportador XylE que en la primera condición muestra un imperceptible aporte, pero bajo esta condición tiene una respuesta significativa (36%).

La inactivación de la permeasa *araH* y AraE muestran un aporte insignificante de la velocidad de crecimiento. La eliminación de GalP vuelve a mostrar que esta interviene regulando el transporte de D-xilosa; aquí el crecimiento de la cepa Δ^5P mejora en un 46% con respecto a la cepa anterior. Por último, la eliminación de la permeasa GatC corrobora que este transportador tiene un papel preponderante en el transporte de D-xilosa; su eliminación lleva también a la disminución de la velocidad de crecimiento de la cepa en un 36% con respecto a la cepa anterior.

Evaluación de los parámetros cinéticos de crecimiento en minifermentadores con medio AM2 suplementado con 40g/L de D-xilosa.

Para este experimento se realizaron cinéticas de crecimiento de 62 h (ver Apéndice B) en minifermentadores de 350 mL usando 250 mL de medio mínimo mineral AM2 suplementado con 40 g/L de D-xilosa y control de pH durante todo el tiempo de la cinética de crecimiento; las cinéticas de crecimiento con cada cepa se realizaron por triplicado, los datos de estos experimentos se usaron para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento y estequiométricos correspondientes como se muestra en la Tabla 13.

Primero se caracterizó la cepa *CL3* y como reportó (Utrilla Carreri et al., 2012) esta cepa tiene una velocidad de crecimiento muy baja en D-xilosa, 64% menor que la cepa silvestre *MG1655* debido a la eliminación de la enzima piruvato formato liasa (Pfl) y un rendimiento máximo de producción de 94% bajo las condiciones de trabajo de este estudio a las 62 h de la fermentación, (Tabla 13).

Para llevar a cabo las comparaciones entre la cepa parental *CL3* y las mutantes se utilizó como punto de corte de la cinética de crecimiento 48 h; debido a que a medida que se van eliminando los transportadores, el tiempo necesario para consumir toda la D-xilosa aumenta ostensiblemente; en especial con las mutantes ΔHF , $\Delta^4 E$, $\Delta^5 P$ y $\Delta^6 G$.

Al observar los parámetros cinéticos de crecimiento; la primera característica notoria es la presencia de una fase lag en todas las mutantes; que no se observó en la cepa parental *CL3*, en las microplacas; esta se correlacionó con la respuesta de adaptación de las mutantes al cambio de medio; sin embargo, en las cinéticas en minifermentadores, el inóculo se desarrolló en el mismo medio, por lo que el efecto por inducción se descarta.

La fase lag es un periodo de ajuste, donde la célula se modifica para adaptarse y tomar ventaja del nuevo medio e iniciar su desarrollo; por esto, en modelos de crecimiento, esta se relaciona matemáticamente con el producto de parámetros relacionados como la concentración celular;

el ambiente extracelular; y el estado fisiológico de la célula. En algunos casos se determina como la relación del inverso de la velocidad de desarrollo máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), con un parámetro semiempírico (λ), que está relacionado directamente con el estado fisiológico; y mide el “trabajo de adaptación” que tiene que hacer la célula para entrar a fase exponencial (Journal, Baranyi, & Roberts, 1994; Swinnen, Bernaerts, Dens, Geeraerd, & Van Impe, 2004).

Todas las cinéticas realizadas en los minifermentadores en este estudio se realizaron manteniendo las condiciones ambientales constantes (37°C, 150 rpm, pH 7.0); todos los cultivos celulares se iniciaron a una O.D_{600nm} de 0.1 a partir de un cultivo en fase exponencial O.D_{600nm} $\approx \leq 1.0$. Debido a esto, el estado fisiológico del inóculo es relativamente similar y el ambiente extracelular es idéntico; sin embargo, cada mutante tiene una capacidad diferente de adaptación de acuerdo con su programa genético que moldea su respuesta y determina el momento justo para iniciar su desarrollo celular en una condición determinada.

Bajo las condiciones de este estudio, las diferentes cepas evaluadas debieron adaptarse para paliar con diferentes condiciones de estrés, a saber: desarrollarse en un medio mínimo; a altas concentraciones de D-xilosa (213.3 mM). Aunque el medio AM2 contiene un excelente osmoprotector (Betaina 100 mM), se ha reportado que las pentosas pueden generar 4 veces más estrés osmótico que las sales y hexosas a una dada concentración (Metris, George, Mulholland, Carter, & Baranyi, 2014); y por último, el estrés por inanición a medida que pierden la habilidad para introducir la única fuente de carbono. Aunque, en la Tabla 13 no se ve una correlación directa entre la fase lag y el inverso de la velocidad de crecimiento, si se nota que q_s puede ser usada como el parámetro fisiológico para reflejar la diferencia genética entre las mutantes, ya que se observa una pequeña correlación con la fase lag.

Tabla 13. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas evaluadas en minifermentadores usando medio AM2 suplementados con 40 g/L de D-xilosa y control de pH automatizado con KOH 2N a 37°C y 150 rpm

Cepa	Fase			X_{\max} (g/L)	$Y_{p/s}$ (g lac/g xil)	Fase Exponencial		Fase estacionaria		Q_p (g Lac/L*h)	Q_s (g xil/L*h)
	t (h)	Lag (h)	μ (h ⁻¹)			q_s (g xil/g WDC)	q_p (g lac/g)	q_s (g xil/g WDC)	q_p (g lac/g)		
CL3	48	0	0.096 ± 0.003	0.810 ± 0.108	0.521 ± 0.070	4.077 ± 0.163	0.050 ± 0.007	0.885 ± 0.033	0.461 ± 0.073	0.373 ± 0.045	0.717 ± 0.044
DFH	48	4	0.061 ± 0.018	0.373 ± 0.123	0.913 ± 0.044	0.834 ± 0.530	0.056 ± 0.017	0.283 ± 0.002	0.258 ± 0.030	0.096 ± 0.023	0.105 ± 0.043
D2H	48	2	0.138 ± 0.026	0.833 ± 0.125	0.913 ± 0.012	3.944 ± 0.334	0.126 ± 0.023	0.594 ± 0.040	0.542 ± 0.063	0.451 ± 0.057	0.494 ± 0.015
D3E	48	4	0.096 ± 0.003	0.581 ± 0.092	0.895 ± 0.023	3.174 ± 0.281	0.086 ± 0.004	0.691 ± 0.014	0.618 ± 0.114	0.360 ± 0.077	0.402 ± 0.056
D4E	48	4	0.063 ± 0.008	0.959 ± 0.185	0.925 ± 0.014	0.991 ± 0.240	0.059 ± 0.007	0.326 ± 0.006	0.301 ± 0.020	0.289 ± 0.016	0.312 ± 0.043
D5P	48	8	0.098 ± 0.011	0.427 ± 0.098	0.863 ± 0.016	3.836 ± 0.299	0.084 ± 0.009	0.818 ± 0.014	0.707 ± 0.151	0.301 ± 0.037	0.349 ± 0.051
D6G	48	8	0.040 ± 0.002	0.277 ± 0.056	0.845 ± 0.030	0.643 ± 0.230	0.033 ± 0.002	0.338 ± 0.089	0.286 ± 0.039	0.079 ± 0.028	0.094 ± 0.001

Velocidad de Crecimiento μ (h⁻¹), Rendimiento ($Y_{p/s}$), Velocidad específica de producción de lactato en fase estacionaria y fase exponencial (q_p), Velocidad específica de consumo de D-xilosa en fase estacionaria y fase exponencial (q_s), Productividad volumétrica de lactato (Q_p) Velocidad de consumo volumétrica de D-xilosa (Q_s)

Como se deduce en la Tabla 13 la primera mutante construida, ΔFH , de la inactivación de XylFGH disminuyó 80% de la velocidad de transporte de D-xilosa, que lleva a que la bacteria tenga una velocidad de crecimiento un 36% menor, e induce a la bacteria a generar una respuesta a estrés reflejada en una fase lag de 4h donde esta se adapta a la inanición originada de la disminución del consumo de D-xilosa. La inactivación de AraFGH tiene un efecto positivo; esta cepa muestra una velocidad de consumo de D-xilosa muy semejante a la cepa parental CL3; por lo tanto, se restableció la pérdida de transporte producto de la eliminación del transportador anterior lo que originó un aumento de la velocidad de crecimiento en un 125% más, con respecto a la cepa anterior y una disminución de la fase Lag a 2 h. Este comportamiento, es semejante al observado en microplacas y podría estar relacionado con una compensación metabólica; al disminuir el gasto energético asociado al transporte de D-xilosa por la eliminación de los transportadores ABC dependientes de ATP.

La eliminación del gen *xyIE* mostró una fase lag de 4 h y una disminución en la velocidad de transporte de D-xilosa en un 20%, que provocó una velocidad de crecimiento de la mutante menor en un 31%, con respecto a la cepa anterior (Δ^2H). El comportamiento coincide con el comportamiento en microplacas y con los reportes en literatura de que esta permeasa transporta D-xilosa (P. J. Henderson & Maiden, 1990). Sin embargo, este aumento en la velocidad de consumo de D-xilosa, no es muy importante teniendo en cuenta que este es el segundo transportador específico de D-xilosa. Este efecto coincide con otro reporte donde su eliminación en otro fondo similar al evaluado aquí, tampoco muestra ser tan significativo (Utrilla Carreri et al., 2012).

La eliminación de AraE generó una disminución en la velocidad de consumo de D-xilosa en un 47%; y reflejó una disminución de la velocidad de crecimiento en un 34% esto se correlaciona con el presentado en microplacas y es congruente con los reportes de que AraE transporta inespecíficamente D-xilosa (Novotny & Englesberg, 1966).

La eliminación del transportador GalP provocó un aumento en una velocidad de crecimiento alrededor de 54% con respecto a la cepa anterior; aunque con una fase lag más prolongada de 8h, que la cepa anterior. Esto sugiere que este transportador, igual que el transportador AraFGH posiblemente regula el transporte de D-xilosa en *E. coli* CL3.

Por último, la eliminación de GatC provoca una disminución en la velocidad de crecimiento alrededor del 42.3%; disminución del 59.0% de la velocidad de transporte de D-xilosa con respecto a la cepa anterior; y una fase lag de 8h, igual al de la cepa Δ^5P . Este aumento es comprensible debido al estrés por inanición, sin embargo, si se compara con el que sufre la bacteria al eliminar al transportador XylFG; se puede ver en la Tabla 13 que es relativamente de la “misma” magnitud; pero en dicho caso, solo se produce una fase lag de 4h. Esto podría deberse al “estrés”, por el defecto fisiológico heredado de la cepa Δ^5P (posible pérdida de la expresión del gen *yggI*, que se relaciona a un factor de estrés del regulon *rpoS*), (Aldea et al., 1989; Dong & Schellhorn, 2009; Guinote et al., 2014).

Bajo diferentes condiciones *E. coli* y otras bacterias entéricas, expresan factores σ alternativos a σ^{70} que activan la expresión de regulones especiales, en respuesta a eventos fisiológicos específicos. En respuesta a estrés, el principal regulador conocido es σ^s (RpoS); su máximo nivel de expresión es en fase estacionaria y controla la respuesta a diferentes condiciones de estrés tales como pH, ácidos débiles, hambruna, alta osmolaridad, altas y bajas temperaturas, entre otras (Hengge-Aronis, 1996; Rahman, Hasan, & Oba, 2006).

El nivel intracelular de RpoS es regulado por varios mecanismos dependiendo del tipo del estrés y condiciones de desarrollo; por ejemplo, su transcripción es estimulada por la reducción de la velocidad de crecimiento; mientras su transducción es estimulada por shock osmótico, disminución de temperatura y pH (Rahman et al., 2006). En medio mínimo se ha observado que el nivel de expresión de *rpoS* es alto y condiciona la respuesta de una red compleja de 200 genes; especialmente de factores reguladores como *hfq*, *csrA* y *rpoE* y genes de vías metabólicas como *lysA*, *lysC* y *hisD* (Dong & Schellhorn, 2009). En un estudio en *Salmonella*

enterica serovar Typhi también se observó que mutantes $\Delta rpoS$, bajo condiciones de estrés osmótico, presentan fase lag prolongadas que desaparecen al volver a expresar a *rpoS* (Shiroda, Pratt, Döpfer, Wong, & Kaspar, 2014).

En general al comparar los parámetros de las mutantes (Figura 29), se puede correlacionar que hay una respuesta lineal entre la q_s y μ en casi todas las mutantes; en ellas se observó que su aumento/disminución, se reflejó en un aumento/disminución de μ ; excepto en la mutante Δ^3E ; por lo que, es importante volver a caracterizar mejor su expresión bajo las condiciones de este estudio. Algo importante que se noto es que la eliminación de las permeasas evaluadas aquí no siempre originó una pérdida del transporte de D-xilosa; posiblemente porque la expresión y actividad de las permeasas está sujeta a una red compleja de regulación.

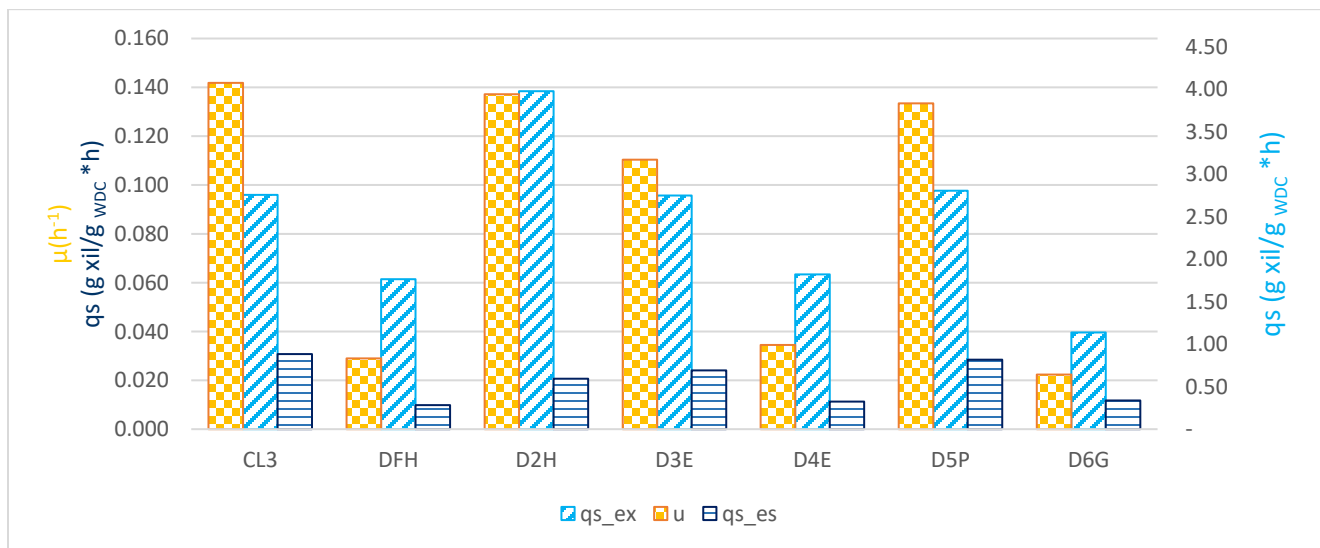


Figura 29. Comparación de los parámetros cinéticos de las mutantes en medio AM2 suplementada con D-xilosa a 40 g/L velocidad de crecimiento (μ), velocidad de consumo de D-xilosa en fase exponencial (q_{s_ex}) y velocidad de consumo de D-xilosa en fase estacionara (q_{s_es}). Se observa una relación directa entre la velocidad de crecimiento y la velocidad de consumo

La mutante Δ^5P presenta la q_s más alta; esto sugiere que la permeasa GatC transporta muy bien e inespecíficamente la D-xilosa; sin embargo, su actividad parece estar fuertemente regulada; porque sólo se observa después de eliminar varias capas de regulación de otras permeasas como AraFGH y GalP.

Las mutantes Δ^{FH} y Δ^{6G} tuvieron la velocidad de consumo de D-xilosa q_s más baja a las condiciones de este estudio, lo que sugiere que las permeasas XylH y GatC son los que aportan más en el transporte de D-xilosa en *E. coli* CL3

La séxtuple mutante Δ^{6G} presentó los efectos fisiológicos más marcados en los parámetros cinéticos de crecimiento y mostró una pérdida en la velocidad de transporte de D-xilosa del 84% en fase exponencial con respecto a la cepa parental CL3. Por esta razón esta cepa se usó como fondo genético para evaluar la librería de mutantes.

EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE LA PERMEASA GatC Y SU DERIVADA GatCS184L

Clonación de las permeasas GatC y GatCS184L en el plásmido pCL

La clonación de los genes de las permeasas en el plásmido pCL se evaluó mediante su patrón de restricción (Figura 30)

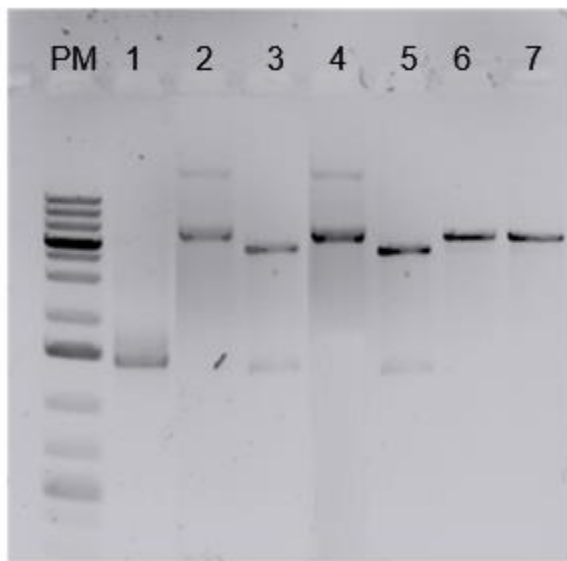


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de restricción de los plásmidos pCLGatC y pCLGatCS184L. PM. Escalera_1Kb_Invitrogen® 1. Inserto gen gatC 2. Plásmido pCLGatC 3. Plásmido pCLGatC digerido con PstI y NcoI 4. Plásmido pCLGatCS184L 5. Plásmido pCLGatCS184L digerido con PstI y NcoI 6. Plásmido pCLGatC digerido con PstI 7. Plásmido pCLGatCS184L digerido con NcoI.

Como se observa en la figura 30 los dos plásmidos (pCLGatC y pCLGatS184L) presentan el patrón de restricción esperado con las enzimas PstI y NcoI que flanquean al gen, liberándolo del esqueleto del pCL (carriles 3 y 5).

Se confirmó que las construcciones tuvieran la secuencia correcta del gen *gatC* y *gatCS184L* mediante la secuenciación con el cebador *M13 fwd* que se une a 57 pb del final del gen y con el cebador *M13 rev* que se une 28 pb del inicio del gen. Para esto se alinearon en el programa *BioEdit* (Figura 31) las secuencias limpias y la secuencia de la cepa silvestre (MG1655), reportada para el gen *gatC*, en el genoma de la *E. coli* MG1655 (GenBank: U00096.3).

Es importante notar que para la clonación se introdujo una mutación puntual, con la intención de generar el sitio de restricción *NcoI*; esto se observa por la presencia en el segundo aminoácido de una Fenilalanina en vez de una Valina. En el caso de la variante *GatCS184L* se puede ver la mutación de un cambio de una serina en la posición 184 por una leucina que no está presente en el gen reportado ni en el gen *gatC* clonado.

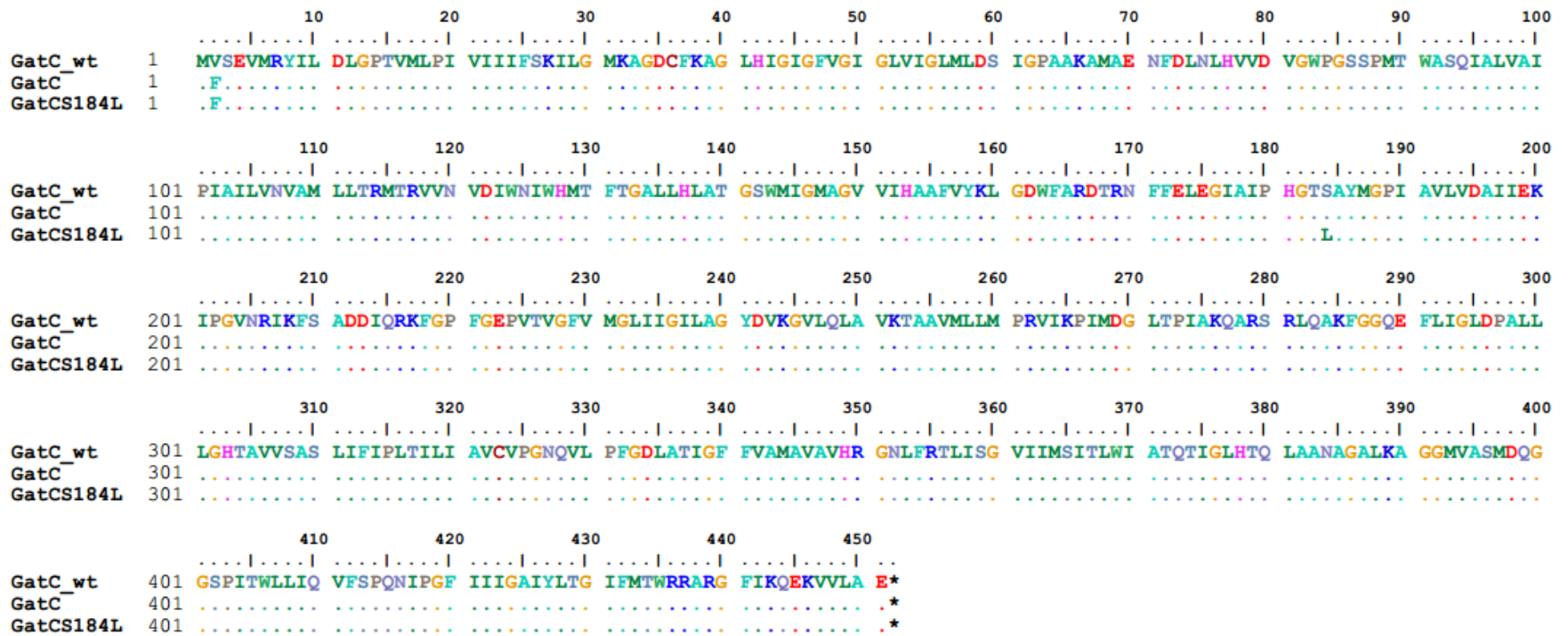


Figura 31. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *gatC* y *gatCS184L*.

Caracterización de la capacidad de transporte de D-xilosa de las permeasas GatC y GatCS184L.

El plásmido derivado de pCL1920 que expresa al transportador GatC (pCLGatC), el otro plásmido derivado de pCL1920 que expresa al transportador mutante GatCS184L (pCLGatS184L) y el vector de expresión vacío (pCL1920) por separado se usaron para transformar cepas electrocompetentes del fondo genético (Δ^6G) y generar las cepas $\Delta^6G/pCLGatC$, $\Delta^6G/pCLGatCS184L$ y $\Delta^6G/pCL1920$ respectivamente. Cada cepa se creció en medio LB con Spe⁵⁰ y se crioconservó; todos los ensayos descritos en este trabajo parten de estos crioviales.

Efecto de la velocidad de transporte de las cepas $\Delta^6G/pCLGatC$ y $\Delta^6G/pCLGatCS184L$ en microplacas a diferentes concentraciones de D-xilosa.

El primer ensayo que se realizó en microplacas se hizo para diferenciar el transporte de D-xilosa de las cepas; como se vio con las mutantes del fondo genético, la velocidad de crecimiento es directamente proporcional a la velocidad de consumo de D-xilosa en fase exponencial. Por esto se hicieron pruebas originalmente en microplacas para evaluar si existía una diferencia en el crecimiento de estas tres cepas. Así mismo también se evaluó el efecto de la concentración de D-xilosa en la capacidad de crecimiento y su efecto en el transporte de las permeasas GatC y GatCS184L.

El experimento en microplacas permitió evaluar la capacidad de las permeasas clonadas en el fondo seleccionado Δ^6G a diferentes concentraciones de D-xilosa (Figura 32). En este se observa que a medida que aumenta la concentración, la velocidad de crecimiento de todas las cepas también. Sin embargo, la velocidad de crecimiento de la cepa de fondo genético Δ^6G

también muestra un aumento proporcional; lo que sugiere, que la D-xilosa aún se transporta por otro sistema activo (otra permeasa), o pasivo (difusión facilitada) diferente a los eliminados (Khankal et al., 2008).

Al aumentar la concentración de D-xilosa hay un aumento de la velocidad de crecimiento proporcional de las cepas Δ^6G y $\Delta^6G/pCL1920$; lo que implica, que el transporte depende del gradiente de concentración de D-xilosa que parece mostrar que este consumo es debido a un mecanismo de difusión facilitada; sin embargo, también se observa que hay un punto de saturación a partir de la concentración 10g/L de D-xilosa, donde el incremento deja de ser proporcional.

En la figura 32 en todos los casos se observa que la velocidad de crecimiento de la cepa Δ^6G , con el vector pCL1920, es levemente superior con respecto a la cepa Δ^6G . Este comportamiento, ha sido ampliamente reportado y se explica qué ocurre debido a la carga metabólica del vector (Bentley, Mirjalili, Andersen, Davis, & Kompala, 1990; Flores, De Anda-Herrera, Gosset, & Bolívar, 2004). Este tipo de comportamiento se ha observado en plásmidos con bajo número de copias cuando la vía de las pentosas es activa, porque esta favorece la síntesis de elementos extracromosomales al aportar intermediarios metabólicos de la síntesis de ácidos nucleicos, como eritrosa-4-fosfato y ribosa-5-fosfato.

Sin embargo, como se observó en los ensayos, con los plásmidos que contiene el gen de las permeasas pierde esta ventaja y la célula no puede suplir con intermediarios metabólicos y replicar elementos foráneos (Flores et al., 2004; Vind, Sørensen, Rasmussen, & Pedersen, 1993) y produce respuestas fisiológicas variadas (Bentley et al., 1990; Flores et al., 2004).

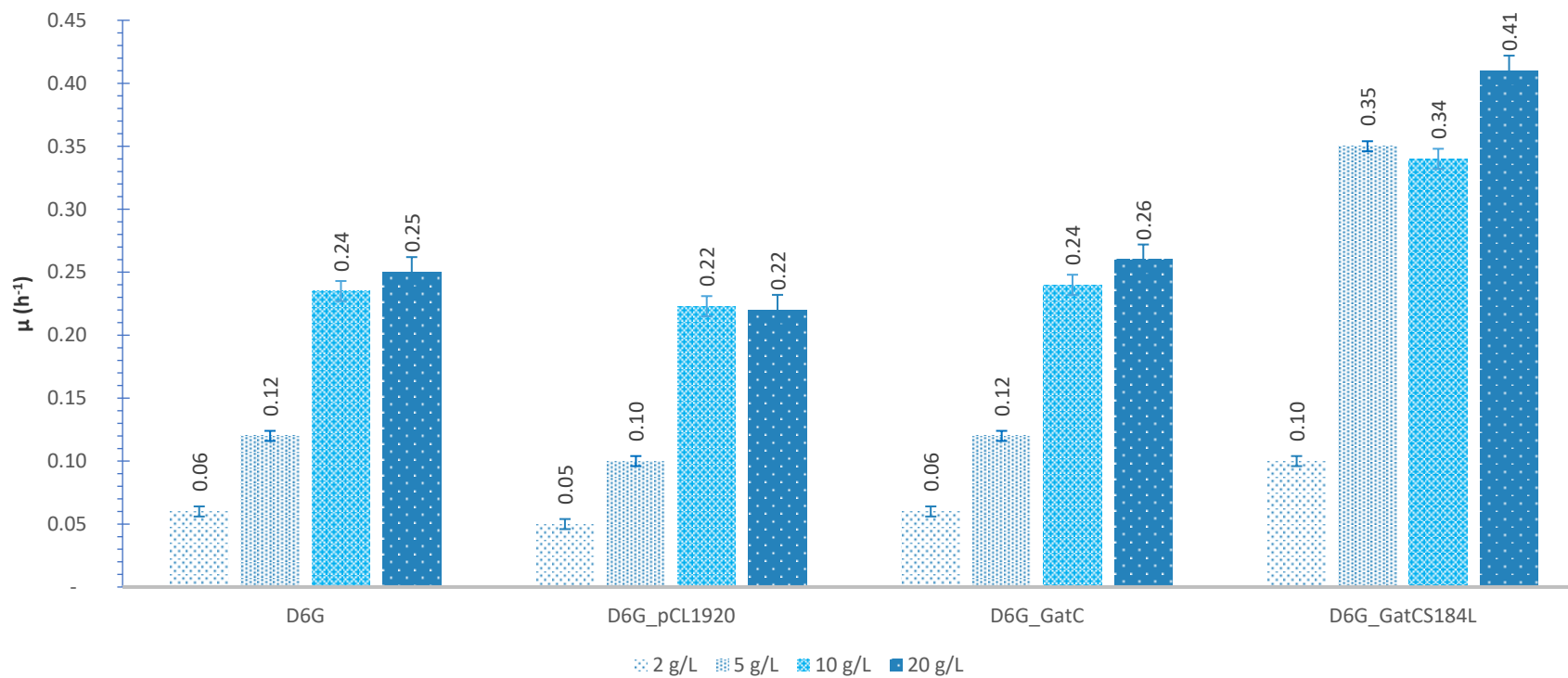


Figura 32. Efecto de la concentración de D-xilosa en la velocidad de crecimiento de la cepa Δ^6G y cepas derivadas de la transformación con los plásmidos pCL1920, pCLGatC y pCLGatCS184L evaluadas en microplacas con medio AM2.

En el caso de la cepa con el plásmido $\Delta^6\text{G}/\text{pCLGatC}$; tiene una diferencia significativa $P=0.0185$ en la velocidad de crecimiento con respecto a la cepa $\Delta^6\text{G}/\text{pCL1920}$; lo que parece sugerir, que esta permeasa transporta D-xilosa a las concentraciones evaluadas en estos ensayos. En el caso de la cepa $\Delta^6\text{G}/\text{GatCS184L}$, hay diferencias significativas $p=0.00046$ en todas las concentraciones evaluadas; respecto al resto de las cepas, esta permeasa la cepa crece entre 1.5 a 3.0 veces más rápido. Estos ensayos sugieren que la mutación S184L en el transportador GatC, le da ventaja a la permeasa, para transportar la D-xilosa entre un 30% a 66%, dependiente de la concentración de D-xilosa evaluada.

Evaluación de los parámetros cinéticos de las variantes parentales $\Delta^6\text{G}/\text{pCLGatC}$ y $\Delta^6\text{G}/\text{pCLGatCS184L}$ en minifermentadores en medio mínimo mineral AM2 con D-xilosa 40 g/L.

Siguiendo la metodología reportada para minifermentadores, se realizaron cinéticas de 62 h en minifermentadores y se evaluaron los parámetros cinéticos de todas las cepas a las 48 h. Estos se calcularon mediante las fórmulas reportadas en el Apéndice G y como se muestran en la Tabla 19, las cepas con los plásmidos disminuyen a la mitad el tiempo de la fase lag con respecto a la cepa $\Delta^6\text{G}$. En la Figura 34 se comparan los parámetros cinéticos de las cepas de referencia crecidas en minifermentadores.

A las condiciones evaluadas en este experimento el plásmido pCL1920 (con un bajo número de copias; 3 – 5 copias) parece favorecer levemente el metabolismo de la D-xilosa al incrementar el crecimiento de la cepa $\Delta^6\text{G}$, como se observa en la Figura 33 el vector estabiliza a la cepa aumentando en un 43% el crecimiento comparado con la cepa $\Delta^6\text{G}$, también se puede observar que la cepa con los plásmidos con la permeasa GatC y la permeasa derivada GatCS184L tienen un crecimiento 5 veces mayor que la cepa con el vector.

La presencia del vector mejora la velocidad de crecimiento en un 18%; el peso seco de biomasa es casi un 30% más; y el consumo de D-xilosa en la fase exponencial y estacionaria, aumento a más del doble que la cepa Δ^6G (Figura 34). Sin embargo, la fuente de carbono se desvía más a la producción de biomasa que a la de ácido láctico ya que el rendimiento de todas las cepas con plásmidos disminuyó un 14% con respecto a la cepa Δ^6G .

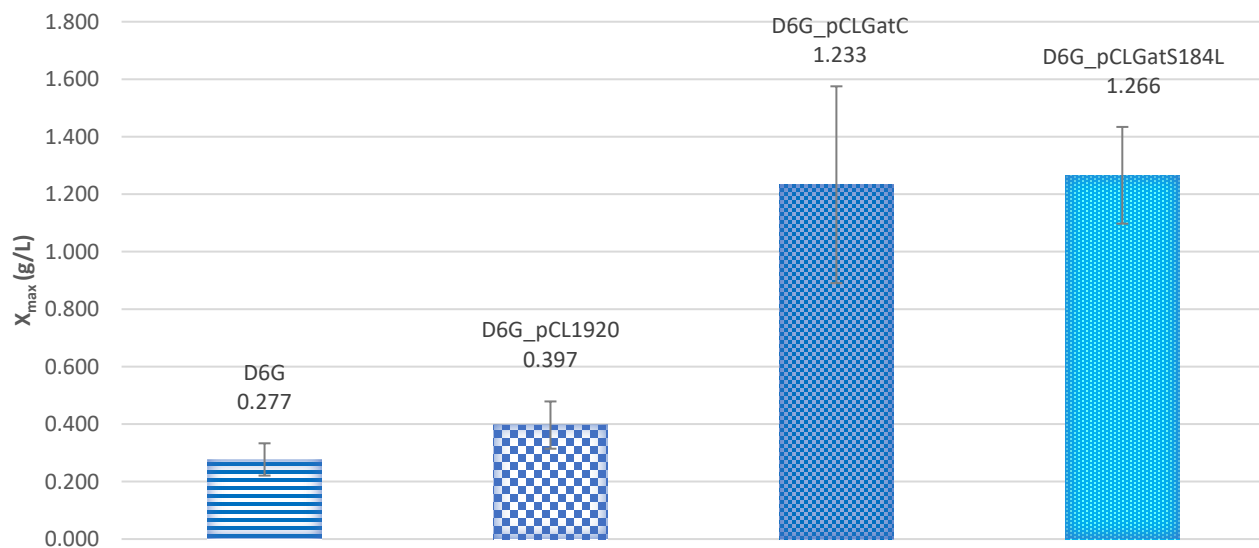


Figura 33 Comparación de crecimiento máximo de las cepas Δ^6G y los plásmidos pCL1920, pCLGatC y pCLGatS184L en minifermentadores en medio AM2 suplementado con 40 g/L de D-xilosa a pH controlado.

También se observa que la expresión de la permeasa GatC mejora la velocidad de crecimiento de la cepa en un 55%, la biomasa máxima en un 68%, la velocidad de consumo de D-xilosa en fase exponencial y estacionaria respectivamente 40% y 32%; y la productividad volumétrica en un 58%. Estos resultados sugieren que GatC transporta D-xilosa (Khankal et al., 2008). La mejora general de los parámetros cinéticos de crecimiento en la cepa $\Delta^6G/pCLGatC$ ratifica la importancia de esta permeasa en el transporte de D-xilosa a una alta concentración de D-xilosa en *E. coli* y el efecto observado en la cepa knockout de este gen (Khankal et al., 2008).

En el caso de la cepa $\Delta^6G/pCLGatCS184L$ comparada con la cepa $\Delta^6G/pCL1920$, se observó que casi todos los parámetros fueron mejores, manteniendo la misma biomasa máxima que la

cepa con la permeasa GatC (ver Figura 33). La expresión de la permeasa GatCS184L mejoró en un 64% el crecimiento máximo, la velocidad de consumo de D-xilosa, en fase exponencial y estacionaria, fue respectivamente 59% y 13% mayor; y por lo tanto la productividad de esta cepa fue la más alta entre todas las cepas presentadas en la Figura 34. Estos resultados sugieren que la permeasa GatCS184L transporta más eficientemente la D-xilosa que la permeasa silvestre GatC.

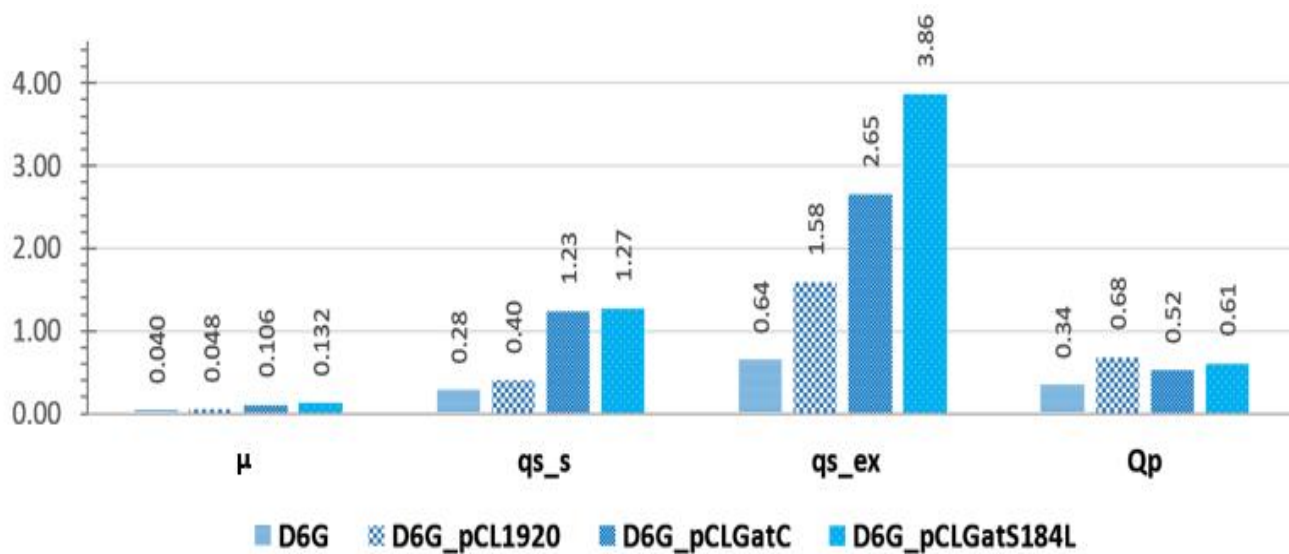


Figura 34 Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas Δ^6G y los plásmidos pCL1920, pCLGatC y pCLGatS184L. ex: fase exponencial; s: fase estacionaria.

Al evaluar los resultados del fondo genético Δ^6G con el vector y los plásmidos, se observó que el comportamiento de las tres cepas sin y con las permeasas es dependiente de las condiciones de crecimiento de las cepas. En minifermentadores las cepas presentan una tendencia clara mientras en microplacas los resultados son en cierta manera contradictorios; sugiriendo que el tamizaje en microplacas no garantiza una correlación de la velocidad de crecimiento de las permeasas o con la velocidad de consumo de D-xilosa. Este comportamiento se puede deber a que en los cultivos en microplacas no tienen un control estricto del pH y por lo tanto la producción de ácido láctico afecta la velocidad de crecimiento.

Construcción de la Librería de variantes epPCR de los genes parentales *gatC* y *gatCS184L*.

El éxito de un experimento de evolución dirigida requiere del desarrollo de metodologías que permitan generar la mayor diversidad posible; y de un método de tamizaje o selección que permita aislar las variantes que posean las características buscadas de aquellas que no la presentan. En este trabajo, el fin del experimento no solo era generar variantes mejoradas de la permeasa GatC; sino también, valorar los efectos de diferentes cambios en la relación estructura/función de la permeasa GatC; y obtener poblaciones de variantes con una mejor actividad que permita correlacionar que zonas de la estructura de la proteína son importantes para el transporte de D-xilosa.

epPCR de los genes *gatC* y *gatCS184L*

Para generar la mayor diversidad posible en esta librería se realizó una PCR mutagénica utilizando las condiciones previamente reportadas (Leung et al., 1989) en la Tabla 7 y Tabla 8 como templado al gen *gatC* y el gen *gatCS184L*. Ambas permeasas, como se comprobó en los experimentos en los minifermentadores, le permiten a *E. coli* mejorar su velocidad de consumo de D-xilosa. El método para generar las variantes se utilizó con el fin de mejorar la actividad de las permeasas, y también para generar un banco de variantes que ayudara, en forma parcial, a entender como las nuevas mutaciones afectan estructuralmente la velocidad de consumo de D-xilosa de esta permeasa.

Antes de realizar la librería, se evaluó la tasa de mutagénesis de la epPCR, para esto se transformó, digirió y clonó en el vector pCL una reacción de epPCR de cada gene en cada condición. Después de transformar y recuperar células en medio SOC, se sembraron 50 µL de la transformación y se seleccionaron 3 variantes al azar de cada condición y cada gene (12 variantes en total) para secuenciar.

En las Tablas 14 y 15 se observa el análisis de las secuencias, que se aislaron en una tasa de mutagénesis baja 0.41% y 0.52%, para el gen *gatC* y *gatCS184L* respectivamente; muy

semejante al 0.4% reportado en el artículo original (Leung et al., 1989) en el cual se basaron nuestras condiciones experimentales.

Tabla 14. Mutaciones presentes en la librería del gen *gatC*.

Tipo de mutación	Tasa baja		Tasa alta	
	Frecuencia	% Total	Frecuencia	% Total
TRANSICIONES				
A→G, T→C	1	18.2	3	27.3
G→A, C→T	4	72.7	7	63.6
TRANSVERSIONES				
A→T, T→A	3	54.5	2	18.2
A→C, T→G	2	36.4	1	9.1
G→C, C→G	1	18.2	1	9.1
G→T, C→A	0	0	3	27.3
INSERCCIONES Y DELECCIONES				
Inserciones	0	0.0	8	32.0
Delecciones	0	0.0	0	0.0
RESUMEN DE TENDENCIA				
Transiciones/Transversiones	0.83	NA	1.43	NA
AT→GC/GC→AT	0	NA	0	NA
A→N, T→N	0	0.0	2	18.2
G→N, C→N	0	0.0	2	18.2
TASA DE MUTACIONES				
Mutaciones por Kb	4.1	NA	9.2	NA
Mutaciones por el gen <i>gatC</i>	11.0	NA	25.0	NA

Tabla 15. Mutaciones presentes en la librería del gen *gatCS184L*.

Tipo de mutación	Tasa baja		Tasa Alta	
	Frecuencia	% Total	Frecuencia	% Total
TRANSICIONES				
A→G, T→C	3	27.3	8	72.7
G→A, C→T	3	27.3	9	81.8
TRANSVERSIONES				
A→T, T→A	2	18.2	5	45.5
A→C, T→G	2	18.2	3	27.3
G→C, C→G	2	18.2	0	0.0
G→T, C→A	1	9.1	4	36.4
INSERCCIONES Y DELECCIONES				
Inserciones	1	7.1	0	0.0
Delecciones	0	0.0	0	0.0
RESUMEN DE TENDENCIA				
Transiciones/Transversiones	0.86	NA	1.42	NA
AT→GC/GC→AT	0	NA	0	NA
A→N, T→N	5	45.5	0	0.0
G→N, C→N	0	0.0	0	0.0
TASA DE MUTACIONES				
Mutaciones por Kb	5.2	NA	10.7	NA
Mutaciones por el gen <i>gatC</i>	14.0	NA	29.0	NA

En el caso de la tasa alta de mutación como se observa en la Tabla 14, se obtuvieron valores de 0.92% y 1.02%, para el gen *gatC* y *gatCS184L* respectivamente; en ambos casos se obtuvieron frecuencias por debajo del valor reportado de 1.4% para la epPCR de alta tasa de mutación. Analizando la relación de transiciones/transversiones de la tasa baja, no se observa el sesgo introducido en la tasa alta, esto es deseable porque es una de las principales críticas que se le hace a este método de construcción de librerías (Kuchner & Arnold, 1997).

Diversidad de la librería de los genes *gatC* y *gatCS184L*

Después de evaluar la tasa de mutación y de realizar varias pruebas (datos no reportados) y encontrar la condición donde el número de variantes en la biblioteca fuera mayor y el porcentaje de plásmido religado fuera <1%; se realizaron los bancos. Para calcular el tamaño de los bancos de variantes una muestra de 2 µL de ligación se purificó y se transformó en células competentes de Δ⁶G, las cuales se recuperaron en medio SOC. El número de variantes recuperadas en esta muestra del medio LB se reporta en la Tabla 16.

Tabla 16. Tamaño de la librería

Gen templado	Condición epPCR	# de las variantes	% Plásmido religado
gatC	Tasa baja	143,600	0.1
	Tasa alta	132,000	0.1
gatCS184L	Tasa baja	90,000	0.8
	Tasa alta	54,000	1.3

Como se observa en la Tabla 16 la cantidad de variantes obtenidas por µg de ADN de epPCR recombinado con el vector pCL recuperadas en medio SOC y sembradas en LB-Spe⁵⁰, se redujo en este orden *gatCS184L* < *gatC* < pCL1920 (Figura 35): se sabe por las cinéticas de crecimiento (sección anterior) que la permeasa GatCS184L transporta mejor que la permeasa GatC, y es notorio que el vector en el fondo genético tiene menor transporte.

Estos resultados sugieren que, a mayor actividad de la permeasa, menor es el porcentaje de recuperación en medio sólido Figura 35. Se comparo la viabilidad de las células competentes;

utilizando otro fondo genético *E. coli* MC1061 $\Delta trp f$ tetraciclina resistente; pero se observó (datos no mostrados) que el porcentaje de recuperación fue aún menor. Por tal razón, se descartó aislar variantes de la biblioteca en medio solido LB-Spe⁵⁰ directamente; pues de esta forma, se introduce un sesgo al disminuir la probabilidad de recuperación de las variantes quizás con mejor actividad.

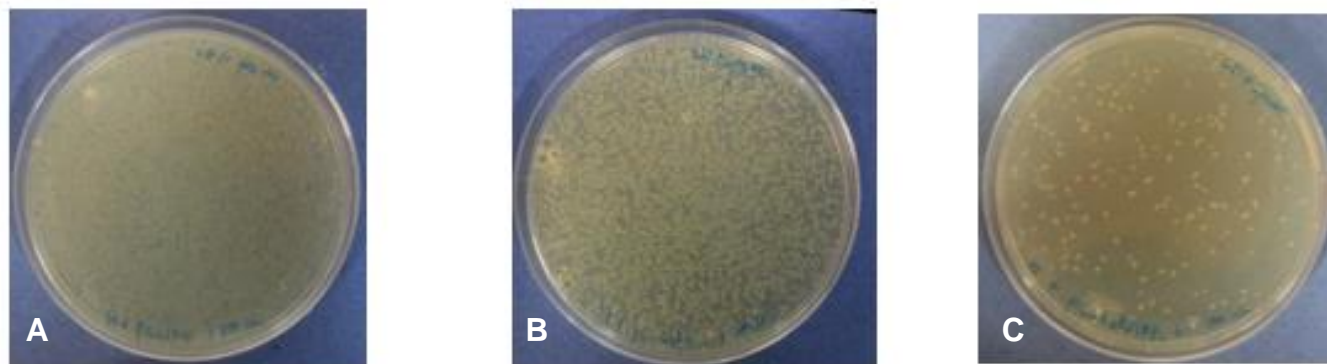


Figura 35 colonias recuperadas de 200 μ L de medio de recuperación SOC con células electrocompetentes Δ^6G transformadas con A) plásmido pCL1920, B) plásmido pCLGatC y C) plásmido pCLGatCS184L.

A partir de la secuencia de nucleótidos del gen *gatC* o *gatCS184L*, la tasa de mutación, el porcentaje de intercambio de nucleótidos experimental, el tamaño mínimo de la librería (Tabla 14 y 15) y la eficiencia de amplificación (Tabla 10) se estimó la composición de la librería de variantes con el programa PEDEL-AA (Firth & Patrick, 2008). En el apéndice K se encuentra el “output” del programa para cada condición.

Tabla 17. Composición de librería de mutantes estimada con PEDEL-AA usando los parámetros estimados en la secuenciación de epPCR

Propiedad	Estimación			
	<i>gatC</i>		<i>gatCS184L</i>	
	Baja	Alta	Baja	Alta
Tamaño de la librería	143,600	132,000	90,000	54,000
Número de variantes sin inserciones, codones de paro o eliminaciones	109,000	88,790	74,170	34,470
Número promedio de aminoácidos sustituidos por variante	3	6	4	7
Secuencias no mutadas (%total de la librería)	3.7	0.2	2.0	0.05
Número de proteínas distintas completas en la librería	89,350	88,280	67,480	34,470

La Tabla 17 se observa las dimensiones finales de la librería generada la cual es la suma de todas las variantes obtenidas en las diferentes condiciones de epPCR, con un total 419,600 variantes. De estas, 306,430 variantes (73%) se espera no presenten eliminaciones, codones de paro o inserciones. El promedio de mutaciones por variante está entre 3-7 mutaciones, 7,404.0 de las variantes de la biblioteca (1.8%) no tendrán mutaciones y se estima que el número de proteínas distintas completas generadas será de 279,580

Tamizado de la librería de variantes de la permeasa GatC y GatCS184L.

El otro paso importante para tener éxito en un experimento de evolución dirigida es tener las condiciones para que la característica deseada sea seleccionable; gran parte de los procesos de selección se realizan mediante ensayos de complementación de la actividad deseada o de resistencia a una condición de estrés determinado.

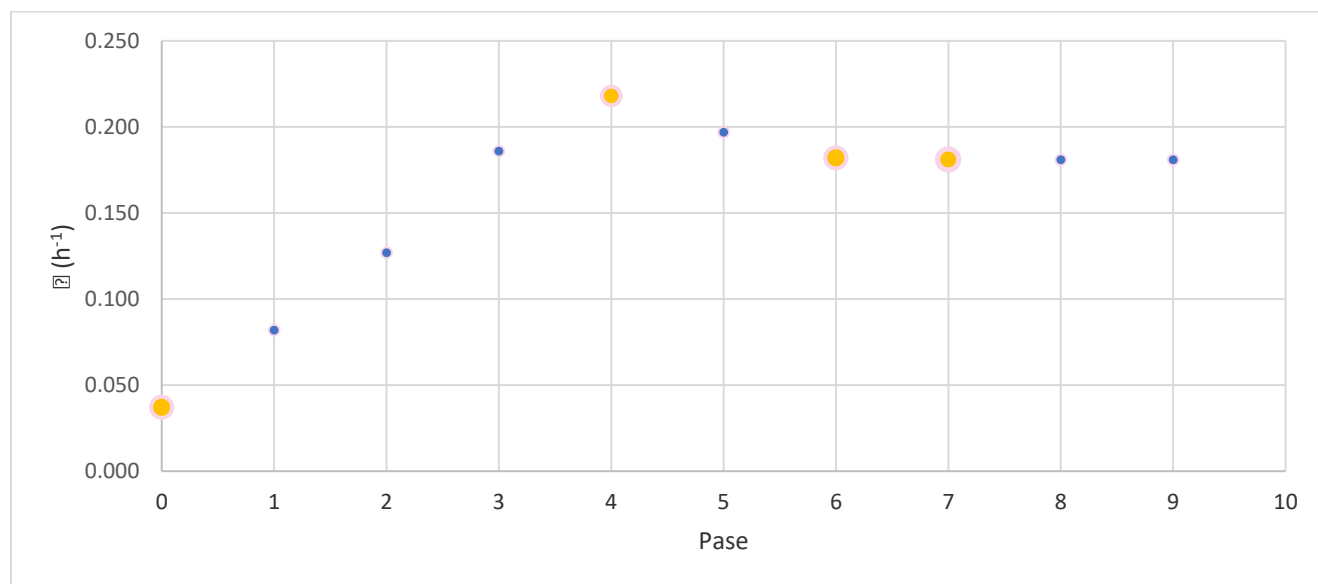


Figura 36. Gráfica de velocidad de crecimiento promedio durante el proceso de tamizaje de la librería mediante pases seriales en minifermentadores a pH controlado con el medio de selección. Los puntos en color (amarillo) son los pases que se eligieron para enviar a secuenciar variantes.

En nuestro caso el tamizaje de las variantes de la librería se realizó usando la μ como la variable de selección; teniendo en cuenta, que esta es directamente proporcional a la q_s en fase exponencial, es decir a la velocidad global de consumo de D-xilosa por gramo de célula. Esta

relación se fundamenta en la evaluación de los parámetros cinéticos de las mutantes del fondo genético, y en las cepas de Δ^6G con los plásmidos pCLgatC y pCLgatCS184L.

El tamizaje de la librería se realizó, por transferencia serial, de las variantes de la librería en la fase media exponencial ($O.D_{600} \approx 1$; serialmente, fueron diluidas a $O.D_{600} \approx 0.01$ en los minifermentadores con el medio de selección; medio mineral AM2 suplementado D-xilosa 40g/L y Spe⁵⁰. En cada pase 1 mL del cultivo a transferir se conservó en crioviales a $-70\text{ }^\circ\text{C}$; los pases seriales fueron realizados hasta que se observó que la μ del cultivo se mantuvo constante entre pases. En nuestro caso se realizaron 9 pases seriales; el cultivo inició con una $\mu=0.037\text{ h}^{-1}$; que mejoró ostensiblemente en el segundo pase a 0.12 h^{-1} ; en el cuarto pase presentó la mejor $\mu=0.22\text{ h}^{-1}$; después, en los pases sucesivos la μ fue descendiendo hasta que se mantuvo en los últimos pases en 0.18 h^{-1} .

Selección y caracterización estructural de las variantes de la librería GatC y GatCS184L

Para aislar las variantes reportadas en este estudio se sembraron en cajas de LB-Spe⁵⁰; a partir de 200 μL de una dilución 1×10^{-7} de 100 μL de cultivos en medio de selección, de los pases 1, 4, 6 y 7. Se obtuvieron 51 variantes en total. Con las colonias aisladas se hicieron cultivos en medio LB-spe⁵⁰; que se usaron para crioconservar las cepas y aislar los plásmidos.

Doce variantes se enviaron a secuenciar seleccionadas así: 5 variantes al azar del pase 1 (IR12, IR13, IR16, IR18, IR19); 5 variantes del pase 4 todas derivadas de la clona GatCS184L (IR41, IR44, IR46, IR47, IR48); una variante del pase 6 derivada de la clona GatCS184L (IR61); y una variante del pase 7 derivada de la clona GatC (IR71). En la Tabla 18 se reportan las mutaciones encontradas en las variantes seleccionadas.

En la Tabla 18, se observa que al inicio de la librería el 60% de las variantes secuenciadas, presentan mutaciones sin sentido; que codifican para una proteína más pequeña (IR12, IR13,

IR16), al parecer no funcional; en los pases superiores las variantes secuenciadas conservan el tamaño original del ORF funcional de la permeasa GatC.

Tabla 18. Mutaciones en las variantes Seleccionadas y Secuenciadas de la librería.

Variante	gen Templado	Aminoácido Mutado	Tipo de mutación	Tamaño ORF
IR12	<i>gatCS184L</i>	I116S I177A R206	Sustitución Sustitución Sin sentido	205
IR13	<i>gatCS184L</i>	T158I G232	Eliminación Sin sentido	231
IR16	<i>gatCS184L</i>	I198V Q277	Sustitución Sin sentido	276
IR18	<i>gatC</i>	F156F E173V	Silenciosa Sustitución	451
IR19	<i>gatC</i>	I207V H303L	Sustitución Sustitución	451
IR41	<i>gatCS184L</i>	R216C	Sustitución	451
IR44	<i>gatCS184L</i>	K276E	Sustitución	451
IR46	<i>gatCS184L</i>	V307A	Sustitución	451
IR47	<i>gatCS184L</i>	I124I	silenciosa	451
IR48	<i>gatCS184L</i>	N416D	Sustitución	451
IR61	<i>gatCS184L</i>	F340L	Sustitución	451
IR71	<i>gatC</i>	I358V	Sustitución	451

En los últimos pases no se encontró un único tipo de variante o plásmido vacío; lo cual sugiere, que el método de selección pudo discernir entre cepas con mutaciones que favorecen el crecimiento de las que no. También se observa que al inicio de la librería había relativamente más variantes con múltiples aminoácidos mutados como se predijo estadísticamente con PEDEL-AA en la Tabla 17. Sin embargo, en los últimos pases; solo se aislaron variantes con un aminoácido mutado por gen lo que sugiere que las variantes generadas en esta librería con múltiples mutaciones no son funcionalmente viables y la actividad de esta permeasa es relativamente sensible a cambios múltiples.

Es importante notar que el 86% de las variantes mejoradas derivan del gen de la permeasa GatCS184L, mutante con una actividad mejorada, ya comprobada de la permeasa silvestre

GatC. Por tanto, sí puede existir una variante de GatC con múltiples mutaciones positivas; pero, la probabilidad que se genere en un único paso al azar es muy bajo y para lograrlo se necesita una librería con una población de variantes exorbitante 1×10^{23} . Con las condiciones técnicas actuales, el límite de tamaño a nivel de laboratorio para generación de librerías es de 1×10^8 ; por lo tanto, solo ciclos sucesivos de mutaciones positivas dan mejores resultados, pero técnicamente es muy laborioso. Estos hechos implican que después de generar un conjunto de variantes positivas es mejor utilizar otras técnicas de evolución dirigida, p.ej. como “DNA shuffling”; que aumenta la tasa de mutaciones positivas mezclando la epPCR.

La variante IR47, contiene una mutación silenciosa por lo que está sigue codificando para la permeasa original GatCS184L; sin embargo, como se midió su μ (0.13 h^{-1}) es muy inferior al rango de μ del pase en que se encontró (0.22 h^{-1}). Se pensó que las frecuencias de preferencia del uso del codón generado en la mutación, mejoraba la expresión de la variante; sin embargo, en *E. coli* ésta es relativamente igual, el codón original (3.05) y el nuevo (2.52), por lo que técnicamente la actividad de esta mutante es indistinguible de la parental y al caracterizarla se confirmó este resultado. Dicha mutante tiene la misma actividad que la GatCS184L (Apéndice F). Por lo tanto, la presencia de esta mutante muestra que el tamizado no fue tan fino para poder eliminar cepas con actividad “basal”. Es importante que para futuros ciclos de mutación se debe considerar aumentar la presión de selección a nivel de la concentración de sustrato o bien utilizar otro modo de selección, con un principio semejante pero más controlable y sensible a los cambios en la μ ; p. ej. Como el cultivo alimentado a diferentes tasas de dilución.

Caracterización de los parámetros cinéticos de las variantes seleccionadas de la librería.

Se realizaron cinéticas en minifermentadores a pH controlado en medio AM2 suplementado con D-xilosa 40 g/L como única fuente de carbono y se cuantificó la biomasa, la concentración de lactato, piruvato y acetato producido y de D-xilosa consumida; estos datos se usaron para caracterizar los parámetros cinéticos, de las variantes secuenciados de los pases 4, 6 y 7.

Como se observa en la Tabla 19, el 86% de las variantes aisladas tienen mejores q_s que las cepas parentales; las mejores variantes positivas (mejor μ) se obtuvieron del pase 4 (IR41, IR44 y IR46); y confirma que la velocidad global de crecimiento fue correctamente seleccionada como base del proceso de tamizaje en minifermentadores. También, es importante recalcar que, en este tipo de tamizado, el aislamiento no es limitado a la búsqueda de un tipo único de cepa “ganadora”; si no, que permite aislar un grupo de variantes con un rango de actividad semejante.

Tabla 19 Comparación de los parámetros cinéticos entre las permeasas GatC y GatCS184L y las variantes seleccionadas de los últimos pases.

Cepa	t (h)	Fase Lag (h)	μ (h^{-1})	Xmáx g/L	$Y_{p/s}$	Fase exponencial		Fase estacionaria		Q_s (g/L xilosa/h)	Q_p (g/L lac/h)
						q_s g/Lxilosa*gWDC	q_p	q_s	q_p		
$\Delta 6G$	48	4	0.046 \pm 0.017	0.277 \pm 0.056	0.85 \pm 0.30	0.746 \pm 0.386	0.039 \pm 0.020	0.338 \pm 0.069	0.286 \pm 0.116	0.094 \pm 0.039	0.079 \pm 0.064
$\Delta 6G_pCLGatC$	48	4	0.106 \pm 0.009	1.233 \pm 0.342	0.74 \pm 0.06	2.654 \pm 0.318	0.079 \pm 0.009	0.520 \pm 0.144	0.386 \pm 0.112	0.642 \pm 0.287	0.475 \pm 0.265
$\Delta 6G_pCLGatCS184L$	50	4	0.121 \pm 0.010	0.869 \pm 0.092	4.10 \pm 7.10	0.798 \pm 1.383	0.497 \pm 0.862	0.131 \pm 0.228	0.538 \pm 0.057	0.114 \pm 0.198	0.468 \pm 0.038
$\Delta 6G_IR41$	36	0	0.214 \pm 0.008	0.908 \pm 0.018	0.83 \pm 0.02	9.673 \pm 0.405	0.177 \pm 0.007	1.256 \pm 0.034	1.039 \pm 0.021	1.140 \pm 0.047	0.943 \pm 0.035
$\Delta 6G_IR44$	36	0	0.198 \pm 0.010	1.004 \pm 0.044	0.78 \pm 0.11	7.610 \pm 1.157	0.155 \pm 0.024	1.066 \pm 0.137	0.835 \pm 0.074	1.071 \pm 0.141	0.838 \pm 0.077
$\Delta 6G_IR46$	36	0	0.182 \pm 0.002	1.184 \pm 0.083	0.85 \pm 0.06	5.532 \pm 0.394	0.155 \pm 0.011	0.843 \pm 0.071	0.716 \pm 0.062	0.997 \pm 0.049	0.847 \pm 0.045
$\Delta 6G_IR47$	48	4	0.131 \pm 0.024	1.193 \pm 0.057	0.78 \pm 0.07	3.900 \pm 0.785	0.102 \pm 0.021	0.618 \pm 0.059	0.482 \pm 0.024	0.737 \pm 0.148	0.574 \pm 0.105
$\Delta 6G_IR48$	48	0	0.150 \pm 0.014	0.958 \pm 0.014	0.83 \pm 0.04	5.564 \pm 0.593	0.125 \pm 0.013	0.771 \pm 0.041	0.639 \pm 0.015	0.739 \pm 0.078	0.612 \pm 0.057
$\Delta 6G_IR61$	36	0	0.175 \pm 0.004	1.072 \pm 0.028	0.87 \pm 0.05	5.484 \pm 0.327	0.151 \pm 0.009	0.873 \pm 0.027	0.757 \pm 0.045	0.935 \pm 0.026	0.811 \pm 0.047
$\Delta 6G_IR71$	36	0	0.166 \pm 0.002	1.060 \pm 0.070	0.81 \pm 0.01	6.134 \pm 0.101	0.135 \pm 0.002	1.027 \pm 0.069	0.833 \pm 0.055	1.089 \pm 0.017	0.884 \pm 0.009

Velocidad de Crecimiento μ (h^{-1}), Rendimiento ($Y_{p/s}$), Velocidad específica de producción de lactato en fase estacionaria y fase exponencial (q_p), Velocidad específica de consumo de D-xilosa en fase estacionaria y fase exponencial (q_s), Productividad volumétrica de lactato (Q_p) Productividad volumétrica de consumo de D-xilosa (Q_s)

Los resultados los dividimos en función de la mejora de las propiedades cinéticas de las variantes con respecto a su gen parental. En el caso de las derivadas del gen *gatCS184L* la mejor variante *IR41 (GatCS184L, R216C)*; tiene un μ 60% mejor, dos veces la q_s exponencial, y 1.7 veces la q_s estacionaria, en comparación con la parental pCLGatCS184L, esto ocasiona que la productividad de ácido láctico se duplique. La segunda mejor variante *IR44 (GatCS184L, K276C)* tiene un 48% mejor μ , 1.5 veces la q_s exponencial y 1.4 veces la q_s estacionaria que la parental pCLGatCS184L; y su productividad sea 1.8 veces mejor. La tercera mejor variante *IR46 (GatCS184L; I370A)* tiene un 36% mejor μ , 1.2 veces la q_s exponencial y 1.2 veces la q_s estacionaria que la parental pCLGatCS184L; con una productividad mejorada 1.8 veces. La cuarta mejor variante es la *IR61 (GatCS184L, F340L)*; tiene 30% mejor μ , 1.2 veces la q_s exponencial y 1.2 veces la q_s estacionaria que la mutante parental GatCS184L, y una productividad 1.7 veces mejor. La quinta mejor actividad es la variante *IR48 (GatCS184L, N416D)*; su μ es 27% mejor, tiene 1.3 veces mejor q_s exponencial y 1.1 veces mejor q_s estacionaria y 1.3 veces mejor productividad.

En el caso de la única derivada aislada del gen *gatC* la variante *IR71 (GatC1358V)*, tiene un 56% mejor μ , 2.3 veces mejor q_s exponencial, 2.0 veces mejor q_s estacionaria y su productividad 1.9 veces con respecto a la parental pCLGatC.

En general las propiedades de todas las variantes mejoraron entre 1.2 a 2.0 veces la productividad de la fermentación lo que implica una disminución de los tiempos de la fermentación entre 6.7 h a 20 h. Sin embargo, a futuro es importante evaluar el efecto de estas mutaciones a nivel de genoma, confirmar los resultados, y verificar que la actividad no es producto de la expresión por el número de copias expresadas del plásmido.

Análisis topológico de las variantes aisladas de GatC y GatCS184L

Debido a la dificultad de generar cristales de proteínas de membrana, sólo se conoce la estructura detallada de un pequeño grupo de estas moléculas. Un aspecto importante de la

estructura de las proteínas de membrana es la topología membranar, esto es, el número y la orientación de los segmentos de la proteína que atraviesan la bicapa lipídica.

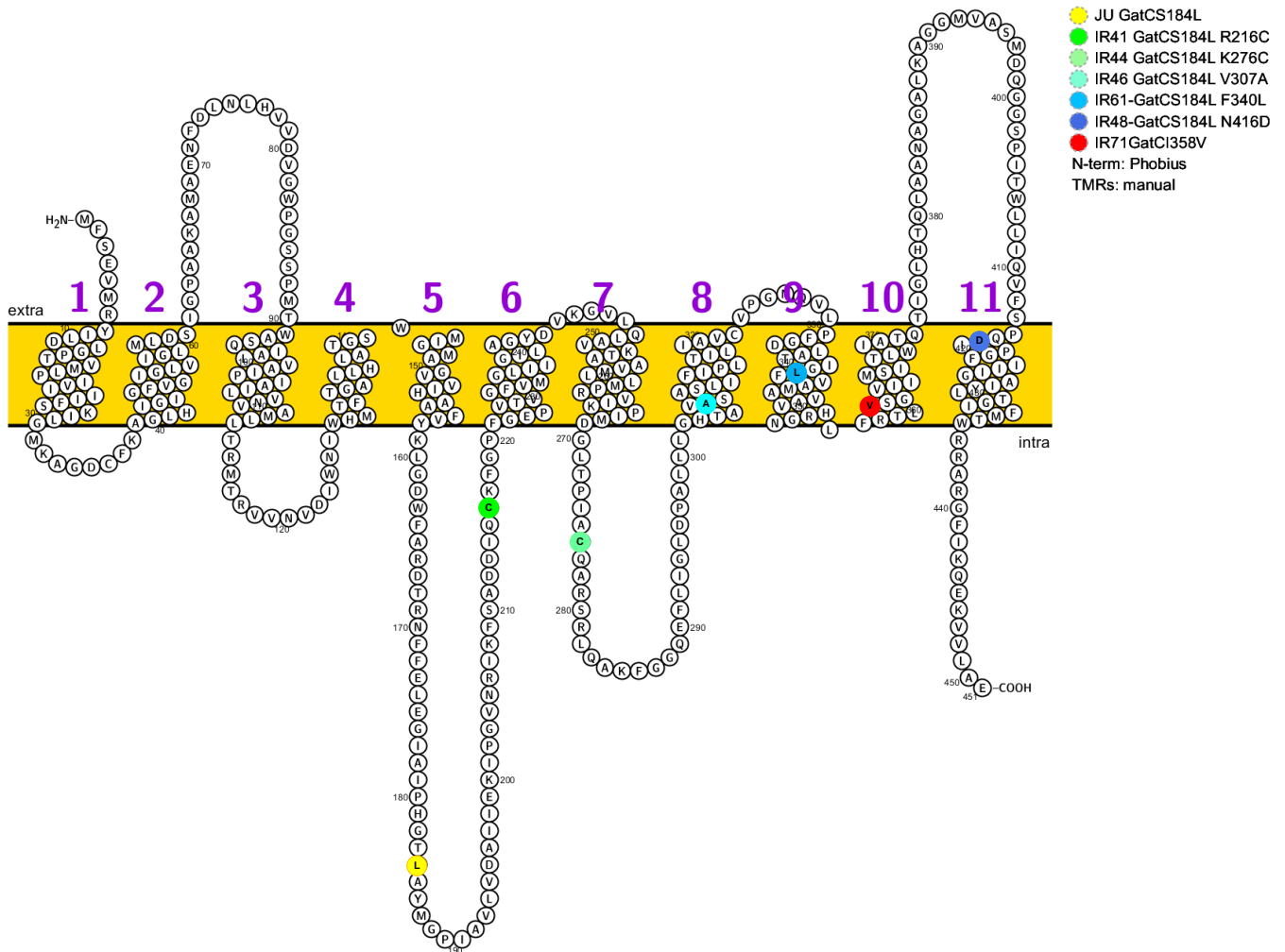


Figura 37 Topología de las variantes con mayor actividad usando OCTUPUS.

Para realizar el análisis topológico se usó el software [OCTUPUS](#) el cual realiza la predicción topológica usando modelos ocultos de MARKOV y redes neuronales para predecir la estructura de proteínas de membrana. Para esto realiza primero un BLAST para crear un perfil de secuencias homologas. Estas se utilizan como “input” de un conjunto de predictores basados en redes neuronales, los cuales calculan para cada residuo la probabilidad de encontrarlo en el interior (i) o fuera (o) o dentro de la membrana (m). En el tercer paso, estas predicciones se

utilizan como input a un modelo oculto de Markov, que los utiliza para calcular la topología más probable “output”

Como se observa en Figura 37, la variante IR41 con mayor actividad presenta una mutación en el tercer dominio interno de la permeasa GatC; esta mutación, coincide con la mutación de la permeasa de la cepa parental GatCS184L generada en la evolución adaptativa de la cepa JU01, la cual también cae en el tercer dominio interno. En ambos casos la actividad parece estar favorecidas al disminuir la polaridad del aminoácido. En el caso de la variante IR44 también la mutación recae en un dominio interno, sin embargo, en este caso es el aumento de la polaridad del aminoácido la que favorece la actividad de esta mutante.

En el resto de las variantes positivas (IR46, IR61 y IR71) las mutaciones recaen a nivel de las hélices de transmembrana; sin embargo, en sitios diferentes, al comienzo, medio y al final de la hélice. La mayoría de estas variantes tienden al intercambio de aminoácidos no polares ramificados por no polares menos ramificados. Solo la variante con menor actividad IR48, varia de un aminoácido polar, cargado positivamente) a un aminoácido cargado negativamente. No obstante, es importante entender que a nivel tridimensional estos pueden estar interaccionando, pero debido a que no hay estructuras cristalizadas de esta proteína, no se puede demostrar esta aseveración.

Estos resultados sugieren que el tercer dominio interno es importante para el transporte. Sin embargo, se recomienda que en trabajos futuros se aíslen más variantes y se analicen sus mutaciones para llegar a una conclusión concreta del efecto de esta región en el transporte de D-xilosa. Se sugiere evaluar estas mutaciones, usando un modelo tridimensional construido por homología con otras proteínas de membrana similares que permita determinar cómo estas mutaciones mejoran la velocidad de transporte de D-xilosa.

RESUMEN DE RESULTADOS

- Se lograron aislar cepas con un transporte mejorado de D-xilosa derivadas de las permeasas GatC y GatCS184L.
- La eliminación de los genes de los transportadores conocidos de D-xilosa (*xyIFH*, *xyIE*, *araH*, *araE*, *galP* y *gatC*) no suprime totalmente la capacidad de transporte de D-xilosa, y mantiene un 16.3% de la velocidad de consumo de D-xilosa con respecto a la cepa parental *CL3*.
- El efecto de la eliminación de las permeasas XylFH, AraE y GatC disminuye la q_s ; mientras que la eliminación de las permeasas AraH y GalP la aumentan. Estos resultados indican, que los efectos de la inactivación de genes asociados al transporte no siempre resultan en la pérdida de transporte y refleja que el sistema de transporte de D-xilosa en *E. coli* está altamente regulado.
- Se verificó que la velocidad de crecimiento está directamente relacionada con una velocidad de consumo mayor de D-xilosa, por lo cual es un buen parámetro para evaluar cepas capaces de transportar eficientemente D-xilosa.
- La variación significativa del rendimiento biomasa/xilosa conforme varía la μ muestra que las cepas con menores velocidades de crecimiento priorizaron la formación de biomasa.
- Bajo las condiciones de trabajo estudiadas, la evaluación de la velocidad específica de consumo de D-xilosa (q_s) en fase exponencial y en estacionaria permite inferir que:
 - La supresión de la permeasa XylH es responsable de la pérdida del 80% del transporte de D-xilosa.

- La eliminación de la permeasa AraH restituye el 73% del transporte, lo que parece sugerir que este transportador está regulando a XylFGH, o hay un efecto compensatorio debido al ATP en el metabolismo de la bacteria.
 - La eliminación del simporte AraE muestra una pérdida del 53% del transporte de D-xilosa.
 - La supresión del transportador GalP, sugiere un efecto regulatorio, porque su eliminación restituyó en un 30% el transporte de la D-xilosa.
 - La supresión del gen *gatC* lleva a la disminución de 84% de la capacidad de transporte de D-xilosa con respecto a la cepa Δ^5P .
- Los resultados sugieren que hay otros mecanismos (pasivos o activos) involucrado(s) en el transporte de D-xilosa diferentes a los reportados hasta el momento en *E. coli* MG1655.
 - Las permeasas GatC y GatCS184L expresadas en plásmido transportan eficientemente la D-xilosa y mejoran el transporte de este azúcar en la cepa Δ^6G en un 55% y 64%, con respecto a la cepa con el plásmido control (pCL1920).
 - Las permeasas GatC y GatCS184L expresadas en plásmido mejoran el crecimiento de la cepa Δ^6G producto de la mejora de la velocidad de consumo de D-xilosa.
 - La estrategia de construir librerías mediante evolución dirigida de los genes de las permeasas GatC y GatCS184L permitió obtener 6 variantes al azar con una velocidad de consumo de D-xilosa mejorada. Sin embargo, si se realiza un tamizado exhaustivo quizás se podrían obtener más y mejores variantes o más información para construir un modelo estructural completo de esta permeasa.

- El método de tamizaje usado mediante pases y diluciones seriadas de las variantes de la librería en el medio de selección fue efectivo: el 86% de las variantes seleccionadas al azar resultaron con mejores características que la cepa parental con el gen sin evolucionar.
- La mayoría de las variantes seleccionadas (6) son derivadas del gen *gatCS184L* y solo una variante es derivada de gen *gatC*. Sin embargo, esta variante tiene más velocidad de crecimiento en un 43% que la generada por *gatCS184L* expresado en plásmido.
- La evolución dirigida usando epPCR permitió aislar variantes entre un 24% a 63% mejores μ ; entre 1.3 veces - 2 veces mejores q_s y Q_p mayores que permiten disminuir el tiempo de la fermentación entre 8 a 18 h.
- Las variantes con mejor actividad presentan mutaciones en el tercer dominio interno de la permeasa GatC analizadas con el software OCTOPUS (Prediction of membrane protein topology).

CONCLUSIÓN

Se aislaron variantes de la proteína transportadora GatC, obtenidas por mutaciones al azar, que permitieron mejorar la velocidad de consumo de D-xilosa y la velocidad de producción de D-lactato por fermentación de cepas derivadas de *E. coli* *CL3*.

PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de otras permeasas no específicas como ManX, RbsK y su aporte en el transporte de D-xilosa.
- Evaluar directamente el efecto de solo eliminar las permeasas responsables del >80% del transporte XylH y GatC en las cepas *CL3* y/o *JU15*; y confirmar este comportamiento al eliminarlas individualmente.
- Evaluar el efecto de eliminar las permeasas AraH y GalP para mejorar la velocidad de crecimiento de las cepas y su efecto individual como una posible estrategia de ingeniería de vías metabólicas.
- Realizar un análisis de transcriptómica y proteómica de la cepa sin las permeasas Δ^6G y de la cepa parental *CL3*, con el fin de identificar los genes involucrados en el transporte que se expresan, su nivel de expresión, e identificar si hay o no otras posibles permeasas involucradas en el transporte de D-xilosa.
- Evaluar la capacidad de transporte de estas variantes realizando mutaciones sitio dirigida (CRISPR/Cas9) sobre el gen *gatCS184L* en el genoma de *E. coli* *JU15*; verificar el efecto de las mutaciones encontradas y evaluar su efecto en el transporte de D-xilosa y en la productividad de ácido láctico.
- Realizar otros ciclos de mutagénesis usando DNA shuffling con las variantes obtenidas en esta librería, para lograr mejores variantes con una mejor capacidad de transporte de D-xilosa.
- Realizar un estudio de “docking” con la permeasa GatC, que permita con los datos experimentales encontrados correlacionar cuales zonas de la proteína son indispensables para el transporte de D-xilosa y ahondar en la relación estructura función de esta permeasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramson, M., Shoseyov, O., & Shani, Z. (2010).** Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production and processability. *Plant Science*, 178(2), 61–72. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.11.003>
- Aldea, M., Garrido, T., Hernández-Chico, C., Vicente, M., & Kushner, S. R. (1989).** Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *The EMBO journal*, 8(12), 3923–31.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... Mori, H. (2006).** Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2(1), 2006.0008. <http://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Baldwin, S. A., & Henderson, P. J. F. (1989).** HOMOLOGIES BETWEEN SUGAR. *annual review of physiology*, 51, 459–471.
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., & Kompala, D. S. (1990).** Plasmid encoded protein: The principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), 668–681. <http://doi.org/10.1002/bit.260350704>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... Shao, Y. (1997).** The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12, 277(September), 1453–1462.
- Bocola, M., Schwaneberg, U., Zhao, J., Kardashliev, T., & Joe, A. (2014).** Lessons From Diversity of Directed Evolution Experiments by an Analysis of 3 , 000 Mutations, 111(12), 2380–2389. <http://doi.org/10.1002/bit.25302>
- Cadwell, R. C., & Joyce, G. F. (1994).** Manual Supplement III1 | 11 Mutagenic PCR. *Genome Research*, 3–8. <http://doi.org/10.1101/gr.3.6.S136>
- Cherepanov, P. P., & Wackernagel, W. (1995).** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene*, 158(1), 9–14. [http://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00193-A](http://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00193-A)
- Choudhary, M. K. (2008).** Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the efficient utilization of plant sugar mixture.
- Cole, M. F., & Gaucher, E. A. (2011).** Exploiting Models of Molecular Evolution to Efficiently Direct Protein Engineering. *Journal of Molecular Evolution*, 72(2), 193–203. <http://doi.org/10.1007/s00239-010-9415-2>
- Copp, J. N., Hanson-Manful, P., Ackerley, D. F., & Patrick, W. M. (2014).** Error-prone PCR and effective generation of gene variant libraries for directed evolution. *Methods in Molecular Biology*, 1179, 3–22. http://doi.org/10.1007/978-1-4939-1053-3_1
- Daruwalla, K. R., Paxton, a T., & Henderson, P. J. (1981).** Energization of the transport systems for arabinose and comparison with galactose transport in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*, 200(3), 611–627.
- Daruwalla, R. (1980).** D-Xylose Transport, 143(1), 396–402.
- Datsenko, K. a, & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645. <http://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

- Davis, E. O., & Henderson, P. J. F. (1987).** The cloning and DNA sequence of the gene xylE for xylose-proton symport in *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry*, 262(29), 13928–13932. Recuperado a partir de <http://www.jbc.org/content/262/29/13928.short>
- Davis, E. O., Jones-Mortimer, M. C., & Henderson, P. J. F. (1984).** Location of a structural gene for xylose-H⁺ symport at 91 min on the linkage map of *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry*, 259(3), 1520–1525.
- Desai, T. A., & Rao, C. V. (2010).** Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1524–1532. <http://doi.org/10.1128/AEM.01970-09>
- Dong, T., & Schellhorn, H. E. (2009).** Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(1), 19–33. <http://doi.org/10.1007/s00438-008-0389-3>
- Firth, A. E., & Patrick, W. M. (2008).** GLUE-IT and PEDEL-AA: new programmes for analyzing protein diversity in randomized libraries. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), 281–285. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn226>
- Flores, S., De Anda-Herrera, R., Gosset, G., & Bolívar, F. G. (2004).** Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(4), 485–494. <http://doi.org/10.1002/bit.20137>
- Gonzalez, R., Tao, H., Shanmugam, K. T., York, S. W., & Ingram, L. O. (2002).** Global gene expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xylose. *Biotechnol Prog*, 18(1), 6–20. <http://doi.org/10.1021/bp010121i>
- Groff, D., Benke, P. I., Batth, T. S., Bokinsky, G., Petzold, C. J., Adams, P. D., & Keasling, J. D. (2012).** Supplementation of intracellular XylR leads to cointilization of hemicellulose sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2221–2229. <http://doi.org/10.1128/AEM.06761-11>
- Guinote, I. B., Moreira, R. N., Barahona, S., Freire, P., Vicente, M., & Arraiano, C. M. (2014).** Breaking through the stress barrier: the role of BolA in Gram-negative survival. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(10), 2559–2566. <http://doi.org/10.1007/s11274-014-1702-4>
- Hasona, A., Kim, Y., Healy, F. G., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2004).** Pyruvate Formate Lyase and Acetate Kinase Are Essential for Anaerobic Growth of *Escherichia coli* on Xylose. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7593–7600. <http://doi.org/10.1128/JB.186.22.7593>
- Henderson, P. J. F. (1990).** Proton-linked sugar transport systems in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 22(4), 525–569. <http://doi.org/10.1007/BF00762961>
- Henderson, P. J., Giddens, R. A., & Jones-Mortimer, M. C. (1977).** Transport of galactose, glucose and their molecular analogues by *Escherichia coli* K12. *The Biochemical journal*, 162(2), 309–20.
- Henderson, P. J., & Maiden, M. C. (1990).** Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 326(1236), 391–410.

<http://doi.org/10.1098/rstb.1990.0020>

- Hengge-Aronis, R. (1996).** Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 21(5), 887–893. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.511405.x>
- Hernández-Montalvo, V., Martínez, A., Hernández-Chavez, G., Bolivar, F., Valle, F., & Gosset, G. (2003).** Expression of galP and glk in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(6), 687–694. <http://doi.org/10.1002/bit.10702>
- Hernández-Montalvo, V., Valle, F., Bolivar, F., & Gosset, G. (2001).** Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 186–191. <http://doi.org/10.1007/s002530100752>
- Jeffries, T. W., & Thomas W. Jeffries. (1998).** Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts, and Fungi. *Microbiologist. Forest Products Laboratory, U.S. Dept. of Agriculture*, 27, 1–32. <http://doi.org/10.1007/BFb0009101>
- Jojima, T., Omumasaba, C. A., Inui, M., & Yukawa, H. (2010).** Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: Current knowledge and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 471–480. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2292-1>
- Journal, I., Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994).** Review Paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](http://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Keseler, I. M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., ... Karp, P. D. (2013).** EcoCyc: Fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 605–612. <http://doi.org/10.1093/nar/gks1027>
- Khankal, R. (2009).** *STUDYING AND IMPROVING XYLOSE UPTAKE AND UTILIZATION IN ESCHERICHIA COLI*. The Pennsylvania State University.
- Khankal, R., Chin, J. W., & Cirino, P. C. (2008).** Role of xylose transporters in xylitol production from engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 134(3–4), 246–252. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.02.003>
- Kuchner, O., & Arnold, F. H. (1997).** Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends in Biotechnology*. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01138-4](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01138-4)
- Lerner, C. G., & Inouye, M. (1990).** Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. *Nucleic acids research*, 18(15), 4631. <http://doi.org/10.1093/nar/18.15.4631>
- Leung, D. W., Chen, E., & Goeddel, D. V. (1989).** A Method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, 1, 11–15.
- Li, R., Chen, Q., Wang, P. G., & Qi, Q. (2007).** A novel-designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1103–1109. <http://doi.org/10.1007/s00253-007-0903-2>
- Lian, J., Li, Y., Hamedirad, M., & Zhao, H. (2014).** Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(8), 1521–1531.

<http://doi.org/10.1002/bit.25214>

- Luo, Y., Zhang, T., & Wu, H. (2014).** The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.009>
- Lutz, S., & Patrick, W. M. (2004).** Novel methods for directed evolution of enzymes: Quality, not quantity. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.05.004>
- Madar, D., Dekel, E., Bren, A., Zimmer, A., Porat, Z., & Alon, U. (2013).** Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC systems biology*, 7(1), 136. <http://doi.org/10.1186/1752-0509-7-136>
- Martinez, A., Grabar, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2007).** Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*, 107(3), 397–404. <http://doi.org/10.1007/s10529-006-9252-y>
- Menon, V., & Rao, M. (2012).** Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522–550. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Metris, A., George, S. M., Mulholland, F., Carter, A. T., & Baranyi, J. (2014).** Metabolic shift of *Escherichia coli* under salt stress in the presence of glycine betaine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), 4745–4756. <http://doi.org/10.1128/AEM.00599-14>
- Naftalin, R. J., & De Felice, L. J. (2012).** Transporters and co-transporters in theory and practice. In *Comprehensive Biophysics* (Vol. 8, pp. 228–264). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00821-3>
- Nobelmann, B., & Lengeler, J. W. (1996).** Molecular analysis of the *gat* genes from *Escherichia coli* and of their roles in galactitol transport and metabolism. *Journal of Bacteriology*, 178(23), 6790–6795.
- Novotny, C. P., & Englesberg, E. (1966).** THE L-ARABINOSE PERMEASE SYSTEM IN *ESCHERICHIA COLI* B/r. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*, 117, 217–230. [http://doi.org/10.1016/0304-4165\(66\)90169-3](http://doi.org/10.1016/0304-4165(66)90169-3)
- Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. (1996).** Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(5), 312–331. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00157-3](http://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00157-3)
- Packer, M. S., & Liu, D. R. (2015).** Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics*, 16(7), 379–394. <http://doi.org/10.1038/nrg3927>
- Pratish Gawand. (2014).** *Metabolic Engineering for Substrate Co-utilization*. University of Toront.
- Pritchard, L., Corne, D., Kell, D., Rowland, J., & Winson, M. (2005).** A general model of error-prone PCR. *Journal of Theoretical Biology*, 234(4), 497–509. <http://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.12.005>
- Rahman, M., Hasan, M. R., & Oba, T. (2006).** Effect of *rpoS* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme
- Ren, C., Chen, T., Zhang, J., Liang, L., & Lin, Z. (2009).** An evolved xylose transporter from *Zymomonas mobilis* enhances sugar transport in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 8, 66. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-8-66>

- Rosenfeld, S. A., Stevis, P. E., & Ho, N. W. (1984).** Cloning and characterization of the xyl genes from *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics: MGG*, 41.
- Sasaki, M., Jojima, T., Kawaguchi, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2009).** Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 105–115. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2065-x>
- Scripture, J. B., Voelker, C., Miller, S., O'Donnell, R. T., Polgar, L., Rade, J., ... Hogg, R. W. (1987).** High-affinity L-arabinose transport operon. Nucleotide sequence and analysis of gene products. *J Mol Biol*, 197(1), 37–46.
- Shamanna, D. K., Sanderson, K. E., Shamannat, D. K., & Sanderson, K. E. (1979).** Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of bacteriology*, 139(1), 64–70.
- Shiroda, M., Pratt, Z. L., Döpfer, D., Wong, A. C. L., & Kaspar, C. W. (2014).** RpoS impacts the lag phase of *Salmonella enterica* during osmotic stress. *FEMS Microbiology Letters*, 357(2), 195–200. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12523>
- Song, S., & Park, C. (1997).** Organization and Regulation of the D -Xylose Operons in *Escherichia coli* K-12 : XylR Acts as a Transcriptional Activator, 179(22), 7025–7032.
- Stoner, C., & Schleif, R. (1983).** The *araE* low affinity L-arabinose transport promoter. Cloning, sequence, transcription start site and DNA binding sites of regulatory proteins. *Journal of molecular biology*, 171(4), 369–381. [http://doi.org/0022-2836\(83\)90035-9](http://doi.org/0022-2836(83)90035-9) [pii]
- Sumiya, M., Davis, E. O., Packman, L. C., McDonald, T. P., & Henderson, P. J. F. (1995).** Molecular genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene *xylF*, in *Escherichia coli*. *Receptors & channels*, 3(2), 117–128. Recuperado a partir de <http://europepmc.org/abstract/MED/8581399>
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., & Van Impe, J. F. (2004).** Predictive modelling of the microbial lag phase: A review. *International Journal of Food Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006>
- Tarr, P. T., Tarling, E. J., Bojanic, D. D., Edwards, P. A., & Baldán, Á. ´. (2009).** Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 584–593. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.007>
- Taylor, R. G., Walker, D. C., & McInnes, R. R. (1993).** *E. coli* host strains, 21(7), 1677–1678.
- Utrilla, J. (2010). *Tesis Doctorado Ingeniería metabólica en E. coli para la conversión eficiente de xilosa a D-lactato*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Utrilla, J., Gosset, G., & Martínez, A. (2009).** ATP limitation in a pyruvate formate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to d-lactate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(8), 1057–1062. <http://doi.org/10.1007/s10295-009-0589-9>
- Utrilla Carreri, J., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. K., & Martínez, A. (2012).** Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for d-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic Engineering*, 14(5), 469–476. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.07.007>
- Vind, J., Sørensen, M. A., Rasmussen, M. D., & Pedersen, S. (1993).** Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes. Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels. *Journal of molecular biology*.

<http://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1319>

Wang, C., Shen, Y., Hou, J., Suo, F., & Bao, X. (2013). An assay for functional xylose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry*, *442*(2), 241–248. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.041>

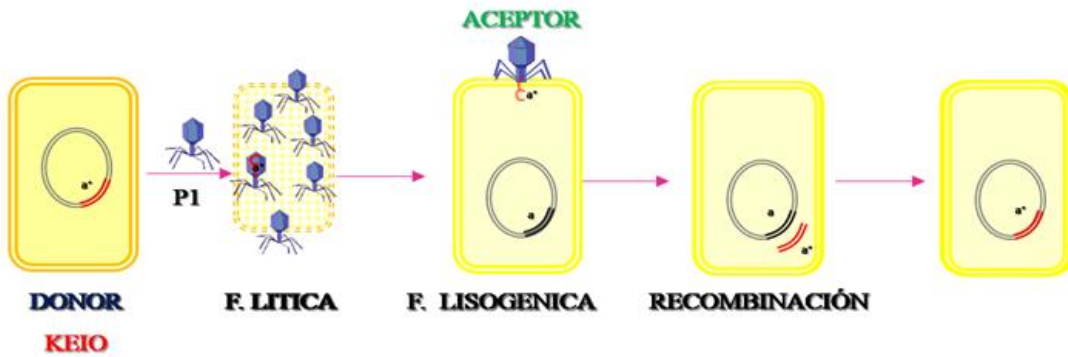
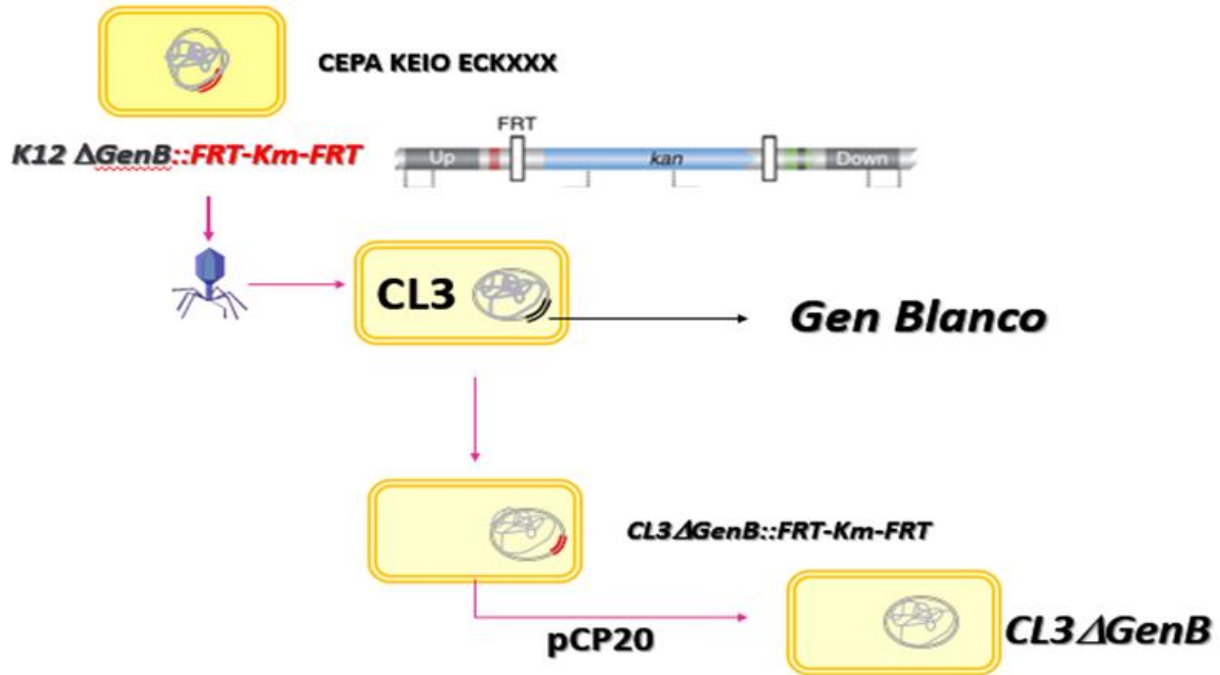
Wisedchaisri, G., Park, M.-S., Iadanza, M. G., Zheng, H., & Gonen, T. (2014). Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. *Nat. Commun.*, *5*, 4521. <http://doi.org/10.1038/ncomms5521>

Young, E. M., Comer, A. D., Huang, H., & Alper, H. S. (2012). A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, *14*(4), 401–411. <http://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.03.004>

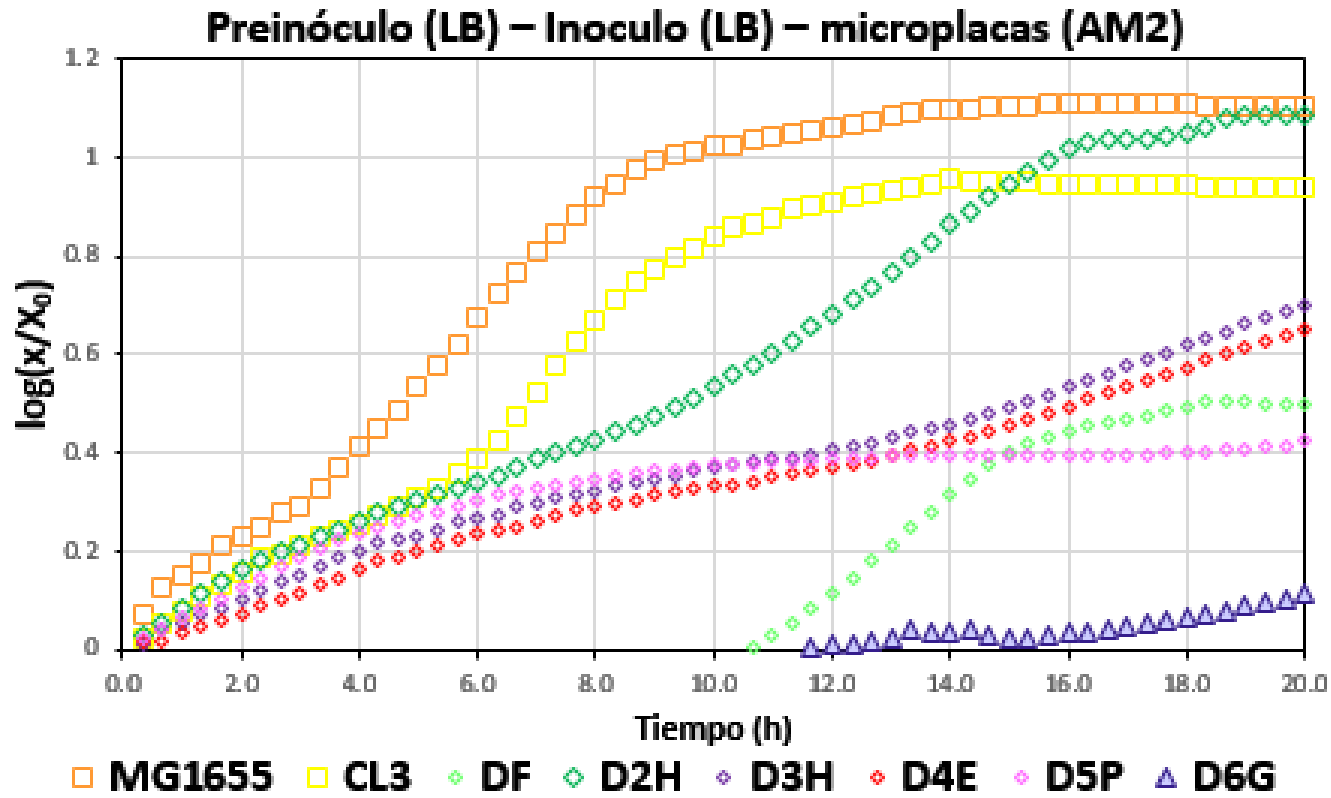
Zakour, R. A., Kunkel, T. A., & Loeb, L. A. (1981). Metal-induced infidelity of DNA synthesis. *Environmental Health Perspectives*. <http://doi.org/10.1007/BF00412453>

APÉNDICES

Apéndice A. Inactivación génica con el fago P1

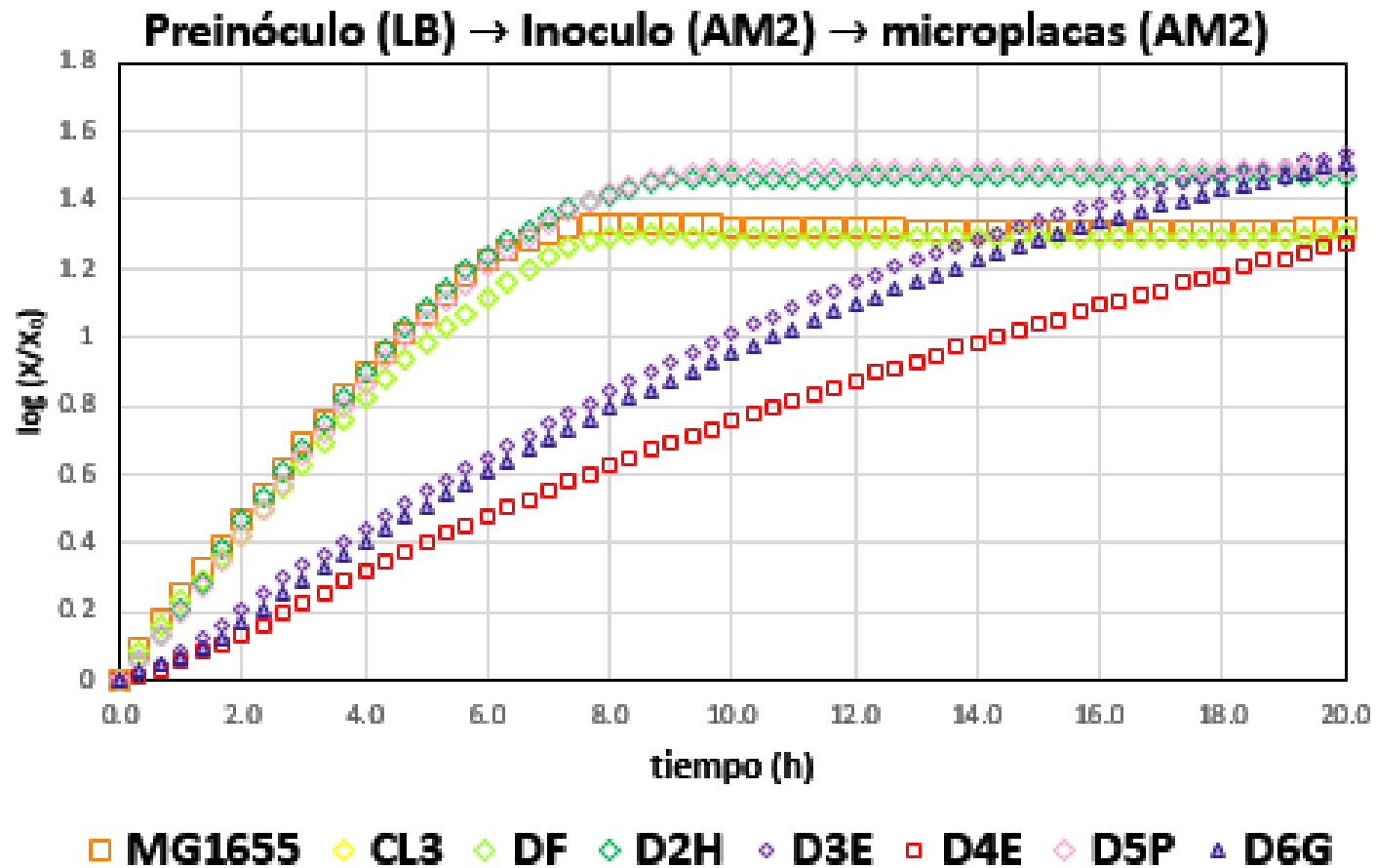


Apéndice B. Cinética de las mutantes sin adaptación (a) y adaptadas (b) en microplacas en medio AM2 con 5 g/L D-xilosa.



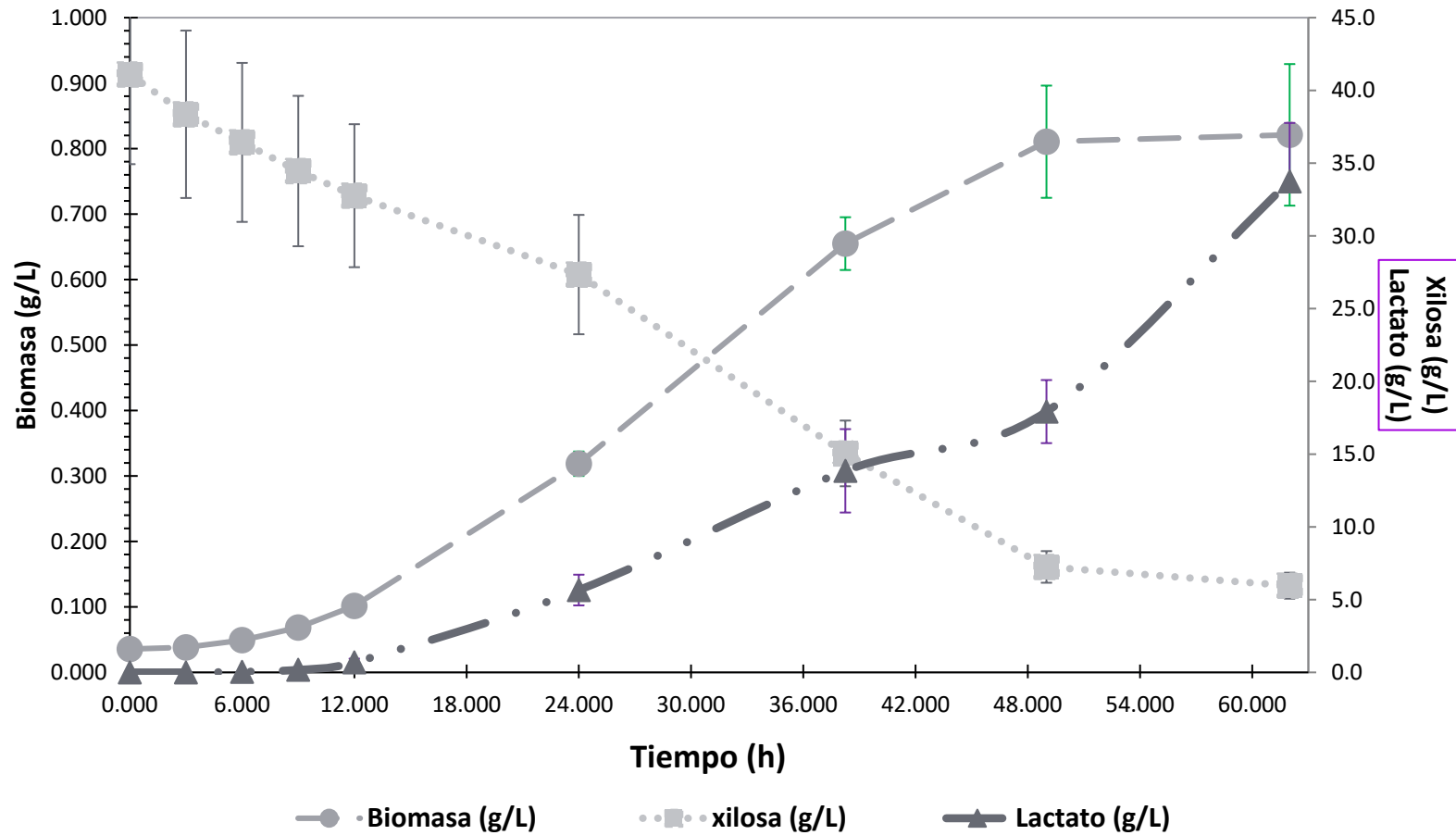
a)

Apéndice C. Cinética de las mutantes adaptadas en microplacas en medio AM2 con 5g/L de D-xilosa

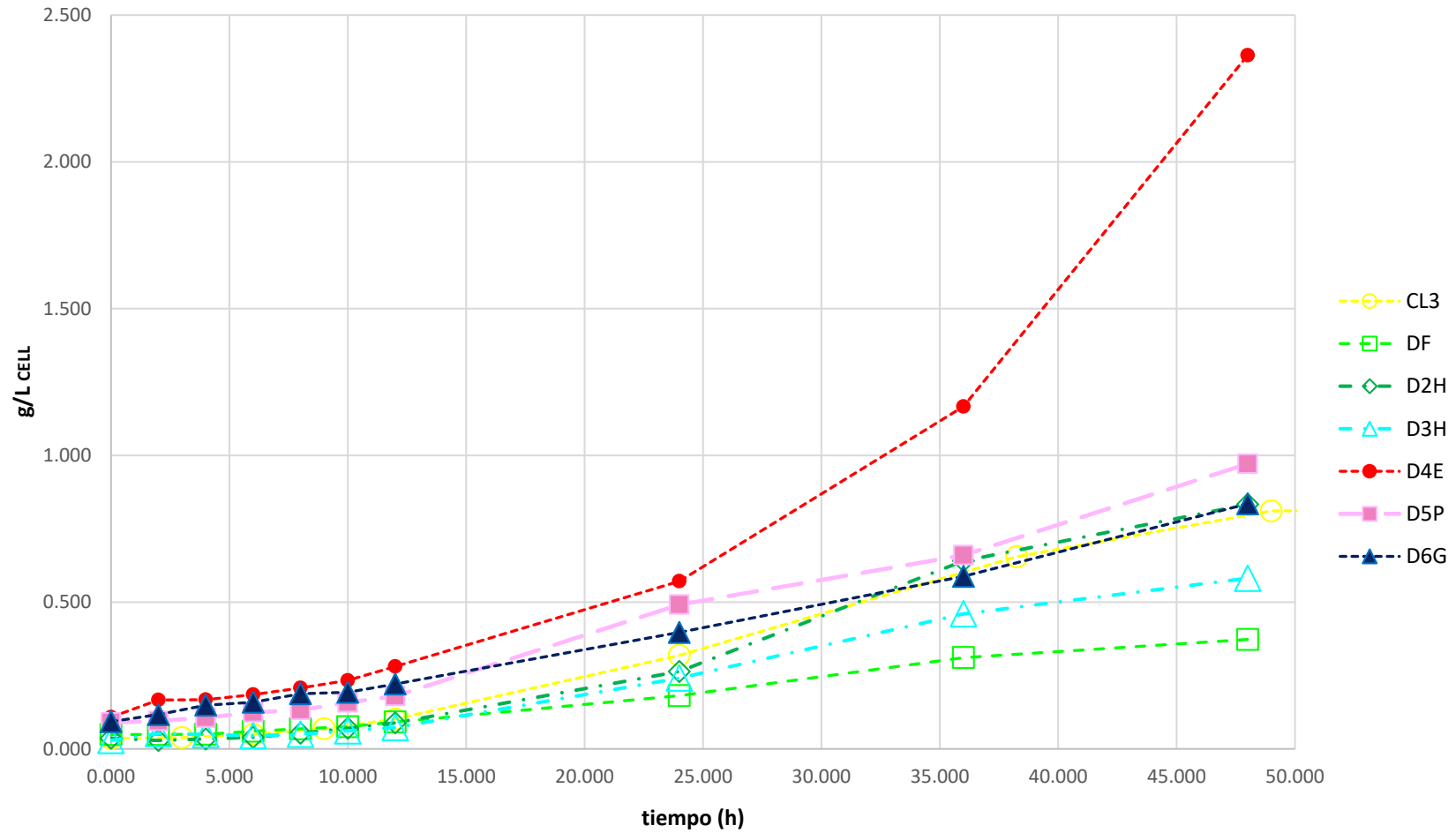


b)

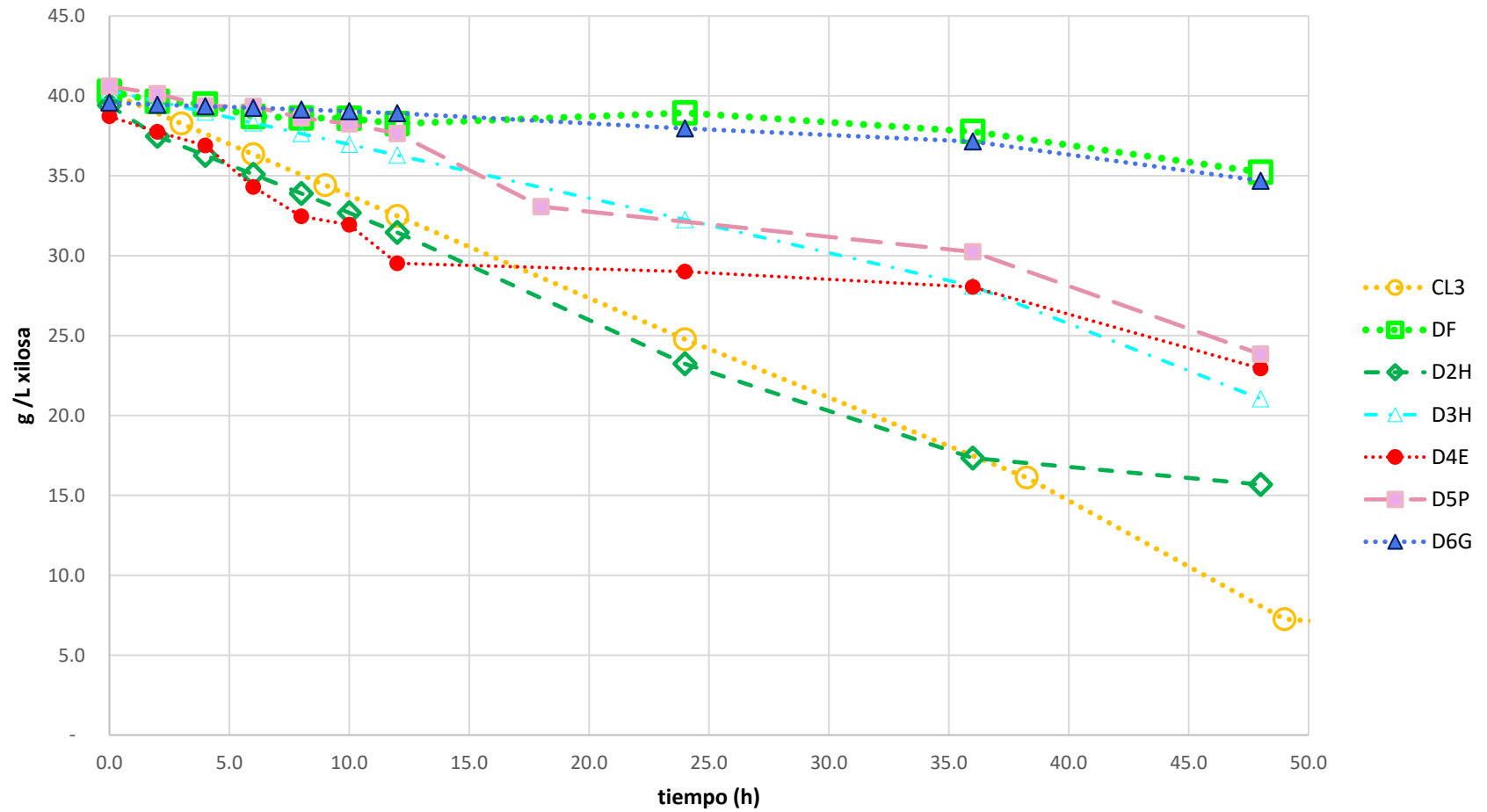
Apéndice D Cinética de crecimiento, consumo de D-xilosa y producción de D-Lactato y parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos de un cultivo con CL3 en minifermentadores de 200 mL con 40 g/L de D-xilosa a 37 °C y 150 rpm.



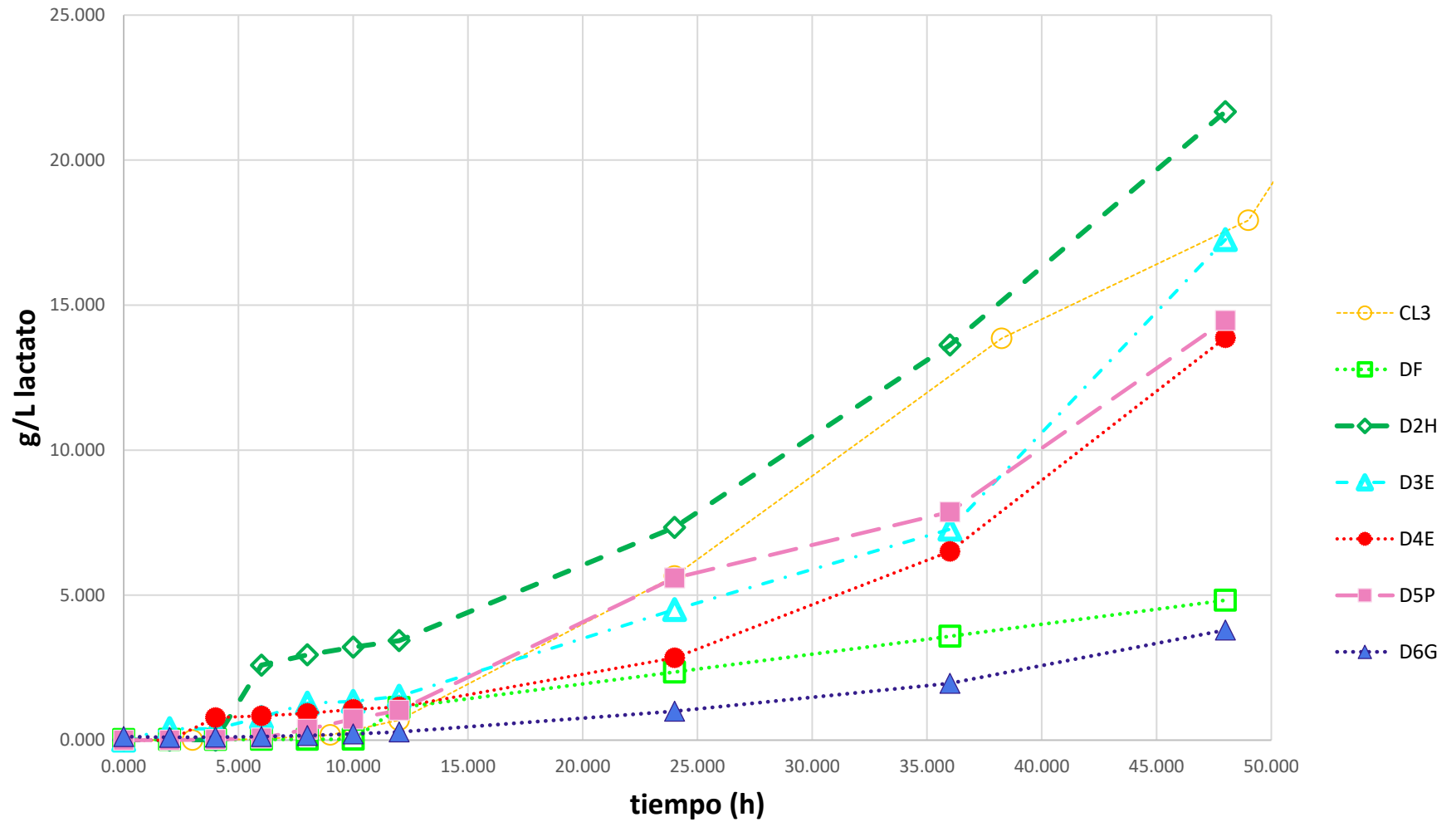
Apéndice E. Cinética de crecimiento de las mutantes con capacidad disminuida de transporte de D-xilosa en minifermentadores de 200 mL con 40 g/L de D-xilosa a 37 °C y 150 rpm.



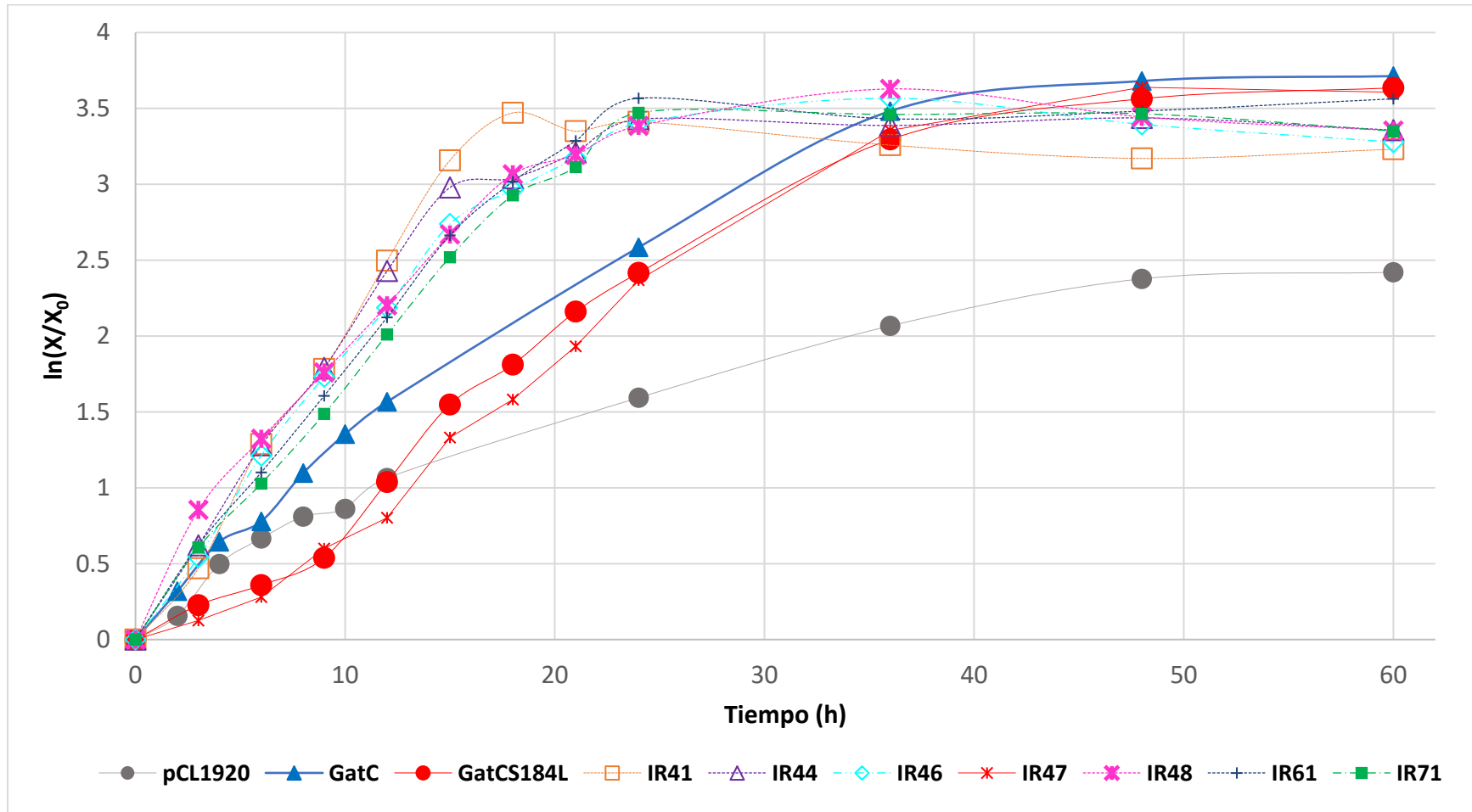
Comparación del consumo D-xilosa de las mutantes con capacidad disminuida de transporte de D-xilosa en minifermentadores de 200 mL con 40 g/L de D-xilosa a 37 °C y 150 rpm.



Comparación de la producción de D-lactato de las mutantes con capacidad disminuida de transporte en minifermentadores de 200 mL con 40 g/L de D-xilosa a 37°C y 150 rpm.



Apéndice F. Cinética de crecimiento de las variantes de $\Delta^6G/$ con las mutantes aisladas de pCLgatC y pCLGatCS184L en minifermentadores de 200 mL con 40 g/L de D-xilosa a 37 °C y 150 rpm.



Apéndice G. Cálculos usados para determinar los parámetros Cinéticos de crecimiento

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

Se calculada a partir de la gráfica del logaritmo de la biomasa $\ln(x)$ (g_{CELL}) v/s el tiempo t (h). La velocidad específica de crecimiento se obtiene de la regresión lineal en la fase de crecimiento exponencial

$$\ln(x) = \mu t(x) + \ln(x_0)$$

utilizando como parámetro para evaluar la correlación lineal el método de mínimos cuadrados (r^2) en valores superiores a >0.95 .

Rendimientos en la fase de crecimiento exponencial

Los rendimientos $Y_{x/s}$ (g_{CELL}/g_{xilosa}), $Y_{p/s}$ ($g_{lactato}/g_{xilosa}$) y $Y_{x/p}$ (g_{CELL}/g_{xilosa}), durante la fase de crecimiento exponencial fueron calculados de la siguiente manera:

$$Y_{p/s} = \frac{\frac{g}{L} \text{ de lactato } (p)}{\frac{g}{L} \text{ de xilosa } (s)} \quad Y_{x/s} = \frac{\frac{g}{L} \text{ de Biomasa } (X_{max})}{\frac{g}{L} \text{ de xilosa consumida } (s)} \quad Y_{p/x} = \frac{\frac{g}{L} \text{ de lactato } (p)}{\frac{g}{L} \text{ de Biomasa } (X_{max})}$$

Cálculo de la velocidad específica de consumo de sustrato

La velocidad específica de consumo de D-xilosa q_s ($g_{xilosa}/g_{CELL} \cdot h$) y de producción de láctico q_p ($g_{lactato}/g_{WDC} \cdot h$), fueron calculadas en la fase exponencial de los cultivos así:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \quad q_p = \mu * Y_{p/s}$$

Y en la fase estacionaria así:

$$q_s = \frac{S_{m\acute{a}x}}{X_{max} * t(min)} \quad q_p = \frac{P_{m\acute{a}x}}{X_{max} * t(min)}$$

Productividad volumétrica de lactato Q_p ($g_{lactato}/L \cdot h$).

$$Q_p = \frac{\left(\frac{g}{L}\right) \text{ lactato total } (p)}{(h) \text{ tiempo total de fermentación } (t)}$$

Apéndice H. Medios de cultivos

Medio Luria – Bertani (LB)

Es Medio de cultivo para bacterias compuesto por:

Componente	g/L
Extracto de levadura	5
Triptona	10
NaCl	10
Ajustar pH a 7.5	

Para hacer medio sólido se añadieron 20 g/L de agar- agar. El antibiótico se añadió de acuerdo a la cepa usada y a la concentración que cada experimento indica y en el momento en que el medio estuviera tibio, previo a servir las cajas o en el caso del medio líquido en el momento de inocular el medio con la cepa.

Medio SOC

Es un caldo superóptimo con represión catabólica (SOC), se utiliza para recuperar las células electroporadas y obtener una eficacia de transformación máxima en E. coli.

Componente	Concentración
Extracto de levadura	5 g/L
Triptona	20 g/L
NaCl	10 mM
KCl	20 mM
Glucosa	20 mM
Ajustar pH a 7.0	

Medio MacConkey Modificado

Es un tipo de medio usado para seleccionar bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos, capaces de fermentar la fuente de carbono que se use, en este trabajo (D-Xilosa).

Componente	g/L
Peptona	17
pluripeptona	3
Fuente de carbono (xilosa)	10
Mezcla de sales biliares	1.5
NaCl	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
Ajustar pH a 7.1 ± 0.2	

El medio se preparó añadiendo 50 g/L de agar-agar y se deja reposar por 5 min, se mezcla hasta uniformar, se calienta suavemente y se deja hervir por 2 min hasta disolver y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. El antibiótico se añadió de acuerdo con la cepa evaluada y a la concentración que cada experimento indica, en el momento en que el medio estuviera tibio, previo a servir las cajas.

Medio mínimo mineral AM2(Martinez et al., 2007)

Es el medio utilizado en cultivos aireados y no aireados, en nuestro caso fue suplementado con ácido cítrico (100 mg/L) y como fuente de carbono (D-xilosa) a las concentraciones que indica cada experimento.

Componente	g/L
(NH₄)₂HPO₄	2.63
NH₄H₂PO₄	0.87
MgSO₄.7H₂O	10
KCl	0.15
Betaína 1M	1.0 mL
Elementos traza*	1.5 mL
Otros**	

*La solución de elementos traza contiene por litro (1.6g FeCl₃, 0.2g CoCl₂.6H₂O, 0.1g CuCl₂, 0.2g ZnCl₂.4H₂O, 0.2g Na₂MoO₄, 0.05g H₃BO₃ y 0.33g MnCl₂.4H₂O).

Apéndice I. Secuencias de los genes *gatC* y *gatCS184L*

>*gatC_gene*

```
atgTTTTTCAGAAGTCATGCGTTATATTCTCGACCTCGGCCCTACGGTGATGCTGCCGATTGTCATCA
TTATTTTTTCTAAAATATTAGGCATGAAGGCAGGCGATTGCTTTAAAGCGGGTCTGCATATCGGGAT
TGGCTTTGTTGGCATTGGCCTTGTGATTGGCTTAATGCTGGATTCCATTGGCCCCGGCGGCGAAAG
CGATGGCGGAAAATTTTCGACCTGAATCTGCATGTGGTCGATGTTGGCTGGCCGGGCTCTTCACCA
ATGACCTGGGCGTCGCAAATTGCGCTGGTGGCGATTCCGATTGCGATTCTGGTTAACGTGGCGAT
GTTACTGACCCGTATGACGCGGGTGGTAAATGTTGATATCTGGAATATCTGGCATATGACCTTCAC
CGGCGCGTTGCTGCATCTGGCAACCGGTTTCATGGATGATAGGGATGGCAGGTGTGGTAATTAC
GCGGCGTTTGTATAAGCTCGGCGACTGGTTTGCCCGCGATACCCGAAATTTCTTTGAGCTGGA
AGGTATTGCTATTCCGCACGGTACGTGCGCGTATATGGGGCCGATTGCGGTGCTGGTTCGATGCTA
TCATCGAGAAAATCCCAGGCGTTAACCGAATTAATTTAGCGCCGACGATATTCAGCGCAAATTTG
GTCCATTTGGCGAGCCTGTCACCGTGGGTTTTGTGATGGGGCTGATTATCGGCATCCTCGCGGGT
TACGATGTCAAAGGTGTATTGCAGCTGGCGGTA AAAACGGCGGCAGTGATGCTGCTAATGCCACG
GGTGATTAACCCATCATGGATGGTTAACGCCATCGCTAAGCAGGCTCGTAGTCGTTTACAGG
CGAAGTTCGGCGGTCAGGAGTTCCTGATTGGCCTTGATCCGGCGTTGCTGCTGGGACATACGGC
GGGGTGGTATCGGCAAGCCTGATTTTTATCCACTCACCATTTTAATTGCTGTTTGTGTGCCGGGT
AATCAGGTGCTGCCGTTTGGCGATCTTGCCACCATCGGCTTCTTCGTGGCGATGGCGGTCCCGT
GCATCGTGGAATCTGTTCCGCACCTTAATCTCGGGTGTATCATTATGAGCATCACCTGTGGAT
CGCGACGCAAATCTGTTTGCACACCCAATGGCGGCTAATGCTGGGGCGTTAAAAGCCGGG
GGTATGGTGGCTCAATGGATCAGGGCGGTTCTCCATTACCTGGTTACTGATTACAGGTTTTCTCC
CCGCAAATATTCCCGGTTTCATTATTATCGGTGCAATTTATCTGACCGGTATTTTCATGACCTGGC
GTAGAGCGCGTGGCTTTATTAACAAGAGAAAGTCGTTCTCGCAGAAtaa
```

>*gatCS184L_gene*

```
TTATTCTGCGAGAACGACTTTCTCTTGTTTAATAAAGCCACGCGCTCTACGCCAGGTTCATGAAAATA
CCGGTCAGATAAATTGCACCGATAATAATGAAACCGGGAATATTTTTCGCGGGGAGAAAACCTGAATC
AGTAACCAGGTAATGGGAGAACC GCCCTGATCCATTGAAGCCACCATACCCCGGCTTTTAAACGC
CCCAGCATTAGCCGCCAGTTGGGTGTGCAAACCAATAGTTTGCCTCGCGATCCACAGGGTGTATGC
TCATAATGATGACACCCGAGATTAAGGTGCGGAACAGATTTCCACGATGCACGGCGACCGCCATC
GCCACGAAGAAGCCGATGGTGGCAAGATCGCCAAACGGCAGCACCTGATTACCCGGCACACAAA
CAGCAATTA AAAATGGT GAGTGGGATAAAAATCAGGCTTGCCGATACCACCGCCGATGTCCCAGC
AGCAACGCCGGATCAAGGCCAATCAGGAACTCCTGACCGCCGAACTTCGCCTGTAAACGACTACG
AGCCTGCTTAGCGATGGGCGTTAAACCATCCATGATGGGTTTTAATCACCCGTGGCATTAGCAGCA
TCACTGCCGCGTTTTTACC GCCAGCTGCAATACACCTTTGACATCGTAACCCGCGAGGATGCCG
ATAATCAGCCCCATCACAAAACCCACGGTGACAGGCTCGCCAAATGGACCAAATTTGCGCTGAAT
ATCGTCGGCGCTAAATTTAATTCGGTTAACGCCTGGGATTTTCTCGATGATAGCATCGACCAGCAC
CGCAATCGGCCCATATACGCCgACGTACCGTGCGGAATAGCAATACCTTCCAGCTCAAAGAAATT
TCGGGTATCGCGGGCAAACCAAGTCGCCGAGCTTATAAACAAACGCCGCGTGAATTACCACACCTG
CCATCCCTATCATCCATGAACCGGTTGCCAGATGCAGCAACGCGCCGGTGAAGGTCATATGCCAG
ATATTCCAGATATCAACATTTACCACCCGCGTCATACGGGTCAGTAACATCGCCACGTTAACCAGA
ATCGCAATCGGAATCGCCACCAGCGCAATTTGCGACGCCAGGTCATTGGTGAAGAGCCCGGCC
AGCCAACATCGACCACATGCAGATTCAGGTCGAAATTTTCCGCCATCGCTTTCCGCCCGGGCCA
ATGGAATCCAGCATTAAAGCCAATCACAAGGCCAATGCCAACAAAGCCAATCCCGATATGCAGACC
CGTTTTAAAGCAATCGCCTGCCTTCATGCCTAATTTTTAGAAAAATAATGATGACAATCGGCAGC
ATCACCGTAGGGCCGAGGTCGAGAATATAACGCATGACTTCTGAAACCAT
```

Apéndice J. Reporte de PEDEL-AA para la librería obtenida con epPCR de baja tasa de mutación

Input sequence length = 1353 nt = 451 amino acids.
There are 393 T's, 309 C's, 263 A's and 388 G's in the input sequence.

Summary of library characteristics:

Property	Estimate
Total library size	1.436e+05
Number of variants with no indels or stop codons	1.099e+05
Mean number of amino acid substitutions per variant	3.035
Unmutated (wild-type) sequences (% of library; Poisson est.)	3.679%
Number of distinct full-length proteins in the library (Poisson est.)	8.935e+04

Indels:

Library size: 1.436e+05
Fraction of the library with one or more insertions: 0.0009995
Fraction of the library with one or more deletions: 0.0009995
Number of sequence variants with no indels: 1.433e+05

For sequences with no indels:

Mean number of stop codons per variant: 0.2652
Mean number of unchanged codons per variant: 446.9
Mean number of synonymous amino acid substitutions per variant: 0.7862
Mean number of nonsynonymous (non-stop codon) amino acid substitutions per variant: 3.035
Fraction of indel-free variants with no introduced stop codons: 0.7666
Number of variants with no indels and no introduced stop codons: 1.099e+05

Approximate statistics for sequences with no indels and no introduced stop codons:

Effective library size, $L = 1.099e+05$
Mean number of non-synonymous amino acid substitutions accessible by a single nucleotide substitution, $A = 5.73$
Expected number of distinct variants in the library that differ from the parent by a single amino acid (Poisson) = 1912
Expected total number of distinct amino acid substitutions present in at least one sequence in the library = 2986
Estimated total number of distinct amino acid variants in the library (Poisson), $C = 8.935e+04$.
PCR distribution statistics not requested.

Links to further information about this library:

Normalized and scaled [nucleotide matrix](#).
[Table](#) of sub-library compositions.
[Graphical](#) overview of truncated variant statistics.
Input [parameters](#).
Input [sequence](#).
[Notes](#) on the PEDEL-AA algorithms.

Reporte de PEDEL-AA para la librería obtenida con epPCR de alta tasa de mutación

Input sequence length = 1353 nt = 451 amino acids.

There are 393 T's, 309 C's, 263 A's and 388 G's in the input sequence.

Summary of library characteristics:

Property	Estimate
Total library size	1.32e+05
Number of variants with no indels or stop codons	8.879e+04
Mean number of amino acid substitutions per variant	6.012
Unmutated (wild-type) sequences (% of library; Poisson est.)	0.165%
Number of distinct full-length proteins in the library (Poisson est.)	8.828e+04

Indels:

Library size: 1.32e+05

Fraction of the library with one or more insertions: 0.0009995

Fraction of the library with one or more deletions: 0.0009995

Number of sequence variants with no indels: 1.317e+05

For sequences with no indels:

Mean number of stop codons per variant: 0.3929

Mean number of unchanged codons per variant: 441.9

Mean number of synonymous amino acid substitutions per variant: 2.733

Mean number of nonsynonymous (non-stop codon) amino acid substitutions per variant: 6.012

Fraction of indel-free variants with no introduced stop codons: 0.674

Number of variants with no indels and no introduced stop codons: 8.879e+04

Approximate statistics for sequences with no indels and no introduced stop codons:

Effective library size, $L = 8.879e+04$

Mean number of non-synonymous amino acid substitutions accessible by a single nucleotide substitution, $A = 5.73$

Expected number of distinct variants in the library that differ from the parent by a single amino acid (Poisson) = 878.1

Expected total number of distinct amino acid substitutions present in at least one sequence in the library = 3427

Estimated total number of distinct amino acid variants in the library (Poisson), $C = 8.828e+04$.

PCR distribution statistics not requested.

Links to further information about this library:

Normalized and scaled [nucleotide matrix](#).

[Table](#) of sub-library compositions.

[Graphical](#) overview of truncated variant statistics.

Input [parameters](#).

Input [sequence](#).

[Notes](#) on the PEDEL-AA algorithms.

Reporte de PEDEL-AA para la librería obtenida con epPCR de baja tasa de mutación para el gen *gatCS184L*

Input sequence length = 1353 nt = 451 amino acids.

There are 393 T's, 309 C's, 263 A's and 388 G's in the input sequence.

Summary of library characteristics:

Property	Estimate
Total library size	9e+04
Number of variants with no indels or stop codons	7.417e+04
Mean number of amino acid substitutions per variant	3.64
Unmutated (wild-type) sequences (% of library; Poisson est.)	2.163%
Number of distinct full-length proteins in the library (Poisson est.)	6.748e+04

Indels:

Library size: 9e+04

Fraction of the library with one or more insertions: 0.0009995

Fraction of the library with one or more deletions: 0.0009995

Number of sequence variants with no indels: 8.982e+04

For sequences with no indels:

Mean number of stop codons per variant: 0.1913

Mean number of unchanged codons per variant: 445.8

Mean number of synonymous amino acid substitutions per variant: 1.348

Mean number of nonsynonymous (non-stop codon) amino acid substitutions per variant: 3.64

Fraction of indel-free variants with no introduced stop codons: 0.8257

Number of variants with no indels and no introduced stop codons: 7.417e+04

Approximate statistics for sequences with no indels and no introduced stop codons:

Effective library size, $L = 7.417e+04$

Mean number of non-synonymous amino acid substitutions accessible by a single nucleotide substitution, $A = 5.73$

Expected number of distinct variants in the library that differ from the parent by a single amino acid (Poisson) = 2358

Expected total number of distinct amino acid substitutions present in at least one sequence in the library = 3193

Estimated total number of distinct amino acid variants in the library (Poisson), $C = 6.748e+04$.

PCR distribution statistics not requested.

Links to further information about this library:

Normalized and scaled [nucleotide matrix](#).

[Table](#) of sub-library compositions.

[Graphical](#) overview of truncated variant statistics.

Input [parameters](#).

Input [sequence](#).

[Notes](#) on the PEDEL-AA algorithms.

Reporte de PEDEL-AA para la librería obtenida con epPCR de alta tasa de mutación para el gen gatCS184L

Input sequence length = 1353 nt = 451 amino acids.
There are 393 T's, 309 C's, 263 A's and 388 G's in the input sequence.

Summary of library characteristics:

Property	Estimate
Total library size	5.4e+04
Number of variants with no indels or stop codons	3.447e+04
Mean number of amino acid substitutions per variant	7.193
Unmutated (wild-type) sequences (% of library; Poisson est.)	0.04805%
Number of distinct full-length proteins in the library (Poisson est.)	3.447e+04

Indels:

Library size: 5.4e+04
Fraction of the library with one or more insertions: 0.0009995
Fraction of the library with one or more deletions: 0.0009995
Number of sequence variants with no indels: 5.389e+04

For sequences with no indels:

Mean number of stop codons per variant: 0.4458
Mean number of unchanged codons per variant: 440.4
Mean number of synonymous amino acid substitutions per variant: 2.977
Mean number of nonsynonymous (non-stop codon) amino acid substitutions per variant: 7.193
Fraction of indel-free variants with no introduced stop codons: 0.6395
Number of variants with no indels and no introduced stop codons: 3.447e+04

Approximate statistics for sequences with no indels and no introduced stop codons:

Effective library size, $L = 3.447e+04$
Mean number of non-synonymous amino acid substitutions accessible by a single nucleotide substitution, $A = 5.73$
Expected number of distinct variants in the library that differ from the parent by a single amino acid (Poisson) = 177.7
Expected total number of distinct amino acid substitutions present in at least one sequence in the library = 3168
Estimated total number of distinct amino acid variants in the library (Poisson), $C = 3.447e+04$.
PCR distribution statistics not requested.

Links to further information about this library:

Normalized and scaled [nucleotide matrix](#).
[Table](#) of sub-library compositions.
[Graphical](#) overview of truncated variant statistics.
Input [parameters](#).
Input [sequence](#).
[Notes](#) on the PEDEL-AA algorithms.

Apéndice K. Análisis estadístico

Todos los experimentos realizados en este trabajo fueron hechos por triplicado, en todas las cinéticas de crecimiento para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de todas las cepas se realizaron a las mismas condiciones mínimo tres experimentos independientes tanto en minifermentadores como en microplacas como se describe en métodos. Las medidas tomadas durante cada prueba se usaron para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento como se expone en el apéndice G, sin embargo, los valores de los parámetros cinéticos de crecimiento que se reportan en las tablas son producto del promedio de los parámetros cinéticos obtenidos de los triplicados y el error que aparece reportado en las tablas es la desviación estándar de estos mismos triplicados. En las gráficas cada punto de la cinética a un tiempo dado es el promedio de las tres medidas de tres muestras independientes realizadas a las mismas condiciones y la barra de error es la desviación estándar de estas tres medidas.

Para determinar si había o no significancia entre la cepa del fondo genético vacío, con el vector y la cepa con los plásmidos con las variantes GatC y GatCS184L, se realizó una prueba ANOVA o de análisis de varianza, esta se basó en el planteamiento de dos hipótesis, la hipótesis nula (H_0) y la hipótesis alternativa (H_a) que en este caso fue así:

H_0 $\mu_0 = \mu_1 = \mu_2$; que son iguales las velocidades de crecimiento de las cepas evaluadas.

H_a $\mu_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2$; que hay diferencia en las velocidades de crecimiento de las cepas evaluadas.

Con esta prueba estadística se determinó si las diferencias en la velocidad de crecimiento entre las cepas evaluadas a una misma condición son debido a cambios por tratamiento, error experimental o una desviación atípica, teniendo en cuenta el nivel de significancia, esta es evaluada en función del valor $\alpha=0.05$, el cual es calculado asumiendo que la hipótesis nula es verdadera, por tanto:

Si $P > 0.05$ se acepta la hipótesis nula

Si $P \leq 0.05$ se acepta la hipótesis alternativa

Para los datos reportados en este trabajo

Δ^6G	$\Delta^6G/pCL1920$	$\Delta^6G/pCLGatC$	$\Delta^6G/pCLGatCS184L$
0.060	0.060	0.050	0.100
0.120	0.120	0.100	0.350
0.235	0.240	0.223	0.337
0.250	0.260	0.220	0.410

Según el test de Friedman calculado con el paquete estadístico GraphPad PRISM 6.01 para estas cuatro cepas como 4 bloques experimentales independientes el valor $P = 0.0003$, lo que implica en este caso es que a las condiciones evaluadas las cepas control (Fondo genético Δ^6G vacío y el fondo control con el vector $\Delta^6G/pCL1920$) y las cepas del fondo genético con los plásmidos con el gen del transportador nativo $\Delta^6G/pCLGatC$ y el transportador mutado $\Delta^6G/pCLGatCS184L$ son significativamente diferentes.

Para evaluar específicamente la diferencia entre los controles y la cepa con el gen nativo del transportador GatC en la cepa se hizo esta misma prueba

$$H_0 = \Delta^6G = \Delta^6G/pCL1920 = \Delta^6G/pCLGatC$$

$$H_a = \Delta^6G \neq \Delta^6G/pCL1920 \neq \Delta^6G/pCLGatC$$

$$P = 0.0185$$

Se hizo lo mismo con los controles y la cepa con el gen del transportador mutante GatCS184L

$$H_0 = \Delta^6G = \Delta^6G/pCL1920 = \Delta^6G/pCLGatCS184L$$

$$H_a = \Delta^6G \neq \Delta^6G/pCL1920 \neq \Delta^6G/pCLGatCS184L$$

$$P = 0.0046$$

Esto sugiere que hay una diferencia significativa mayor entre el comportamiento de la cepa con el plásmido GatCS184L que con el gen nativo GatC.