



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“ PRODUCCIÓN DE ETANOL EN PRESENCIA DE
ACETATO CON *Escherichia coli* ETANOLOGÉNICA
EN CULTIVOS EN LOTE Y CONTINUOS
UTILIZANDO MEZCLAS GLUCOSA-XILOSA E
HIDROLIZADOS DE HEMICELULOSA ”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. en C. Marco Tulio Fernández Sandoval

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Agosto 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del **Dr. Alfredo Martínez Jiménez**.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de los proyectos: CONACyT-Proinnova – PETRAMIN 2010/138079 - 2011/154298 - 2012/184417 y DGAPA/PAPPIT/UNAM IT 200312-2, además de la beca de doctorado No. 10616 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A mi Madre por todo su apoyo, comprensión, cariño y miles de detalles que ha tenido hacia mí durante todos estos años, simplemente eres la mejor mamá que conozco....

A mi Padre por estar a mi lado y sentir su apoyo y afecto en todo momento, por el tiempo y experiencias compartidas las cuales me han enseñado mucho

A mi abuelita querida que no pudo ver la culminación de este gran logro pero que tuvo mucho que ver!!! con mucho cariño y afecto para Ti

A toda mi gran familia: tíos, hermanos, primos y sobrinos, que me hacen sentir muy bien siempre con todas esas reuniones, convivencias y festejos

A Dios, por ser mi inspiración, mi ánimo, mi fuerza y mi refugio siempre, simplemente sin Ti nada podría hacer..., gracias por cumplir todos estos éxitos y ser mi fuente inagotable de inteligencia y sabiduría

Reconocimientos y Agradecimientos:

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez y Dr. Guillermo Gosset Lagarda por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo y desarrollar conocimiento en el área de ingeniería de vías metabólicas, por apoyarme en todo lo necesario durante la realización de este proyecto y por sus comentarios, sugerencias y correcciones durante este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado, por sus revisiones y correcciones a este trabajo de investigación, que sin lugar a dudas hicieron de éste un mejor trabajo:

Presidente: Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Secretario: Dr. Joel Osuna Quintero

Vocal: Dr. Juvencio Galíndez Mayer

Vocal: Dra. Katy Juárez López

Vocal: Dr. Leobardo Serrano Carreón

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich y al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por formar parte de mi Comité Tutorial, y llevar a cabo grandes aportaciones, comentarios, correcciones y ayudarme a ser más analítico y un mejor investigador. Al Dr. Juvencio Galíndez Mayer por incrementar mi interés en el área de la Bioingeniería, además de compartir sus amplios conocimientos en modelado y simulación de bioprocesos muy útiles durante este proyecto.

Se agradece a los M. en C. Georgina Hernández Chávez, Ramón de Anda y Berenice Trujillo Martínez, así como al Dr. Gerardo Huerta Beristain, por el apoyo técnico con: el análisis de muestras en el HPLC; el mantenimiento y operación de los diferentes fermentadores e instrumentación; y el desarrollo de algunos métodos moleculares para la construcción y caracterización de las cepas empleadas en la presente tesis. También al personal del Laboratorio Bolívar-Gosset por todo su apoyo, ayuda y amistad, en especial al Dr. Adelfo Escalante, Tec. Mercedes Enzaldo y A.E. Delia Caro, sin los cuales la realización de este proyecto hubiera sido difícil. A todos mis amigos y compañeros del mismo laboratorio y del instituto por todo ese tiempo compartido que hizo de mi estancia algo muy agradable, especial y divertido.

Índice General

	Página
Índice General	I
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VI
Resumen	1
Abstract	3
I. Introducción	5
II. Antecedentes	7
2.1 Metabolismo de <i>Escherichia coli</i> en condiciones anaerobias: Etanol como uno de los productos de fermentación	7
2.2 Hidrolizados lignocelulósicos como fuente de azúcares para la producción de etanol	8
2.3 Cepas recombinantes por ingeniería metabólica de <i>Escherichia coli</i> para la producción de etanol	9
2.3.1 Estabilidad de cepas modificadas de <i>Escherichia coli</i> para la producción de etanol	15
2.4 Efecto de compuestos inhibitorios presentes en hidrolizados de hemicelulosa sobre la etanogenicidad de cepas recombinantes de <i>Escherichia coli</i>	17
2.4.1 Efecto del ácido acético como inhibidor del crecimiento celular derivado del proceso de obtención de hidrolizados de hemicelulosa	20
2.5 Cultivo continuo para la producción de etanol con diversas cepas etanológicas	21
2.5.1 Producción de etanol empleando cultivos continuos con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.5.2 Producción de etanol empleando cultivos continuos con cepas de <i>Escherichia coli</i> etanológicas	26
III. Objetivos	29
3.1 Hipótesis	29
3.2 Objetivo General	29
3.2.1 Objetivos Específicos	29
IV. Materiales y Métodos	31
4.1 Construcción de la cepa etanológica <i>E. coli</i> MS04, cepas empleadas para el estudio de la tolerancia a acetato y medio de cultivo	31

4.2 Caracterización de la cepa de <i>Escherichia coli</i> etanologénica MS04 en medio mineral con glucosa y/o xilosa en presencia de acetato de sodio	35
4.3 Cultivos en lote y continuos para incrementar la producción de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04	35
4.3.1 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en cultivo en lote y su evaluación como criterio de escalamiento en cinéticas de producción de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04	37
4.4 Cultivos en lote de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en medio mineral con glucosa en presencia de diferentes concentraciones de acetato de sodio	39
4.4.1 Determinación de la tolerancia a acetato en cultivos en lote en condiciones aerobias de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04	41
4.5 Secuenciación y comparación del genoma de cepas evolucionadas	41
4.6 Fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de colza y olivo para la producción de etanol por la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04	42
4.7 Métodos analíticos	43
4.7.1 Determinación de actividades enzimáticas de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa II de <i>Zymomonas mobilis</i> expresadas en <i>Escherichia coli</i> MS04	44
V. Resultados y Discusión	46
5.1 Construcción de la cepa de <i>Escherichia coli</i> homoetanologénica MS04 y su caracterización fenotípica en presencia de acetato	46
5.1.1 La cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 requiere acetato para alcanzar altas concentraciones de biomasa y etanol al utilizar fuentes de carbono como glucosa y xilosa	50
5.2 Cultivos continuos en una o múltiples etapas bajo condiciones no aireadas no permiten el consumo total de azúcares ni elevadas productividades de etanol respectivamente por <i>Escherichia coli</i> MS04	54
5.3 La inactivación de la enzima alcohol deshidrogenasa II (AdhB) en condiciones aireadas impide una elevada producción de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivos continuos en dos fases	59
5.4 Una baja transferencia de oxígeno (expresada como k_{La}) mejora el crecimiento y productividad de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04 en medio mineral con glucosa, xilosa y acetato	63
5.4.1 Cultivo en lote con baja transferencia de oxígeno	63
5.4.2 Escalamiento de la producción de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04 empleando como criterio el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	67
5.4.3 Cultivo continuo en dos etapas con baja transferencia de oxígeno	69

5.4.4 Evaluación de las constantes cinéticas estimadas y del modelo cinético de inhibición por etanol en cultivo en lote y continuo	73
5.5 La cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 es capaz de crecer y producir etanol en presencia de elevadas concentraciones de acetato de sodio, siendo la concentración no disociada de ácido acético la causante de la inhibición del crecimiento	76
5.6 La cepa etanológica <i>Escherichia coli</i> MS04 es más tolerante a acetato que la cepa parental <i>Escherichia coli</i> MG1655 en condiciones no aireadas	82
5.6.1 El fenotipo de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en presencia de acetato sólo se presenta en condiciones no aireadas	84
5.7 Secuenciación genómica de las cepas <i>Escherichia coli</i> JU15 y MS04: La pérdida de un gran fragmento de ADN en ambas cepas favorece el crecimiento de las cepas en presencia de acetato y decrece su efecto inhibitorio	88
5.8 <i>Escherichia coli</i> MS04 es capaz de producir etanol con buenos rendimientos utilizando hidrolizados hemicelulósicos en cultivo en lote en condiciones de baja transferencia de oxígeno	94
VI. Conclusiones	98
VII. Perspectivas	101
VIII. Bibliografía	102
Anexos: Producción científica	111
Anexos A: Publicaciones	111
Anexos B: Presentaciones en Congresos	112

Índice de Figuras

		Página
Figura 2.1.	Vías metabólicas en condiciones de fermentación de la cepa parental <i>Escherichia coli</i> MG1655 y cepas etanológicas construídas	10
Figura 2.2.	Azúcares y compuestos inhibidores generados durante la hidrólisis de lignocelulosa	19
Figura 2.3.	Esquema de un cultivo continuo simple etapa	22
Figura 2.4.	Esquema de un cultivo continuo múltiple etapa	23
Figura 4.1.	Vía heteróloga de producción de etanol en <i>Escherichia coli</i> MS04	45
Figura 5.1.	Vías metabólicas interrumpidas y clonadas en la cepa homoetanológica <i>Escherichia coli</i> MS04	48
Figura 5.2.	Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en condiciones no aireadas en medio mineral con glucosa, con y sin acetato de sodio	49
Figura 5.3.	Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcares, y producción de etanol de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en condiciones no aireadas en medio mineral con xilosa, glucosa y acetato de sodio	52
Figura 5.4.	Consumo de azúcares, producción de biomasa y etanol, y productividad volumétrica de etanol de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivo continuo simple etapa en función de la velocidad de crecimiento bajo condiciones no aireadas	55
Figura 5.5.	Esquema de un cultivo continuo en dos etapas operando a un mismo flujo de alimentación y de salida	58
Figura 5.6.	Productividades volumétricas y rendimientos de etanol de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivo continuo en dos fases	62
Figura 5.7.	Actividades enzimáticas específicas de las enzimas etanológicas Pdc y AdhB de <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivo continuo en dos fases	63
Figura 5.8.	Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcares y producción de etanol de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en medio mineral adicionado con xilosa, glucosa y acetato de sodio usando bajos niveles de aireación	66
Figura 5.9.	Escalamiento de la producción de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04 en medio mineral suplementado con xilosa glucosa y acetato de sodio usando el k_{La} como criterio de escalamiento	68

Figura 5.10.	Concentraciones de biomasa, azúcares residuales y etanol en el estado estable en función de la tasa de dilución, primera etapa de un cultivo múltiple etapa limitado por oxígeno	70
Figura 5.11.	Concentraciones de biomasa, azúcares residuales y etanol en el estado estable de la segunda etapa de un cultivo múltiple etapa limitado por oxígeno ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$) a diferentes tasas de dilución	71
Figura 5.12.	Productividades volumétricas y rendimientos de etanol de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivos continuos en dos etapas microaireados en medio mineral con xilosa, glucosa y acetato de sodio	73
Figura 5.13.	Comparación de datos experimentales y simulados con el modelo de Aiba y Shoda de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivo en lote y continuo simple etapa microaireados ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$)	75
Figura 5.14.	Velocidad de crecimiento de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en función de la concentración de la forma no disociada de ácido acético obtenida al variar las concentraciones de acetato de sodio o el pH del medio de cultivo	81
Figura 5.15.	Velocidades específicas de crecimiento relativas de las cepas <i>Escherichia coli</i> MG1655 y MS04 en función de la concentración de ácido acético y acetato de sodio bajo condiciones aireadas y no aireadas	87
Figura 5.16.	Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>Escherichia coli</i> interrumpidas en el gen <i>arpA</i> ($\Delta midarpA$ y $\Delta arpA$) y en la región eliminada de 27.3 kpb ($\Delta reg 27.3$) en ausencia y presencia de acetato de sodio	93
Figura 5.17.	Cinéticas de consumo de azúcares y producción de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04 en hidrolizados detoxificados de paja de colza y poda de olivo en cultivo en lote	96

Índice de Tablas

	Página
Tabla 4.1. Cepas bacterianas utilizadas y construídas en este estudio	34
Tabla 4.2. Concentraciones de ácidos orgánicos utilizados para evaluar el efecto de la concentración de la forma no disociada del ácido correspondiente sobre el crecimiento y producción de etanol por <i>Escherichia coli</i> MS04	40
Tabla 5.1. Parámetros cinéticos de <i>Escherichia coli</i> MS04 en medio mineral con glucosa, xilosa o xilosa-glucosa en presencia o ausencia de acetato de sodio	51
Tabla 5.2. Crecimiento y producción de etanol de cepas etanológicas de <i>Escherichia coli</i> en medio rico y mínimo	53
Tabla 5.3. Parámetros en el estado estable de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivos continuos en dos fases	60
Tabla 5.4. Parámetros cinéticos de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en cultivo en lote con medio mineral y diferentes niveles de aireación	65
Tabla 5.5. Parámetros cinéticos de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04, en medio mineral y condiciones no aireadas, al evaluar diferentes concentraciones de acetato de sodio y valores de pH	79
Tabla 5.6. Parámetros cinéticos de la cepa <i>Escherichia coli</i> MS04 en medio mineral a pH 7.0 evaluando diferentes concentraciones de acetato, lactato o propionato	82
Tabla 5.7. Parámetros cinéticos promedio de las cepas <i>Escherichia coli</i> MG1655 y MS04 en medio mineral con acetato de sodio bajo condiciones aireadas	85

Resumen

Una cepa etanológica de *Escherichia coli* fue construida y se denominó *E. coli* MS04 ($\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH::Km^R$, $\Delta ldhA$, $P_{pflB}::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}$; evolucionada). Esta cepa tiene interrumpidos los genes para la producción de formiato, etanol, succinato, lactato y el transportador de xilosa dependiente de ATP respectivamente, además de tener integrados los genes *pdc* (piruvato descarboxilasa) y *adhB* (alcohol deshidrogenasa B) de *Zymomonas mobilis* para la producción de etanol bajo el control del promotor anaerobio del gen *pflB*. La cepa se caracterizó en presencia de glucosa, xilosa y una mezcla de ambos, con o sin acetato de sodio. En presencia de acetato se observó un incremento en todos los parámetros cinéticos, ya que la interrupción del gen *pflB* y las vías activas de consumo y excreción de acetato (*acs*, *ackA* y *pta*) pudieron promover la síntesis de acetil CoA.

Por otro lado, se llevaron a cabo cultivos continuos en simple etapa evaluando distintas tasas de dilución (D) en medio mineral adicionado con una mezcla xilosa-glucosa-acetato. Los resultados demostraron que no es posible el consumo total de azúcares usando una sola etapa, aun operando el sistema a bajas D, indicando que es necesario el uso de sistemas continuos en múltiples etapas para lograr este objetivo. En múltiples etapas, las concentraciones de biomasa y etanol incrementaron, sin embargo, estas concentraciones no fueron elevadas y tampoco se logró el consumo total de los azúcares (50 g/L). Debido a lo anterior, se llevaron a cabo cultivos continuos en dos fases, donde la primera etapa fue aireada, y la segunda no. Sin embargo, a pesar del consumo elevado de azúcares (>90 g/L), sólo se produjo una concentración de etanol baja, correspondiendo a un 27% del rendimiento teórico máximo, debido a la baja actividad enzimática de AdhB, la cual es sensible a oxígeno.

Con el objetivo de demostrar que el oxígeno limitaba la producción de etanol, se llevaron a cabo cinéticas con la cepa etanológica evaluando bajas velocidades de aireación (vvm). Esto comprobó que es favorable una baja transferencia de oxígeno ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$), pues en esta condición se incrementó sustancialmente la productividad volumétrica de etanol. Utilizando como criterio de escalamiento el k_{La} , fue posible escalar el proceso de fermentación de 1 litro a 10 litros. De esta manera, se llevaron a cabo cultivos continuos en dos etapas utilizando un k_{La} de 7.2 h^{-1} en cada etapa, y se logró el consumo total de los azúcares (50 g/L) en una sola etapa (D

= 0.05 h⁻¹); alcanzando una productividad volumétrica de etanol de 1.5 g/ L h en dos etapas al usar una D = 0.15 h⁻¹. Las constantes cinéticas estimadas en estos cultivos se evaluaron en un modelo cinético de producción e inhibición por etanol, encontrando una elevada inhibición por etanol en esta cepa. El modelo cinético y las constantes estimadas describen con una muy buena aproximación (coeficiente de correlación > 0.95) las cinéticas de crecimiento y producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04 en cultivo en lote y en el estado estable en cultivo continuo cuando se utiliza un programa simulador.

En otro estudio se determinó el efecto del ácido acético sobre el crecimiento y producción de etanol en la cepa *E. coli* MS04. Los resultados mostraron que la forma no disociada del ácido orgánico es la responsable de la toxicidad; sin embargo, la cepa *E. coli* MS04 es capaz de crecer en presencia de hasta 40 g/L de acetato de sodio bajo condiciones no aireadas y pH 7.0, y es más tolerante a acetato que la cepa parental *E. coli* MG1655. No obstante, en condiciones aireadas se observó que la tolerancia a acetato de ambas cepas es igual e incluso menor a la de la condición sin aireación. Un análisis genómico de la cepa *E. coli* MS04 confirmó que una eliminación de 24.7 kb en su cromosoma contribuye a mejorar el crecimiento y la tolerancia a acetato en esta cepa. La eliminación de 24.7 kb incluye genes relacionados con la respiración de nitrato, reparación de ADN alquilado, y síntesis de porina C, citocromos C, tiamina y ácido colónico.

Finalmente, se llevaron a cabo fermentaciones de hidrolizados hemicelulósicos de paja de colza y poda de olivo en biorreactores aireados ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$), y se demostró que la cepa *E. coli* MS04 es capaz de consumir los azúcares presentes en los hidrolizados (xilosa, glucosa, arabinosa, manosa y galactosa), y producir etanol con rendimientos mayores al 90% del teórico máximo, sin verse afectada por la presencia de acetato y formiato en los hidrolizados.

Abstract

An ethanologenic *Escherichia coli* strain was engineered and denominated *E. coli* MS04 ($\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH::Km^R$, $\Delta ldhA$, $PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}$; evolved), this strain has been genetically modified and have deleted the genes for the production of formate, ethanol, succinate, lactate and the ATP-dependent xylose transporter respectively, and has integrated the *pdc* and *adhB* genes (piruvate decarboxilase and alcohol dehydrogenase B) from *Zymomonas mobilis* for ethanol production under the anaerobic control of the *pflB* promoter. The strain was characterized in the presence of glucose, xylose and a mixture of both sugars, supplemented with or without sodium acetate. In the presence of acetate, an increase of all kinetic parameters was observed, since the deletion of *pflB* gene and active pathways of consumption and production of acetate (*acs*, *ackA* and *pta*) could promote the synthesis of acetyl CoA.

In other study, one-stage continuous cultures were carried out evaluating different dilution rates (D) in mineral medium supplemented with a mixture of xylose, glucose and acetate. The results showed that the total consumption of sugars was not possible with one-stage, even using low dilution rates, indicating that the use of multi-stage continuous cultures was necessary in order to achieve this objective. In multi-stage continuous cultures, the biomass and ethanol concentrations increased, however, those concentrations were not high and did not achieved the total consumption of sugars (50 g/L). Due to this, two-phase continuous cultures were carried out, where the first stage was aerated, and the second one did not. Despite the high consumption of sugars (>90 g/L), only a low concentration of ethanol was produced, corresponding to 27 % of the maximum theoretical yield. This low ethanol production was attributed to low *adhB* enzyme activity, which is sensitive to oxygen.

In order to demonstrate that oxygen limited the ethanol production, growth and ethanol production kinetics with the ethanologenic strain were carried out, assessing low aeration rates (vvm). These kinetics proved that a low oxygen transfer ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$) was favorable to increase the volumetric ethanol productivity. Using the k_{La} as scale-up criteria, scaling-up the ethanol fermentation process from 1 to 10 liters was possible. Hence, two-stage continuous cultures were carried out using a k_{La} of 7.2 h^{-1} in each stage. Under these conditions the total consumption of sugars (50 g/L) was possible in only one stage ($D = 0.05 \text{ h}^{-1}$); achieving a volumetric ethanol

productivity of 1.5 g/L h in two stages by using a $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$. The estimated kinetic constants in the continuous cultures were evaluated in a kinetic model of production and inhibition by ethanol, showing a high inhibition by ethanol in this strain. The kinetic model and the estimated constants described the growth and ethanol production kinetics of the strain *E. coli* MS04 in batch and continuous culture with good approximation when using a simulator program.

In another study the effect of acetic acid on cell growth and ethanol production of strain *E. coli* MS04 was determined. The results showed that the non-dissociated form of the organic acid is responsible of the toxicity; however, the strain *E. coli* MS04 is able to grow in the presence of up to 40 g/L of sodium acetate under non-aerated conditions and pH 7.0, and was more tolerant to acetate than the parental strain *E. coli* MG1655. Nevertheless, under aerated conditions the acetate tolerance of both strains was equal or even lower to the condition without aeration. Genomic analysis of strain *E. coli* MS04 confirmed that a chromosomal deletion of 24.7 kb generates the improved growth and acetate tolerance in this strain. This deletion comprises genes related to the respiration of nitrate, repair of alkylated DNA and synthesis of porin C, cytochromes C, thiamine, and colonic acid.

Finally, fermentation of hemicellulose hydrolysates of rapeseed straw and olive pruning were carried out in aerated fermentors ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$), and was shown that strain *E. coli* MS04 was able to consume the sugars in the hydrolysates (xylose, glucose, arabinose, mannose and galactose), and produced ethanol with yields higher than 90 % of the theoretical maximum, without being affected by the presence of acetate and formate in the hydrolysates.

I. Introducción

El continuo incremento en la demanda de combustibles a nivel mundial, la dificultad para extraer el petróleo, el alza de precios y consecuencias ambientales generadas por el uso de combustibles fósiles, ha ocasionado que se consideren fuentes alternas de energía tales como el bioetanol (Ingram et al. 1999). La mayor parte del bioetanol producido como combustible, es a través de la fermentación de zumos de caña de azúcar (en Brasil), de glucosa proveniente del maíz (en E.U.A.) y remolacha de azúcar (en Francia), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* para la etapa de fermentación (Mielenz, 2001; Von Sivers et al. 1994; Xu et al. 2005). Sin embargo, la producción de etanol a partir de estas materias primas no es conveniente en México, debido a la demanda de estos productos para consumo humano (Martínez et al. 2006). En este contexto, los residuos agroindustriales (lignocelulosa o biomasa) presentan una buena alternativa para la producción de etanol, los cuales son relativamente baratos y abundantes (Ingram et al. 1999; Galbe y Zacchi, 2002; Dien et al. 2003). Contrario a la producción de etanol a partir de sacarosa y almidón, la complejidad, composición heterogénea, estructura y grado de compactación de la lignocelulosa hacen más difícil la hidrólisis por acción enzimática o química. Aunado a esto, los microorganismos etanológicos silvestres como *S. cerevisiae* y la bacteria *Zymomonas mobilis*, no tienen la capacidad de metabolizar las pentosas que se encuentran en los hidrolizados de la fracción hemicelulósica de la biomasa (Ingram et al. 1998). A diferencia de estos microorganismos, las bacterias entéricas como *Escherichia coli* metabolizan un amplio intervalo de azúcares, y en condiciones de fermentación tienen la capacidad de convertir hexosas, pentosas y ácidos urónicos en piruvato, el cual es metabolizado a diversos ácidos orgánicos y una pequeña fracción de etanol (Böck y Sawers, 1996). En consecuencia, gran parte de los esfuerzos se han enfocado en la ingeniería metabólica de bacterias y levaduras que fermenten glucosa y xilosa a

etanol (Gray et al. 2006). A la fecha, se han construido cepas homofermentativas de *E. coli* que pueden convertir eficientemente todos los azúcares presentes en hidrolizados de hemicelulosa a etanol usando cultivos por lote sin aireación (Martínez et al. 2007), y cepas derivadas de *S. cerevisiae* capaces de metabolizar xilosa en etanol con el uso de aireación, pero con bajas productividades volumétricas (Kuyper et al. 2005).

A la fecha todavía existen retos importantes para obtener procesos que se puedan implementar a escala comercial con altos rendimientos y productividades volumétricas de etanol usando hidrolizados lignocelulósicos para hacer el proceso económicamente viable (Hamelinck et al. 2005; Winters, 2011). De esta manera es necesario desarrollar microorganismos que sean capaces de metabolizar todos los azúcares disponibles en los hidrolizados (hexosas y pentosas) y tolerar los compuestos tóxicos (ácidos orgánicos, aldehídos y fenoles) generados durante la hidrólisis (Zaldivar et al. 1999, Zaldivar e Ingram, 1999, Gírio et al. 2010; Dien et al. 2003). Además de lo anterior, es conveniente emplear estrategias de cultivo para: incrementar la producción y productividad de etanol; disminuir el efecto de represión catabólica e inhibición por etanol; y mejorar los rendimientos de conversión de azúcares hacia etanol; en particular, por medio del uso de cultivos en lote y/o continuos que conduzcan a un mejor entendimiento y desarrollo de etapa de fermentación. En este estudio se describe la construcción y aplicación de una cepa de *E. coli* homoetanológica capaz de producir etanol a partir de hexosas y pentosas, en presencia de acetato, tanto en cultivo en lote y continuo, alcanzando rendimientos producto/sustrato mayores al 85% y productividades volumétricas de etanol mayores a 1 g/L h en medios minerales suplementados con glucosa, xilosa y acetato. Así mismo se presenta la utilización de la cepa en la fermentación de azúcares provenientes de hidrolizados hemicelulósicos de paja de colza y poda de olivo.

II. Antecedentes

2.1 Metabolismo de *Escherichia coli* en condiciones anaerobias: Etanol como uno de los productos de fermentación

El etanol es uno de los productos finales de fermentación generados por *E. coli* en condiciones anaerobias, sin embargo, el rendimiento con respecto al sustrato consumido (azúcares) es muy bajo ($0.042 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{Glc}}$) debido a la formación de otros productos finales como lactato, succinato, formiato y acetato, y también a que la vía de producción de etanol no está balanceada por la formación de dos moléculas de NAD^+ por la enzima etanol deshidrogenasa (Adh); produciendo con la alcohol deshidrogenasa nativa sólo una molécula de etanol por cada molécula de glucosa (Böck y Sawers, 1996). De esta manera la vía homóloga de producción de etanol a partir de acetyl CoA en *E. coli* no puede dirigir el flujo de carbono hacia una fermentación homoetanológica por la necesidad de 2 moléculas de NADH por molécula de etanol producida (Kim et al. 2007). En cambio *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* convierten piruvato a etanol utilizando piruvato descarboxilasa (Pdc) y alcohol deshidrogenasa (AdhA y/o AdhB) consumiendo una molécula de NADH por cada molécula de etanol producida (Dien et al. 2003).

A pesar de esto, desde hace años se han llevado a cabo grandes esfuerzos, en el área de ingeniería de vías metabólicas de bacterias, para generar cepas de *E. coli* que produzcan etanol como único producto de fermentación a partir de varios azúcares (Ingram y Conway, 1988; Yomano et al. 1998; Gray et al. 2006; Orencio-Trejo et al. 2010), con una estrategia general que consiste en eliminar vías metabólicas que compiten por la fuente de carbono bajo condiciones anaerobias (Yomano et al. 1998; Orencio-Trejo et al. 2008; Zhou et al. 2008¹) e integrar en el cromosoma de las células o en plásmidos los genes que codifican para las enzimas piruvato

descarboxilasa (*pdC*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Zymomonas mobilis* (Alterthum e Ingram 1989; Ohta et al. 1991; Hespell et al. 1996), para la obtención de rendimientos de etanol mayores al 90% del teórico máximo en medios de cultivo complejos (Ohta et al. 1991; Huerta et al. 2008; Leite et al. 2000) y en medios minerales (Martinez et al. 2007; Yomano et al. 1998; Orenco-Trejo et al. 2008).

2.2 Hidrolizados lignocelulósicos como fuente de azúcares para la producción de etanol

Como se ha mencionado antes, la producción de etanol se puede llevar a cabo a partir de residuos de lignocelulosa; polímeros que representan cerca del 50% de la biomasa en la tierra y se encuentra en residuos agrícolas (paja de trigo, tallos de maíz, bagazo de caña, residuos de soya, entre otros), industriales (papel, aserrín, etc.), forestales y municipales. Este polímero se compone de tres principales fracciones: celulosa (40-50%), constituida de moléculas de anhidrocelulosa unidas por enlaces β (1,4)-glucosídicos; hemicelulosa (25-35%), un heteropolímero ramificado que contiene hexosas, pentosas y ácidos urónicos (Ingram et al., 1999; Saha, 2003; Gray et al. 2006); y lignina (15-20%), el cual es un polímero aromático constituido por monómeros metoxifenólicos.

A partir de la lignocelulosa, se pueden obtener azúcares fermentables de la fracción hemicelulósica por diversos métodos, siendo el tratamiento químico con ácidos diluidos (1-2% p/v) a temperaturas moderadas (121 - 160°C) el más utilizado (Sun y Cheng, 2002) con respecto a los tratamientos físicos (pirolisis y disminución de tamaño) o fisicoquímicos (explosión con vapor o amonio). Con estos métodos se obtienen jarabes de hemicelulosa que pueden contener hasta 100 g/L de azúcares, de los cuales, aproximadamente, un 85% son pentosas (xilosa y

arabinosa) y un 15% son hexosas (principalmente glucosa), además de presentar concentraciones de ácido acético y ácido fórmico de 3-5 y 0-1 g/L respectivamente y otros compuestos tóxicos como furfural e hidroximetil-furfural en menores concentraciones (Martínez et al. 2001). De esta manera, para la producción de etanol a partir de residuos de lignocelulosa, es necesario que los microorganismos etanológicos sean capaces de consumir todos los azúcares que derivan de sus fracciones y presentar tolerancia a las concentraciones de compuestos potencialmente tóxicos. Al respecto, *E. coli* presenta algunas ventajas sobre otros microorganismos etanológicos como levaduras y otras bacterias, por su amplio rango de uso de sustratos como glucosa, manosa, galactosa, fructosa, xilosa y arabinosa, entre otros (Jarboe et al. 2007; Orencio-Trejo et al. 2010); no requiere la adición de factores complejos de crecimiento (Böck y Sawers, 1996); además de que es más resistente a compuestos tóxicos producidos durante la hidrólisis ácida de hemicelulosa (Zaldivar et al. 1999).

2.3 Cepas recombinantes por ingeniería metabólica de *E. coli* para la producción de etanol

Los requerimientos de producción de etanol a partir de azúcares provenientes de residuos agroindustriales indican que un microorganismo debería ser: capaz de consumir todos los azúcares presentes en los jarabes hemicelulósicos, y de ser posible de forma simultánea; poseer una tolerancia a etanol relativamente mayor a 40 g/L; presentar rendimientos de conversión de azúcares a etanol mayores al 90% del teórico máximo; y productividades volumétricas mayores a 1 g/L h (Dien et al. 2003). Por medio de técnicas de ingeniería metabólica y de evolución metabólica se han diseñado diversas cepas de *E. coli* para la producción de etanol. Las primeras cepas fueron transformadas con plásmidos que portaban el operón PET, el cual contiene los

genes de la vía metabólica para la producción de etanol por *Zymomonas mobilis*, que incluye los genes que codifican para las enzimas piruvato descarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) que permite producir dos moléculas de etanol por cada molécula de glucosa consumida en una forma balanceada en relación al par redox NAD-NADH (Figura 2.1).

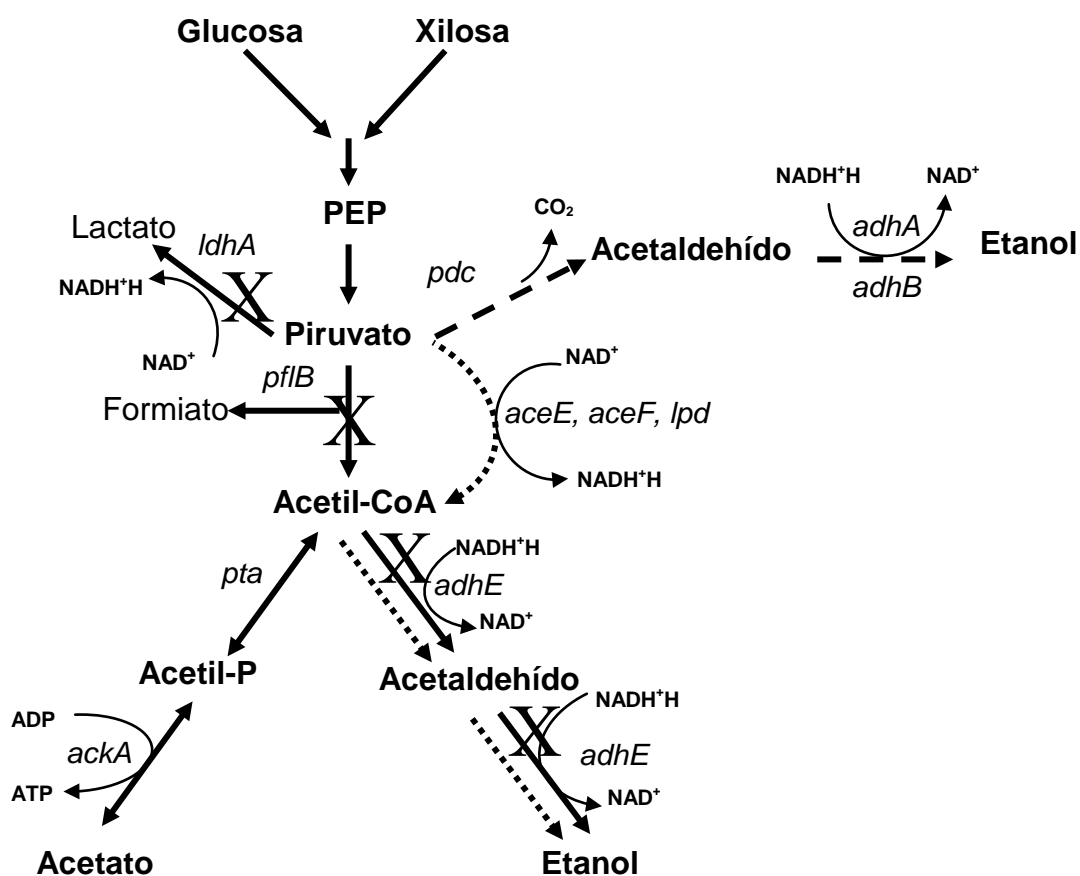


Figura 2.1. Vías metabólicas en condiciones de fermentación en la cepa parental *E. coli* MG1655 (líneas sólidas) y cepas etanológicas diseñadas. Los genes se indican en itálicas; las vías metabólicas interrumpidas para evitar la formación de subproductos se señalan con X. La vía metabólica codificada en el operón *PET* (*pdc* y *adhB*) además de la isoenzima codificada por el gen *adhA* se muestra con líneas discontinuas; y la vía de producción de etanol en *E. coli* sin genes heterólogos (*aceEF-lpd* y *adhE*) se indica en líneas punteadas.

La enzima Pdc de *Z. mobilis* permite canalizar el piruvato a etanol en cepas modificadas de *E. coli*, debido a que Pdc tiene la K_m más baja para piruvato (0.4 mM) que todas las enzimas que compiten por este metabolito en condiciones de fermentación. Estas cepas producen etanol como producto principal de fermentación (Ingram y Conway, 1988; Neale et al. 1988; Alterthum y Ingram, 1989), sin embargo, las cepas recombinantes basadas en transformaciones con plásmidos generalmente son menos estables que las que llevan genes heterólogos integrados en el cromosoma.

Con respecto a cepas que tienen integrado genes heterólogos en su cromosoma, la cepa denominada *E. coli* KO11 (derivada de *E. coli* W) fue desarrollada por Ingram y colaboradores (Ohta et al. 1991) integrando el operón *PET* en el cromosoma de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *pflB* de *E. coli* junto con un marcador de resistencia al antibiótico cloramfenicol (Cm); el promotor del gen *pflB* se escogió debido a que este gen se expresa en niveles elevados durante el crecimiento en condiciones anaerobias en *E. coli* (12 a 14 veces más; Sawers y Bock, 1988; Sawers y Bock, 1989); la expresión de los genes etanologénicos se incrementó después de varias selecciones por resistencia a altos niveles de Cm. La cepa KO11 también tiene una mutación en el gen *frdB* para prevenir la producción de succinato. En fermentaciones en cultivo lote usando *E. coli* KO11 en medio rico (Luria Bertani; LB) con 100 g/L de glucosa; y 80 g/L de xilosa, se obtuvo una concentración de etanol de 54 y 42 g/L, respectivamente. La productividad volumétrica de etanol para glucosa y xilosa fue de 0.76 y 0.86 g/ L h, respectivamente, con rendimientos de etanol mayores al 100 %, excediendo el rendimiento teórico máximo (0.51 g de etanol/ g de azúcares) debido al metabolismo de algunos nutrientes como aminoácidos en el medio LB (Ohta et al. 1991).

E. coli KO11 ha sido evaluada para la producción de etanol a partir de diversos residuos agroindustriales. A partir de suero de leche (58 g/L de azúcares) se obtuvo 38% del rendimiento de etanol sin la adición de nutrientes, pero suplementando el suero con extracto de levadura y elementos traza el rendimiento de etanol incrementó a 100% (Leite et al. 2000). Dien et al. (1997) usando hidrolizado de rastrojo de maíz (90 g/L de azúcares) adicionado con componentes del medio LB o mezclas de azúcares (100 g/L) alcanzaron rendimiento de etanol de 80 a 88% respectivamente y productividades volumétricas de etanol de 0.38 y 0.66 g/ L h con un consumo parcial de xilosa. Takahashi et al. (2000) llevaron a cabo la fermentación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (68 g/L de azúcares) suplementado con triptona y extracto de levadura, obteniendo un rendimiento de etanol del 92% y una productividad volumétrica de etanol de 0.66 g/ L h; por otro lado, Barbosa et al. (1992) utilizaron hidrolizado de *Pinus sp.* con 72 g/L de azúcares, produjeron etanol con un rendimiento del 85 al 91% del rendimiento teórico (0.8 g/ L h); y como estos, otros hidrolizados de diversos residuos agrícolas se han fermentado a etanol por *E. coli* KO11 (Asghari et al. 1996). Como se puede observar, en todas estas pruebas usando hidrolizados de hemicelulosa o mezclas de azúcares que simularon hidrolizados fue necesario la adición de nutrientes complejos para lograr un mayor consumo de azúcares y producir elevadas concentraciones de etanol, no obstante, cuando *E. coli* KO11 crece en medio mineral, el rendimiento de etanol es menor al 70% del teórico máximo y la productividad volumétrica de etanol es la mitad de la obtenida con medio LB (Huerta et al. 2008), lo cual es una desventaja para la cepa dado que los nutrientes del este medio tienen un elevado costo para ser usados en la producción industrial de etanol.

Una cepa derivada de *E. coli* KO11 es *E. coli* LY160 la cual tiene interrumpidos todos los genes que codifican para las rutas de regeneración de NAD^+ y tiene insertado al azar, por medio de

transposones, la vía completa de producción de etanol de *Z. mobilis* (*pdh*, *adhA* y *adhB*) en cromosoma (Yomano et al. 2008); después de la selección en medio mineral suplementado con xilosa, se aisló una nueva cepa productora de etanol con los genes de la vía heteróloga integrados dentro del gen ribosomal *rrlE* el cual se expresa en niveles elevados en *E. coli*, ya sea a elevadas o bajas velocidades de crecimiento. Al llevar a cabo fermentaciones usando el medio mineral NBS con 1 mM de betaína (Martínez et al. 2007) y 90 g/L de xilosa, los resultados mostraron una producción de etanol y rendimiento similar a la de *E. coli* KO11 en medio LB con rendimientos de etanol del 95% del teórico máximo y una productividad volumétrica de etanol de 0.61 g/ L h (Yomano et al. 2008). Otra cepa etanológica sin genes heterólogos se derivó de *E. coli* K12 por mutagénesis química, esta cepa denominada *E. coli* SE2378 (*ΔpflB* y *ΔldhA*) es capaz de crecer bajo condiciones anaerobias debido a que tiene una mutación en el operón piruvato deshidrogenasa (*pdh*) que activa a este complejo enzimático en condiciones anaerobias (Kim et al. 2007). *E. coli* SE2378 puede generar una molécula adicional de NADH a partir de piruvato (por medio de la Pdh activa) y producir dos moléculas de etanol por cada molécula de glucosa consumida (en forma balanceada) bajo condiciones anaerobias a partir de acetyl-CoA y utilizando la enzima alcohol deshidrogenasa E (AdhE) (Figura 2.1). En medio LB adicionado con glucosa (50 g/L), *E. coli* SE2378 produjo 22 g/L de etanol en 72 h con una productividad específica de etanol (q_P) de 1.34 g/ g_{células} h, y una q_P de 2.24 g/ g_{células} h para el caso de xilosa (50 g/L), con un rendimiento del 82% en ambos casos, sin embargo la cepa SE2378 requiere acetato y glutamato (debido al limitado flujo de acetyl-CoA a 2 -cetoglutarato) para su crecimiento en medio mineral con glucosa (Kim et al. 2007).

La cepa *E. coli* SZ420, derivada de *E. coli* B, es similar a *E. coli* SE2378 la cual tiene interrumpidos los genes codificando para la producción de succinato (*frdABCD*), lactato (*ldhA*),

acetato (*ackA*) y formiato (*pflB*), con la diferencia que el operón *pdh* (*aceEF-lpd*) fue altamente expresado bajo el control del promotor de *pflB* de *E. coli* lográndose un incremento en la expresión anaeróbica de *aceE*, *aceF* y *lpd* de 24, 18 y 30 veces respectivamente con respecto a la cepa parental *E. coli* B, y un incremento de 33 veces en la actividad enzimática del complejo Pdh con respecto a la cepa parental en condiciones anaerobias. Por otro lado, la actividad anaerobia de Pdh de la cepa *E. coli* SZ420 fue 64% mayor que la actividad aerobia de la cepa parental. *E. coli* SZ420 es capaz de metabolizar glucosa o xilosa (50 g/L) a etanol (19 g/L) en medio LB con un rendimiento de etanol con respecto al teórico máximo del 90% en 192 h; sin embargo, la cepa SZ420 presenta una fase de crecimiento retardado más larga que la cepa parental y los azúcares no son consumidos totalmente después de 192 h (Zhou et al. 2008a).

Otras cepas etanologénicas han sido desarrolladas también usando el operón PET en plásmidos; estas cepas denominadas FBR (Fermentation Biochemistry Research Unit) son derivadas de *E. coli* K12. Las cepas FBR son incapaces de crecer en condiciones anaerobias debido a las interrupciones en los genes *pflB* y *ldhA*, sin embargo, al ser transformadas con el plásmido pLOI297 recuperan su capacidad de crecer y producen etanol como el principal producto de fermentación (Dien et al. 2003). Estas cepas transformadas (FBR3, FBR4 y FBR5) mantienen selectivamente el plásmido pLOI297 en un 93-95% cuando crecen anaeróbicamente, producen etanol a partir de glucosa, xilosa y arabinosa usando medio rico con rendimientos de etanol alrededor del 91% del teórico máximo y presentan una buena estabilidad en cultivos en lote después de varias transferencias (Dien et al. 1998; Dien et al. 1999; Dien et al. 2000). Las cepas FBR también han sido utilizadas para producir etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos adicionados con componentes del medio LB, por ejemplo, la cepa FBR3 se utilizó para fermentar hidrolizados de rastrojo de maíz con concentraciones de azúcares de 66 g/L, obteniéndose un

rendimiento de etanol del 92% relativo al teórico máximo y una productividad volumétrica de 0.71 g/ L h. Así mismo, las cepas FBR4 y FBR5 se han utilizado para fermentar hidrolizados suplementados con componentes del medio LB conteniendo un total de 85 g/L de azúcares, logrando rendimientos de etanol del 78 y 90% del teórico máximo respectivamente, y una productividad volumétrica de etanol de 0.77 g/ L h para el caso de la cepa FBR5 (la cual fue superior a la de la cepa FBR4), no obstante ambas cepas no fueron capaces de consumir toda la xilosa presente en los hidrolizados (Dien et al. 2000). En comparación a cepas modificadas de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* para producir etanol a partir de pentosas y hexosas en medios ricos, las cepas etanológicas de *E. coli* presentan elevadas productividades volumétricas y rendimientos de etanol con respecto al teórico máximo a partir de hidrolizados de lignocelulosa o medios que contienen mezclas de hexosas, pentosas y compuestos inhibitorios (Yomano et al. 1998); sin requerir en algunos casos la adición de factores complejos de crecimiento que se encuentran generalmente en medios ricos como LB.

2.3.1 Estabilidad de cepas modificadas de *E. coli* para la producción de etanol

Para la producción comercial de etanol a partir de hidrolizados de lignocelulosa es conveniente que las cepas etanológicas de *E. coli* mantengan un alto grado de estabilidad genética después de transcurrir un largo tiempo de operación de los cultivos y por lo tanto un gran número de generaciones. Como se describe en la sección anterior, se ha demostrado que las cepas recombinantes de *E. coli*, como *E. coli* KO11, son buenos biocatalizadores para la producción de etanol a partir de pentosas e hidrolizados de lignocelulosa con elevados rendimientos. Sin embargo, cuando *E. coli* KO11 y otras cepas transformadas con el plásmido pLOI297 son

transferidas varias veces en cultivo en lote (Lawford y Rousseau, 1995) o cultivadas en cultivo continuo (Dumsday et al. 1999), estas cepas muestran inestabilidad para la producción de etanol, disminuyendo su rendimiento de etanol con respecto al tiempo, debido a la ausencia de la presión de selección en el medio de cultivo, que en este caso es la resistencia a un antibiótico (Cm; claramfenicol) conferida por el gene que está clonado junto a los genes etanológicos. También se ha observado inestabilidad genética en KO11 cuando es cultivada en fuentes de carbono diferentes a la glucosa, como las pentosas xilosa y arabinosa. Cuando *E. coli* KO11 es crecida en medio LB con glucosa y transferida varias veces, el rendimiento de etanol decrece alrededor del 50% del teórico máximo en solo 12 generaciones (Lawford y Rousseau, 1995); estos mismos autores, utilizando *E. coli* B (pLOI297) y *E. coli* KO11 en cultivo continuo limitado por glucosa o xilosa, con una tasa de dilución de 0.14 h^{-1} y 0.07 h^{-1} respectivamente (25 g/L de azúcares), observaron que ambas cepas mostraron una rápida pérdida de su etanologenicidad con y sin la presencia de antibióticos en el medio de alimentación; incluso la etanologenicidad de la cepa *E. coli* KO11 se perdió cuando la concentración de Cm se incrementó de 40 a 300 mg/L (Lawford y Rousseau, 1996).

En otra investigación, Dumsday et al. (1999) evaluaron la estabilidad etanológica de *E. coli* KO11 en cultivos en lote y continuos, encontrando que esta cepa fue estable en glucosa, manosa, xilosa y galactosa en cultivo en lote (12 generaciones aproximadamente), incluso en la ausencia del antibiótico selectivo; sin embargo, en cultivo continuo sólo en presencia de glucosa la cepa fue estable, ya que en manosa, xilosa y mezclas xilosa-glucosa perdió su capacidad etanológica después de 10 días. El crecimiento en placa (con medio LB conteniendo $600 \mu\text{g/mL}$ de Cm) de células provenientes de cultivo continuo con xilosa (32 días) demostró que existió pérdida de etanologenicidad en las células a pesar de retener una elevada resistencia a

Cm (Dumsday et al. 1999). Se ha sugerido que la reducción o pérdida de etanogenicidad de *E. coli* KO11 en cultivo continuo se debe a: la inestabilidad genética o la reducción del nivel de expresión de los genes etanogénicos y en consecuencia a la baja actividad de las enzimas que dirigen el flujo de carbono hacia etanol (Lawford y Rousseau 1995; Martin et al. 2006); por pérdida de los genes etanogénicos (Lawford y Rousseau, 1996); o incrementos sustanciales en la producción ácidos orgánicos como el ácido acético (Dumsday et al. 1999), lo cual sucede cuando la célula metaboliza estos azúcares y activa o desregula otras vías de producción de metabolitos.

Por otro lado, usando la cepa *E. coli* FBR5, Martin et al. (2006) llevaron a cabo cultivos en lecho fluidizado o con células inmovilizadas, observando que la pérdida de plásmido en la cepa FBR5 incrementó en células en suspensión, mientras que en células inmovilizadas permaneció sin cambios siendo superior a los resultados con la cepa KO11. Esta cepa (FBR5) tiene la desventaja que bajo condiciones aerobias y en la ausencia de antibiótico en el medio de cultivo el plásmido pLOI297 se pierde (Martin et al. 2006).

2.4. Efecto de compuestos inhibitorios presentes en hidrolizados de hemicelulosa sobre la etanogenicidad de cepas recombinantes de *E. coli*

Como se menciona anteriormente, el uso de residuos hemicelulósicos para la producción de etanol tiene muchas ventajas en costos y abundancia, sin embargo, durante la hidrólisis con ácido diluido (y también con otros métodos menos usados) se generan compuestos tóxicos como: ácidos orgánicos, aldehídos, derivados de furanos y alcoholes aromáticos (Figura 2.2) que inhiben el crecimiento celular y la producción de etanol en las cepas etanogénicas (Zaldivar et

al. 2001; Klinke et al. 2004). Se ha encontrado que en todos los casos el orden de toxicidad es directamente relacionado a la hidrofobicidad de los compuestos (Ingram, 1990; Klinke et al. 2004). Algunos grupos se han enfocado a investigar los efectos de estos inhibidores sobre cepas etanológicas de *E. coli*. Zaldivar et al. (1999) evaluaron los efectos de aldehídos aromáticos que se producen a partir de la lignina y furanos como furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), 4-hidroxibenzaldehído, siringaldehído, y vainillina sobre el crecimiento y producción de etanol por *E. coli* KO11 y LY01 en medio LB (xilosa 50 g/L), encontrando que la toxicidad de todos los aldehídos, fue mayor que la toxicidad del furfural y 5-HMF. Estos investigadores también encontraron que la toxicidad es aditiva cuando los aldehídos se evaluaron en combinaciones binarias, siendo el furfural el único aldehído que causó una fuerte inhibición en la producción de etanol cuando se evaluó solo, sin embargo, *E. coli* KO11 y LY01 tiene la habilidad de transformar furfural a un compuesto menos tóxico como el alcohol furfurílico (Zaldivar et al. 2000). Al evaluar el efecto de la temperatura (30°C, 35°C o 40°C) sobre la toxicidad de los aldehídos, esta mostró una relación inversa con la toxicidad; excluyendo al furfural, cuya toxicidad fue mínima a 35°C; el pH del medio de cultivo también mostró un efecto inverso con la toxicidad de los aldehídos en el rango de 6.0 a 8.0, excepto nuevamente para el furfural, el cual fue menos tóxico a pH 7.0.

Zaldivar e Ingram (1999) también evaluaron el efecto de diversas concentraciones de ácidos orgánicos como ferúlico, gálico, siríngico, 4-hidroxibenzoico, vanílico, acético, fórmico, furoico, levulínico y caproico, los cuales son derivados de la lignina, acetilxilano y la destrucción de azúcares (Figura 2.2; Zaldivar et al. 2000), sobre el crecimiento y producción de etanol de *E. coli* LY01. Se encontró que la combinación de ácidos fue aditiva para inhibir el crecimiento, siendo el ácido caproico el ácido orgánico más tóxico evaluado, seguido por los ácidos ferúlico,

furoico y 4-hidroxibenzoico. Los ácidos orgánicos no inhibieron la glucólisis, ni afectaron la membrana totalmente, pero inhibieron el crecimiento afectando así la producción de etanol; el pH y la temperatura mostraron una relación inversa con la toxicidad de los ácidos orgánicos en el rango de prueba de 6.0 a 8.0 y de 30°C a 40°C respectivamente. Al respecto, Peterson e Ingram, (2008) postularon que la inhibición de ácidos orgánicos sobre el crecimiento y producción de etanol es debida al colapso del gradiente iónico y al incremento de la concentración intracelular de aniones.

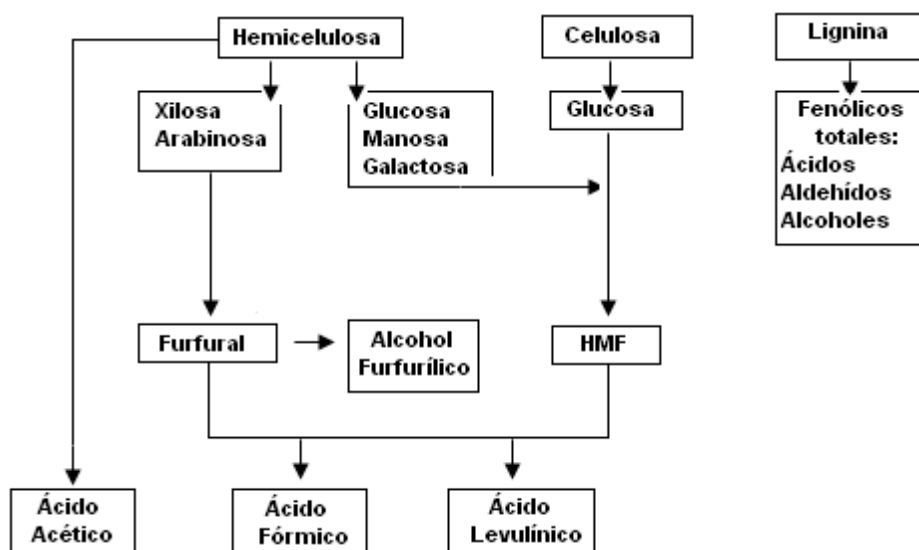


Figura 2.2. Azúcares y compuestos inhibidores producidos durante la hidrólisis de lignocelulosa.

HMF: Hidroximetilfurfural.

Por otro lado, al investigar el efecto de algunos alcoholes derivados de la lignina y de la destrucción de azúcares como el catecol, alcohol coniferílico, alcohol furfurílico, guaiacol, hidroquinona, metilcatecol y alcohol vainílico, estos mostraron menos toxicidad que los ácidos orgánicos o aldehídos correspondientes en base molar, siendo el metilcatecol el alcohol más tóxico. Estos alcoholes tuvieron una inhibición aditiva en combinaciones binarias y la

temperatura y pH mostraron poco efecto sobre la toxicidad de la cepa LY01, siendo menor la toxicidad a 35°C para todos los alcoholes, excepto el alcohol furfúrico (30°C). Con estos resultados es claro que la toxicidad de los hidrolizados de hemicelulosa resulta de una combinación de compuestos más que de un solo compuesto tóxico (Zaldivar et al. 2000) y a pesar de los múltiples efectos causados por ácidos orgánicos, aldehídos y alcoholes sobre el crecimiento y producción de etanol de *E. coli*, las cepas etanológicas de *E. coli* resisten más estos efectos que otras cepas etanológicas como *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* (Zaldivar et al. 1999; Zaldivar e Ingram, 1999; Klinke et al. 2004).

2.4.1 Efecto del ácido acético como inhibidor del crecimiento celular derivado del proceso de obtención de hidrolizados de hemicelulosa

El más abundante de los compuestos tóxicos presente en los hidrolizados hemicelulósicos es sin duda el ácido acético (Martinez et al. 2001; Klinke et al. 2004; Mills et al. 2009), el cual es producido por la desacetilación de la hemicelulosa. La concentración de ácido acético en los hidrolizados de hemicelulosa puede estar en el rango de 1.5 a 13 g/L (Takahashi et al. 1999; Martinez et al. 2001; Mills et al. 2009). El ácido acético dificulta el crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* en concentraciones entre 0.5 y 5 g/L (Eiteman y Altman, 2006; Zaldivar y Ingram, 1999). Ha sido propuesto que el daño celular causado por ácidos orgánicos, tal como el ácido acético, es principalmente debido a la concentración de su forma no disociada (CH_3COOH), la cual depende de la concentración del acetato y el pH del medio de cultivo (Presser et al., 1997; Warnecke y Gill, 2005). Se han reportado algunas estrategias para limitar la acumulación de acetato en el medio de cultivo o reducir su efecto negativo sobre el crecimiento y

la producción de metabolitos de interés en *E. coli* (Eiteman y Altman, 2006). Algunas de las estrategias más importantes incluyen la remoción de acetato del medio de cultivo durante la fermentación por diálisis (Nakano et al. 1997; Fuchs et al. 2002); el uso de fuentes de carbono diferentes a la glucosa, tales como la fructosa, que ocasionan una reducción del sobreflujo de acetato (Aristidou et al. 1999); la adición de aminoácidos como metionina y glicina al medio de cultivo reducen la producción de acetato (Han et al. 1993), así mismo un incremento en la concentración intracelular de metionina permite reducir el efecto tóxico del acetato (Roe et al. 2002); la interrupción de genes que codifican para enzimas que canalizan el flujo de carbono a acetato bajo condiciones anaerobias, tal como *pta* y *ackA* (fosfotransacetilasa y acetato cinasa, respectivamente (Hahm et al. 1994), entre otros.

2.5 Cultivo continuo para la producción de etanol con diversas cepas etanológicas

El cultivo continuo en simple etapa (CCSE), cuya operación se muestra en la figura 2.3, es un sistema abierto en el cual existen flujos de entrada y salida con medio de cultivo estéril (sustratos) y medio de cultivo, parcial o totalmente consumido, con biomasa y producto generados respectivamente. En este sistema se permite un crecimiento celular, consumo de sustratos y producción de metabolitos en equilibrio dinámico (Figura 2.3). Así, la velocidad específica de crecimiento celular (μ) es igual a la velocidad a la cual el cultivo es diluido (D) alcanzando un estado estable, el cual se define como una condición en un sistema en la que su composición permanece constante con respecto al tiempo a pesar de que un flujo de energía o materia pase a través de él. Este sistema de operación del CCSE es conocido como quimiostato (Hoskisson y Hobbs, 2005).

Los cultivos en lote y continuos son ampliamente utilizados en la producción industrial de etanol (Laluce et al. 2002); estos últimos tienen la ventaja de: mantener estados estables mediados por la tasa a la cual se diluye el sistema; eliminar tiempos muertos entre fermentaciones; alcanzar productividades volumétricas mayores que los cultivos en lote (Hilay et al. 1994) y por lo tanto se requiere de fermentadores con una menor capacidad volumétrica para lograr la misma producción (Vasconcelos et al. 2004; Bayrock e Ingledew, 2005); sin embargo estos sistemas presentan desventajas como una mayor susceptibilidad a contaminación y la posibilidad de generar mutantes y revertantes cuando se operan por un tiempo prolongado (Bayrock e Ingledew, 2005).

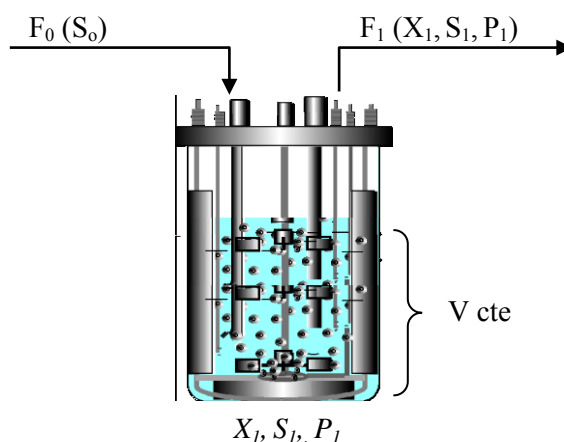


Figura 2.3. Esquema de un cultivo continuo simple etapa (CCSE). F_0 flujo de alimentación con medio estéril; F_1 flujo de salida. S_0 sustratos en el medio de alimentación; X_1, S_1, P_1 biomasa generada, sustratos consumidos y etanol producido respectivamente en el estado estable; V_{cte} volumen constante.

Entre las configuraciones ampliamente utilizadas en cultivo continuo para incrementar la productividad de metabolitos y biomasa se encuentran los cultivo continuo en múltiples etapas

(CCME), en el cual varios biorreactores se alinean en serie (Figura 2.4) y el flujo de salida del primer reactor constituye la alimentación de segundo y así sucesivamente (Bayrock e Ingledew, 2005; Nishiwaki, 1997), por consiguiente el CCME tiene un amplio grado de flexibilidad en configuraciones y modos de operación comparado con un CCSE.

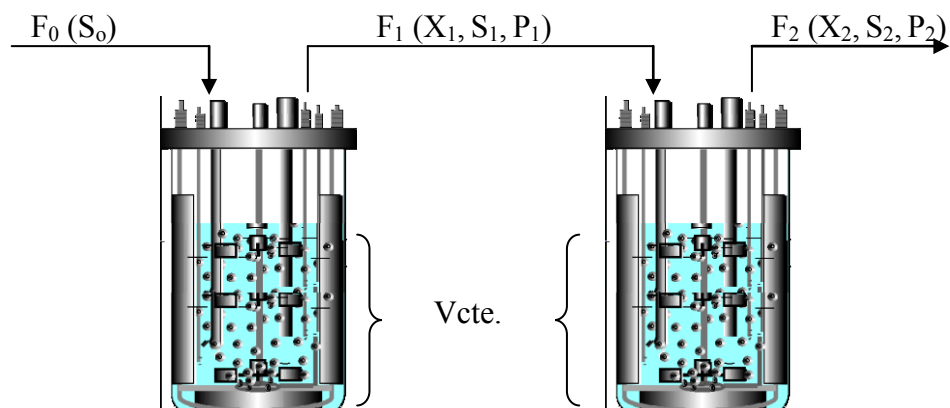


Figura 2.4. Esquema de un cultivo continuo múltiple etapa (CCME). F_0 flujo de alimentación con medio estéril; F_1 , F_2 flujo de salida de la primera y segunda etapa respectivamente. S_0 medio de cultivo estéril alimentado a la primera etapa; X_1 , S_1 , P_1 biomasa, sustrato residual y etanol producido respectivamente en el estado estable de la primera etapa. X_2 , S_2 , P_2 biomasa, sustrato residual y concentración de etanol respectivamente en el estado estable de la segunda etapa. V_{cte} volumen constante.

Otra configuración dentro de los CCME es tener varios flujos de alimentación que alimenten a cada uno de los reactores, permitiendo distribuir las concentraciones de sustrato en cada reactor para reducir la inhibición por sustrato si existiera. Además se puede trabajar a una elevada tasa de dilución global incrementando así la productividad global del sistema, de tal forma que en cada etapa se acumula una mayor cantidad de biomasa y producto (Dourado et al., 1987a).

2.5.1 Producción de etanol empleando cultivos continuos con *Saccharomyces cerevisiae*

La producción de etanol en cultivo continuo y a partir de jarabes de glucosa suplementados con extracto de levadura usando *S. cerevisiae* es una tecnología madura a nivel industrial, alcanzándose elevadas productividades volumétricas de etanol del orden de 10-20 g/ L h en CCME (Bayrock e Ingledew, 2005), de tal forma que en cada etapa se acumula una mayor cantidad de biomasa y producto. Otra configuración que permite incrementar la productividad de metabolitos asociados a crecimiento es el cultivo continuo con recirculación externa de biomasa (CCRE), este tipo de cultivo comprende un reactor en el cual parte de las células presentes en la corriente de salida son recicladas al mismo, después de ser separadas por filtración, centrifugación o decantación, incrementando así la biomasa y la productividad del sistema (Roca y Olsson, 2003).

Con respecto a la producción de etanol, se sabe que el etanol ejerce una fuerte inhibición sobre el crecimiento celular y la producción del mismo, lo cual limita las concentraciones de etanol en el medio de cultivo a no más del 13% (v/v) en muchos cultivos (Bai et al. 2004). Además se ha observado que altas concentraciones de sustrato en el medio inhiben el crecimiento de los microorganismos y la velocidad de formación de producto, por lo que reactores en CCME son ampliamente usados en la industria para llevar a cabo la fermentación alcohólica (Xu et al. 2005). Dourado et al. (1987a) y Laluece et al. (2002) citan que los CCME permiten incrementar la productividad de etanol con respecto a un solo biorreactor de igual volumen total; de igual forma Bayrock e Ingledew (2005) utilizando CCSE y CCME (con 5 reactores en cascada y un volumen total y flujo iguales al volumen de operación del CCSE) demostraron que la productividad volumétrica de etanol fue 10 veces mayor en el CCME, logrando convertir 260

g/L de glucosa en etanol con altos rendimientos. Por su parte, Xu et al. (2005) lograron incrementar 2.5 veces la productividad volumétrica de etanol con la cepa auto-floculante de *S. cerevisiae* SPSC01, al utilizar 4 reactores en CCME en lugar del CCSE. Ghose y Tyagi (1979) también demostraron que es posible incrementar la productividad volumétrica de etanol usando una mayor tasa de dilución y CCME en comparación a CCSE. Por otro lado, Roca y Olsson, (2003) mejoraron 10 veces la productividad de etanol con una cepa de *S. cerevisiae*, modificada por ingeniería metabólica, para convertir mezclas de xilosa-glucosa en etanol usando CCRE. Finalmente, Paiva et al. (1996) usando CCRE, con concentraciones de azúcares de 160 a 200 g/L y cepas floculantes de *S. cerevisiae*, demostraron que es posible incrementar hasta 20 veces la productividad volumétrica de etanol.

El consumo total de sustrato es de gran importancia a nivel industrial, para minimizar pérdidas del mismo y maximizar la concentración de etanol y su rendimiento (Bayrock e Ingledew, 2001). En ese sentido, Tyagi y Ghose (1980) efectuaron estudios con *S. cerevisiae* NRRL Y-132 en CCME utilizando cuatro reactores con un solo flujo de alimentación a diferentes concentraciones de glucosa (10, 14, 18 y 22% p/v), en un intervalo de velocidades de dilución de 0.05 a 0.2 h⁻¹, determinando que para poder consumir concentraciones mayores a 180 g/L de glucosa y así producir elevadas concentraciones de etanol eran necesarios dos o más biorreactores en cascada incluso trabajando a tasas de dilución bajas (0.05 h⁻¹). De igual manera Bayrock e Ingledew (2001) trabajando con CCME en 5 reactores conectados en cascada con un solo flujo de alimentación, lograron el consumo de hasta 320 g/L de glucosa con *S. cerevisiae*, produciendo 132 g/L de etanol a una $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$. Bayrock e Ingledew (2005) reportaron que a idénticas velocidades de dilución se logra un mayor rendimiento de producto y un mejor consumo de sustrato en CCME que en un CCSE.

La razón de los resultados anteriores es que el CCME permite extender la productividad del cultivo debido a que la población de las células generadas en los primeros reactores continúan metabolizando y produciendo etanol en las etapas posteriores, incluso si el crecimiento es inhibido, además de que las células en los primeros reactores del CCME están expuestas a las mejores condiciones de crecimiento posibles (disponibilidad de nutrientes y bajas concentraciones de producto inhibitorio; Dourado et al. 1987b), a diferencia del CCSE donde pueden estar presentes concentraciones elevadas de producto y bajas concentraciones de nutrientes.

2.5.2 Producción de etanol empleando cultivos continuos con cepas de *Escherichia coli* etanológicas

Como se ha mencionado antes, se han llevado a cabo estudios en cultivo continuo con cepas de *E. coli* etanológicas evaluando principalmente su estabilidad genética, y en algunos casos para evaluar su potencial en el incremento de la producción y productividad de etanol. Con respecto a parámetros de producción de etanol con cepas de *E. coli* en cultivo continuo, se han reportado resultados con cepas que llevan integrados los genes etanológicos en cromosoma (*E. coli* KO11) o en plásmidos (*E. coli* FBR5), utilizando medio rico (LB) adicionado con azúcares como glucosa y xilosa principalmente. Por ejemplo, Martin et al. (2006) trabajaron con *E. coli* FBR5 en cultivo continuo utilizando medio LB adicionado con 1 g/L de acetato de sodio conteniendo glucosa o xilosa (50 g/L), y reportaron que esta cepa tuvo un rendimiento de etanol con respecto al teórico máximo (Y_{PS}) del 82% y una productividad volumétrica de etanol (Q_P) de 1.6 g/L h, consumiendo toda la glucosa (50 g/L) a una $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$. En el caso de xilosa, la D se modificó

de 0.082 h^{-1} a 0.045 h^{-1} para lograr el consumo total de este azúcar (50 g/L), alcanzando un Y_{PS} de 85% y una Q_P de 1.05 g/L h , en ambos casos la cepa FBR5 sólo sufrió la pérdida del plásmido en menos del 5% en ausencia de antibióticos. En otro estudio, *E. coli* FBR5 fue empleada para fermentar en cultivo continuo hidrolizados de paja de trigo con una concentración de azúcares de 44.5 g/L (glucosa, 25 g/L ; xilosa, 17 g/L ; y arabinosa, 2.5 g/L), adicionados con 10 g/L de triptona y 5 g/L de extracto de levadura (componentes del medio LB), empleando $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$ y 0.04 h^{-1} . En el caso de la $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$, los azúcares sin consumir alcanzaron 5 g/L (xilosa principalmente), y se logró un Y_{PS} de 85% y una Q_P de 0.68 g/L h ; mientras que al emplear una $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$, tampoco se logró el consumo total de azúcares (4 g/L residuales), y en cambio disminuyó el Y_{PS} y Q_P a 61% y 0.28 g/L h respectivamente (Saha y Cotta, 2011).

En el caso de *E. coli* KO11, Zhou et al. (2008b) reportaron la producción de etanol en cultivo continuo empleando medio LB con 50 g/L de xilosa a una $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$, observando inestabilidad en la producción de etanol en este microorganismo, pues en los primeros días del cultivo la cepa alcanzó un Y_{PS} del 84% para después disminuir hasta un valor de 65% y consumir sólo 30 g/L de xilosa (con una producción de hasta 4 g/L de acetato y 2 g/L de lactato), logrando una Q_P de 0.5 g/L h . *E. coli* KO11 también fue evaluada por Dumsday et al. (1999) en cultivo continuo ($D = 0.06 \text{ h}^{-1}$) nuevamente con medio LB, evaluando de forma independientemente diferentes azúcares como glucosa, xilosa, manosa y una mezcla xilosa-glucosa (67-33%), todos a una concentración de 20 g/L . Estos investigadores encontraron que la cepa KO11 fue etanológicamente estable en presencia de glucosa ($Y_{PS} = 82\%$ y $Q_P = 0.54 \text{ g/L h}$), pero no así cuando se empleó manosa, xilosa, o la mezcla xilosa-glucosa, pues en presencia de estos azúcares (manosa y xilosa) se logró un valor de Y_{PS} de 57% y Q_P 0.35 g/L h , mientras que en el caso de la mezcla xilosa-glucosa, estos valores fueron de 69% y 0.42 g/L h respectivamente. De

esta manera se puede observar que uno de los principales problemas del empleo de cultivo continuo con algunas cepas de *E. coli* etanológicas es su inestabilidad genética, y su limitado consumo de pentosas, además que en todos los casos se han empleado medios ricos para favorecer la productividad de etanol, lo cual a mayor escala no es económicamente viable.

III. Objetivos

3.1 Hipótesis

La construcción de una cepa homoetanológica, capaz de crecer en medio mínimo en presencia de acetato, y el empleo de cultivos continuos en cascada, permitirán incrementar la concentración de biomasa, la productividad de etanol y se logrará el consumo simultáneo de xilosa-glucosa en medio de cultivo mineral simulando la composición de azúcares y acetato de hidrolizados de hemicelulosa.

3.2 Objetivo General

Diseñar estrategias de cultivo en lote y continuo (aireados y no aireados) para incrementar la productividad de biomasa y etanol a partir de una nueva construcción de cepa de *E. coli* homoetanológica en medio mineral conteniendo una mezcla de xilosa-glucosa-acetato y con hidrolizados hemicelulósicos.

3.2.1 Objetivos Específicos

- Construir una cepa de *E. coli* homoetanológica (*E. coli* $\Delta pflB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$; evolucionada; *Ppfl::pdc*, *adhB*) y caracterizarla en cultivos en lote y continuos de simple etapa en medio mineral, con concentraciones de azúcares y acetato presentes en hidrolizados de hemicelulosa de bagazo de caña obtenidos en la planta piloto del IBt (42.5 g/L de xilosa, 7.5 g/L de glucosa y 2 g/L de acetato de sodio).

- Estudiar los cultivos en lote con bajas tasas de transferencia de oxígeno para determinar el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) en el que se obtenga una mayor productividad de etanol y un rendimiento de etanol elevado; y evaluar el k_{La} como criterio de escalamiento del cultivo.
- Estudiar cultivos continuos en cascada con dos etapas, a diferentes tasas de dilución con y sin aireación, para obtener constantes cinéticas que permitan modelar en comportamiento de la cepa.
- Proponer modelos cinéticos que describan el comportamiento de la cepa en cultivo en lote y continuo, determinando constantes de inhibición por producto y el número de biorreactores en cascada necesarios para consumir todo el sustrato e incrementar la productividad volumétrica de etanol; así como la validación experimental del modelo y las constantes cinéticas en CCME.
- Estudiar el efecto del acetato sobre el crecimiento y producción de etanol de la cepa etanológica, en condiciones aerobias y anaerobias.
- Secuenciar la cepa etanológica y determinar los cambios genéticos que influyen en la mejora de crecimiento y producción de etanol en presencia de acetato.
- Estudiar cultivos en lote de hidrolizados hemicelulósicos con la cepa etanológica, para evaluar su efectividad en la conversión de pentosas y hexosas a etanol en presencia de compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados.

IV. Materiales y Métodos

4.1 Construcción de la cepa etanológica *E. coli* MS04, cepas empleadas para el estudio de la tolerancia a acetato y medio de cultivo

La cepa etanológica *E. coli* MS04 (*E. coli* MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xyIFGH$, $\Delta ldhA$, *evolucionada*, $PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}$, Tabla 4.1) fue desarrollada a partir de procesos de evolución metabólica e interrupción de varios genes del metabolismo anaerobio de la cepa parental *E. coli* MG1655. En principio, la cepa CL3 (*E. coli* MG1655: $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$; Utrilla et al. 2009) fue construida por la interrupción de los genes *pflB*, *adhE* y *frdA* en la cepa MG1655 para evitar la producción de metabolitos de fermentación como formiato, etanol (mediante el consumo de acetil-CoA) y succinato (Utrilla et al. 2009). La interrupción del operón *xyIFGH* en la cepa CL3 (Utrilla et al. 2010) generó la cepa JU01, lo cual permitió el uso de un transportador simporter alternativo de xilosa (*araE* o *xylE*) para incrementar el rendimiento de ATP a partir de xilosa en condiciones no aireadas (Hasona et al. 2004), en lugar del transportador dependiente de ATP para el cual codifica dicho operón. La cepa JU01 fue evolucionada en medio mineral con xilosa como única fuente de carbono, llevando a cabo transferencias seriadas en minifermentadores para promover el crecimiento en xilosa y mejorar la velocidad volumétrica de producción de lactato (Utrilla et al. 2010). Una cepa fue aislada del proceso de evolución y se denominó JU15, la cual presentó la más elevada velocidad de crecimiento (μ) y productividad volumétrica (Q_P) de lactato (Tabla 4.1). Como parte del presente trabajo de tesis, el gen *ldhA* se interrumpió en la cepa JU15 utilizando el método de Datsenko y Wanner (2000), utilizando los siguientes oligos: directo, 5'- ATC ACT GGA GAA AGT CTT ATG AAA CTC GCC GTT TAT AGC ACA GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC - 3' y reverso, 5'- TGC AGG GGA GCG GCA AGA TTA AAC CAG TTC GTT CGG GCA CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG- 3'.

Esta cepa, nombrada MS01, es una cepa no fermentativa que no puede crecer en condiciones anaerobias ya que no recicla NADH+H. Posteriormente, los genes *pdC* y *adhB* de *Zymomonas mobilis*, que fueron amplificados del plásmidos pLOI510 (Ohta et al. 1991), se integraron en tándem en el cromosoma de la cepa MS01 bajo el control del promotor anaerobio del gen *pflB* para canalizar el flujo de piruvato a la producción de etanol, utilizando oligos con homología a la secuencia del promotor *pflB* y al inicio y al final de los genes *pdC* y *adhB* respectivamente (secuencias subrayadas): directo, 5'- TAC GCA GTA AAT AAA AAA TCC ACT TAA GAA GGT AGG TGT TAC ATG AGT TAT ACT GTC GGT ACC -3' y reverso: 5'- ATT GTA CGC TTT TTA CTG TAC GAT TTC AGT CAA ATC TAA TTA GAA AGC GCT CAG GAA GAG -3'. La integración de los genes *pdC* y *adhB* se llevó a cabo empleando una variante del método de Datsenko y Wanner (2000), en la cual la cepa MS01 se transformó con el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000), quien promovió la recombinación homóloga en los sitios diseñados del gen *pflB*. Las cepas recombinantes se seleccionaron en medio mineral con agar suplementado con 2% de glucosa, usando sistemas anaerobios con atmósfera de CO₂ (Gas Pak, Becton-Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Bajo estas condiciones, solamente las cepas recombinantes que expresaron los genes *pdC* y *adhB* pudieron crecer, dado que fueron capaces de regenerar NAD⁺ por la vía heteróloga de producción de etanol. La colonia seleccionada fue adaptada en medio mineral suplementado con acetato de sodio (2 g/L), además de glucosa (50 g/L), o xilosa (50 g/L) por transferencias seriadas en minifermentadores. Una cepa que creció a una μ de 0.3 h⁻¹ y 0.26 h⁻¹ en glucosa y xilosa respectivamente, fue seleccionada y se denominó MS04 (Tabla 4.1).

De igual manera para llevar a cabo el estudio de tolerancia a acetato por la cepa *E. coli* MS04, la cepa lactogénica JU01 no evolucionada (MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$) se utilizó

para introducir interrupciones en el cromosoma que se encontraron en las secuencias de las cepas evolucionadas *E. coli* JU15 y MS04 (ver sección 5.7 c correspondiente a la secuenciación genómica de ambas cepas). Tres cepas derivadas de JU01 se construyeron usando nuevamente el método descrito por Datsenko y Wanner (2000) y los siguientes oligos: (a) cepa JU15 Δ midarpA: directo, arpA FWD 5'-CTC TCG AAA AAA AAA TCT CAT GCA TAT TCT GGA GGC AAA AGA TAA GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC-3' y reverso, arpA RV 5'-GGC ATG TGG AAG ATG TTT ATG CGT ATC GGC GCA GGC AAA GAT CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG-3'; (b) cepa JU15 Δ arpA: directo, arpA_IMF 5'-GCC TAT CGG CGG TAA ATT G-3' y reverso, arpA_IMR 5'-GGA GAA GCG GCA TAT TTC C-3'; y (c) cepa JU15 Δ reg 27.3: directo, regFor 5'-TGA ACC CTG TTC TAT GGC TCC AGA TGA CAA ACA TGA TCT CTG TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG-3' y reverso, regRev 5'-TGG CTG CTC CGC ATG AGC TAC CGG CAT TGT TGG CGC GTA TCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG-3'. Todas las cepas construidas se crecieron en medio mineral con glucosa y se diluyeron (1:2) con glicerol al 80% cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 1 a 2, almacenándose a -70°C en crioviales. Todas las cepas utilizadas y generadas en este trabajo se listan en la tabla 4.1.

El medio mineral utilizado en cultivos no aireados y aireados fue el medio mineral AM1 (Martínez et al. 2007) suplementado con ácido cítrico (100 mg/L; al que se le denominó medio AM2), y azúcares como glucosa y xilosa además de acetato de sodio según las concentraciones que se indican en cada experimento. El medio AM1 contiene las siguientes sales por litro: 2.63 g (NH₄)₂HPO₄, 0.87 g NH₄H₂PO₄, 0.246 g MgSO₄·7H₂O y 0.15 g KCl, además de 1 mM betaína y 1.5 mL de elementos traza. La solución de elementos traza contiene por litro: 1.6 g FeCl₃, 0.2 g CoCl₂·6H₂O, 0.1 g CuCl₂, 0.2 g ZnCl₂·4H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄, 0.05 g H₃BO₃ and 0.33 g MnCl₂·4H₂O.

Tabla 4.1. Cepas bacterianas utilizadas y construídas en este estudio

Cepas	Genotipo	Referencia
	Características relevantes genotípicas	
MG1655	Cepa parental	ATCC 47076
CL3	MG1655 $\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$	Utrilla et al. 2009
JU01	CL3 $\Delta xyfFGH$	Utrilla et al. 2012
JU15	JU01 Δreg 27.3, $gatC$ S184L, $\Delta amidarpA^a$, evolucionada	Utrilla et al. 2012
JU01 $\Delta amidarpA$	JU01 $\Delta amidarpA$	Este trabajo
JU01 $\Delta arpA$	JU01 $\Delta arpA^b$	Este trabajo
JU01 Δreg 27.3	JU01 Δreg 27.3 ^c	Este trabajo
MS01	JU15 $\Delta ldhA$	Este trabajo
MS04	MS01 $PpflB::pdc_{Zm}$, $adhB_{Zm}$ evolucionada, $\Delta hyfR^d$	Este trabajo

^a **$\Delta amidarpA$** : versión interrumpida del gen *arpA* generada por una mutación en la base 1,253 insertando una timina que resulta en un codón de terminación (UAA) en la base 1,282 provocando que la proteína ArpA pierda 4 de los 5 dominios de ankirina.

^b **$\Delta arpA$** : eliminación completa del gen *arpA* en el cromosoma de la cepa JU01.

^c **$\Delta reg27.3$** : eliminación de una región genómica de 27,335 pb, la cual comprende los genes *narP*, *napF*, *napD*, *napA*, *napG*, *napH*, *napB*, *napC*, *ccmH*, *ccmD*, *ccmC*, *ccmB*, *ccmA*, *rscD*, *rscB*, *rscC*, *alkB*, *ada*, *apbE*, *ompC*, *mgo*, *eco*, *yojO*, *yojL*.

^d **$\Delta hyfR$** : versión interrumpida del gen *hyfR* generada por una mutación en la base 950, cambiando una guanina por una adenina, que resulta en un codón de terminación (UAG) en la base 951 provocando que la proteína HyfR pierda el 53% de su secuencia.

Genes. *adhE*: alcohol deshidrogenasa; *frdA*: fumarato reductasa; *pflB*: piruvato formato liasa; *xyfFGH*: transportador ABC de xilosa; *ldhA*: lactato deshidrogenasa; *narP*: regulador de respuesta a nitratos/nitritos; *napA/napB/napC/napD/napF/napG/napH*: reductasas periplásmicas de nitrato; *ccmA/ccmB/ccmC/ccmD/ccmH*: genes envueltos en la maduración de citocromo C; *rscB/rscC/rscD*: genes envueltos en regular la síntesis de polisacáridos de cápsula celular; *alkB*: envuelto en la respuesta adaptativa de ADN a agentes alquilantes; *ada*: factor de transcripción que controla la transcripción de genes envueltos en el proceso de reparación de ADN alquilado; *apbE*: envuelto en la biosíntesis de tiamina; *ompC*: proteína externa de membrana; *mgo*: malato:quinona oxidoreductasa; *eco*: inhibidor de la proteasa serina; *yojO*: proteína hipotética; *yojL*: transportador ABC; *pdc_{Zm}*: piruvato descarboxilasa de *Z. mobilis*; *adhB_{Zm}*: alcohol deshidrogenasa B de *Z. mobilis*; *gatC*: enzima IIC del sistema PTS específica para galactitol; *arpA*: proteína con dominios de ankirina reguladora del operón *aceBAK* y de la enzima Acs; *hyfR*: regulador de la hidrogenasa cuatro.

4.2 Caracterización de la cepa de *E. coli* etanológica MS04 en medio mineral con glucosa y/o xilosa en presencia de acetato de sodio

La cepa etanológica *E. coli* MS04 se caracterizó en minifermentadores (Fleakers, 300 mL; Beall et al. 1991) con un volumen de trabajo de 200 mL a 37°C, 100 rpm, inoculando a 0.37 g/L en peso seco celular y manteniendo el pH del cultivo en 7.0 (ajustado automáticamente con KOH 2N). Se usó el medio de cultivo mineral AM2 suplementado con glucosa (50 g/L; J.T. Baker), con y sin la adición de acetato de sodio (2 g/L; J.T. Baker), ya que estas concentraciones de azúcares y acetato corresponden a aquellas encontradas en hidrolizados de bagazo de caña obtenidos con ácido sulfúrico diluido (2% H₂SO₄, 121°C, 30 min) (Trujillo-Martínez, 2008). De igual forma se llevaron a cabo cultivos en minifermentadores en medio AM2 suplementados con xilosa (50 g/L; Sigma-Aldrich) o la mezcla de azúcares xilosa-glucosa (42.5 y 7.5 g/L) con y sin la adición de acetato de sodio. La caracterización se llevó a cabo para observar si existía algún efecto favorable o desfavorable en el crecimiento celular y producción de etanol por la presencia de acetato en el medio de cultivo, ya que se ha reportado que es tóxico aún en concentraciones tan bajas como 0.5 g/L (Eiteman y Altman et al. 2006).

4.3 Cultivos en lote y continuos para incrementar la producción de etanol por *E. coli* MS04

Los cultivos en lote se realizaron en biorreactores Applikon ADI 1010/ ADI 1025 (Schiedam, The Netherlands) con un volumen de trabajo de 750 mL, utilizando el medio de cultivo AM2 adicionado con la mezcla xilosa, glucosa y acetato (42.5, 7.5 y 2.0 g/L respectivamente) manteniendo el pH en 7.0 (ajustado automáticamente con KOH 2N), la temperatura a 37°C e

inoculando el medio de cultivo a una DO a 600 nm de $0.1 = 0.037$ g/L de masa celular en peso seco.

Los cultivos en lote se llevaron a cabo bajo condiciones aireadas (0.0-0.2 vvm; volumen de aire por volumen de medio por minuto) con la tensión de oxígeno disuelto (TOD) monitoreada con un electrodo polarográfico de oxígeno esterilizable (Ingold, modelo A420) conectado a un amplificador de TOD previamente calibrado a 100% de oxígeno disuelto. La agitación se llevó a cabo con un impulsor tipo Rushton de seis paletas planas con una relación diámetro de impulsor/diámetro de tanque (D/T) de 0.5 y a una velocidad de agitación de 400 rpm.

En el caso de cultivos continuos estos se alimentaron con medio mineral AM2 adicionado con la mezcla xilosa, glucosa y acetato (42.5, 7.5 y 2.0 g/L respectivamente) a diferentes flujos y manteniendo constante el volumen de trabajo, obteniendo así diferentes velocidades de dilución (D ; h^{-1}), que es lo que define la velocidad de crecimiento (μ ; h^{-1}) según la Ec. 1, donde F es el flujo de alimentación (mL/min) y V es el volumen de trabajo (mL).

$$D = \frac{F}{V} = \mu \quad \text{Ec. 1}$$

Los cultivos continuos se llevaron a cabo bajo condiciones aireadas y no aireadas en las mismas condiciones de temperatura, pH, volumen de trabajo e inóculos empleados en los cultivos en lote. Se emplearon tres tipos de configuraciones en cultivo continuo: i) cultivo continuo simple etapa, un solo biorreactor no aireado o microaireado con flujos de alimentación y descarga iguales; ii) cultivo continuo doble etapa, dos biorreactores microaireados conectados en serie alimentados con un solo flujo de alimentación en el primer biorreactor; y iii) cultivo continuo en

dos fases, dos biorreactores conectados en serie alimentados con flujos independientes, donde el primer biorreactor fue aireado y el segundo no. Los cultivos continuos microaireados se airearon a 0.1 vvm y se agitaron a 400 rpm; mientras que los cultivos continuos en dos fases se airearon sólo en la primer etapa (1.0 vvm y 600-800 rpm), y la segunda fase fue no aireada con una agitación de 400 rpm. La adición de antiespumante estéril (Clerol AF, Dow Corning, 5% P/V) fue necesaria sólo en los cultivos continuos en dos fases en la primera etapa aireada, el cual fue controlado mediante un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica.

4.3.1 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en cultivo en lote y su evaluación como criterio de escalamiento en cinéticas de producción de etanol por *E. coli* MS04

En todos los cultivos aireados se determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}), el cual relaciona la velocidad de transferencia de oxígeno con el gradiente de concentración de oxígeno en un sistema. El k_{La} se determinó por medio del método dinámico de gassing-out (Taguchi y Humphrey, 1996), en el cual el oxígeno de un sistema se desorbe de la fase líquida con nitrógeno para después suministrar aire y registrar el cambio en la TOD con respecto al tiempo bajo ciertas condiciones de aireación y agitación. El k_{La} se estimó por regresión lineal al integrar la Ec. 2 (donde el $C_{O_2}^*$ es la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con la fase gaseosa y C_{O_2} es la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido) en función de las condiciones iniciales de tiempo y concentración de oxígeno disuelto (Ec. 3). El valor de k_{La} determinado con la Ec. 3 (donde $C_{O_2}^0$ es la concentración de oxígeno disuelto al $t = t_0$, tiempo inicial de la medición) fue corregido por el tiempo de respuesta del

electrodo de oxígeno (τ), él cual se define como el tiempo necesario para obtener un 63% del cambio total en la TOD cuando un electrodo se transfiere de un medio libre de oxígeno a otro saturado con oxígeno (Doran, 1995). El τ (35 s) fue empleado en la Ec. 4 (De Jesús et al. 2007) para estimar el valor corregido de $k_L a$, donde C_{O_2} y t son los valores experimentales de la concentración de oxígeno disuelto y tiempo medidos por el método de gassing-out. Un programa desarrollado en *Mathematica 8.0* (Wolfram Research, USA) fue utilizado para obtener los valores corregidos de $k_L a$. La velocidad de transferencia de oxígeno máxima (OTR) en el sistema también se determinó en cada condición de acuerdo a la Ec. 2.

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = k_L a (C^*_{O_2} - C_{O_2}) = OTR \quad \text{Ec. 2}$$

$$\ln \frac{C^*_{O_2} - C_{O_2}}{C^*_{O_2} - C^0_{O_2}} = -k_L a (t - t_0) \quad \text{Ec. 3}$$

$$C_{O_2} = C^*_{O_2} \left[1 - \frac{1}{(k_L a)\tau - 1} \left(k_L a \tau e^{-(t/\tau)} - e^{-k_L a (t)} \right) \right] \quad \text{Ec. 4}$$

Una vez determinado el $k_L a$ en cada condición de aireación empleada, se escogió uno en el cual la productividad volumétrica de etanol fue la mejor (0.1 vvm y $k_L a$ 7.2 h⁻¹). Así, el valor de $k_L a$ de esta condición se utilizó como criterio de escalamiento ascendente en cinéticas de producción de etanol por *E. coli* MS04, ya que frecuentemente es utilizado como criterio de escalamiento con buenos resultados al escalar cultivos aireados (Marques et al. 2010).

Para llevar a cabo el escalamiento se utilizó un biorreactor Microferm (New Brunswick Scientific Co. Inc.) modelo MF-114 de 14 L de capacidad con un volumen de trabajo de 9.165 L (manteniendo constantes las relaciones geométricas del biorreactor de 750 mL de volumen de trabajo), 3 impulsores tipo Rushton ($D_i/D_t = 0.5$) y una aireación de 0.1 vvm; la temperatura se mantuvo a 37°C y el pH a 7.0 (controlado por la adición de KOH 2 N). La velocidad de agitación, que se determinó experimentalmente para tener el valor de k_{La} de 7.2 h^{-1} , fue de 200 rpm. La TOD fue monitoreada con un electrodo polarográfico de oxígeno esterilizable (Ingold, modelo A420).

4.4 Cultivos en lote de la cepa *E. coli* MS04 en medio mineral con glucosa en presencia de diferentes concentraciones de acetato de sodio

Se llevaron a cabo cultivos en lote en medio mineral AM2 con glucosa (50 g/L) y diferentes concentraciones de acetato de sodio en minifermentadores a 37°C, 100 rpm, pH 7.0 (controlado con KOH 2N) y bajo condiciones no aireadas. Las concentraciones de acetato de sodio empleadas estuvieron en el rango de 0–40 g/L para determinar la concentración de acetato en la cual cesa el crecimiento (IC_{100}) o en la cual μ disminuye a la mitad (IC_{50}). En otros experimentos en minifermentadores bajo las mismas condiciones de proceso antes descritas, excepto el pH, se llevaron a cabo fermentaciones manteniendo constante la concentración de acetato de sodio (2 g/L) y variando el pH (5.8, 6.2, 6.6 y 7.0) para establecer si la concentración del ácido acético en su forma no disociada (calculada por la ecuación de Henderson-Hasselbach) era la responsable de la toxicidad del acetato de sodio en los experimentos anteriores. En otra serie de experimentos en condiciones no aireadas en medio AM2 adicionado con glucosa (50

g/L) y acetato de sodio (2 g/L), se evaluó independientemente el efecto de la adición de ácido propiónico o láctico, utilizando concentraciones de dichos ácidos que igualaron algunas de las concentraciones de la forma no disociada del ácido acético descritas al principio de esta sección, tomando en cuenta siempre la concentración de acetato adicionado al medio de cultivo (Tabla 4.2). Las concentraciones de ácido láctico utilizadas (16, 43.2 y 97.5 g/L) equivalen a las concentraciones de acetato de sodio de 5, 10 y 20 g/L respectivamente en su forma no disociada (Tabla 4.2); mientras que las concentraciones de ácido propiónico evaluadas (1.6 y 20.3 g/L) equivalen a aquellas de acetato de sodio de 5 y 40 g/L respectivamente en su forma no disociada (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Concentraciones de los ácidos orgánicos utilizados para evaluar el efecto de la concentración de la forma no disociada de cada ácido sobre el crecimiento y producción de etanol por *E. coli* MS04 en medio mineral con glucosa

Acetato (g/L)	Lactato (g/L)	Propionato (g/L)	Concentración de la forma no disociada (mg/L)
5	16	1.6	20
10	43.2	---	40
20	97.5	---	80
40	---	20.3	160

4.4.1 Determinación de la tolerancia a acetato en cultivos en lote en condiciones aerobias de la cepa *E. coli* MS04

Se realizaron cultivos aerobios en biorreactores para determinar si la tolerancia a acetato observada con la cepa *E. coli* MS04 también se presentaba en estas condiciones. En estos experimentos el medio AM2 fue suplementado con glucosa (2 g/L) y acetato de sodio (0, 5 y 10 g/L). Las condiciones de los cultivos fueron 37°C, pH 7.0 (controlado por la adición de KOH 2N), 750 mL de volumen de operación, 600 rpm y 1.0 vvm de aireación (por lo que la TOD permaneció por encima del 20% del valor de saturación), inoculando el medio de cultivo con 0.019 g/L de peso seco celular. Los inóculos para estos cultivos se prepararon en matraces de 500 mL (con deflectores), usando 100 mL de volumen de trabajo con el mismo medio de cultivo empleado en los biorreactores a 37°C, pH inicial de 7.0 y 300 rpm. La cepa parental *E. coli* MG1655 se empleó como cepa control, bajo las mismas condiciones de fermentación, para analizar el efecto del acetato sobre el crecimiento de esta cepa en comparación con la cepa *E. coli* MS04. Todos los cultivos (aireados y no aireados) se llevaron a cabo al menos por duplicado y los resultados en las figuras y tablas muestran el promedio y el error o desviación estándar.

4.5 Secuenciación y comparación del genoma de cepas evolucionadas

Las cepas *E. coli* JU15 y MS04 se cultivaron por 12 horas en medio Luria-Bertani (LB) en matraces con mamparas (250 mL) conteniendo 50 mL de medio LB y fueron incubados a 37°C, 300 rpm y un pH inicial de 7.0. Las células se separaron por centrifugación (2,150 x g, 10 min, 4°C) y el ADN se extrajo y purificó usando el método de fenol-cloroformo (Maniatis et al. 1982); el ADN purificado se almacenó a -20°C antes de ser secuenciado. La secuenciación del

ADN de ambas cepas se llevó a cabo con un Analizador de Genoma GAIIx (Illumina, Inc. San Diego, CA). El ADN genómico fue fragmentado por nebulización con nitrógeno a 35 psi por 6 minutos; el tamaño del fragmento usado fue ~ 400 pb, incluyendo los adaptadores. La librería se construyó como se describe a continuación: el ADN en principio se reparó (usando ADN polimerasa); las adeninas (dATP) fueron adicionadas a los extremos 3' para facilitar la ligación de adaptadores de doble cadena; finalmente los adaptadores de doble cadena se ligaron a cada uno de los extremos de los fragmentos de ADN. Una vez que la librería se construyó, los fragmentos se seleccionaron y se enriquecieron por reacciones de PCR. La secuenciación se llevó a cabo por síntesis en una lectura tipo Paired-end por 2x36 ciclos o bases en la Unidad de Secuenciación Masiva de la UNAM. El programa Dynamic Trim de Solexa QA (Cox et al. 2010) se utilizó para filtrar, cortar y rechazar lecturas de baja calidad usando parámetros estándar. Sólo aquellas lecturas de alta calidad se alinearon con respecto a las de la cepa *E. coli* K12 subespecie MG1655 (GeneBank NC_000913.fnn) (mínima calidad de 13 para cada base) usando el programa Consed v. 1.9.0 (Gordon et al. 1988). Los cambios de nucleótido o SNPs se identificaron a partir del consenso de regiones cubiertas por al menos veinte lecturas y calidad mínima phred de 10 por base. Para llevar a cabo el análisis de las secuencias se recibió el apoyo del Dr. Víctor González Zúñiga y la Quím. Patricia Bustos Arcos del CCG-UNAM.

4.6 Fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de colza y olivo para la producción de etanol por la cepa *E. coli* MS04

Los hidrolizados hemicelulósicos se obtuvieron a partir de residuos de paja de colza y poda de olivo de la comunidad autónoma de Andalucía como resultado de la colaboración con

investigadores del grupo del Dr. Eulogio Castro Galiano de la Universidad de Jaén, España, los cuales se dedican al estudio del pretratamiento de biomasa para la obtención de azúcares fermentables. Los hidrolizados de hemicelulosa de estos dos residuos agrícolas se generaron por medio de un proceso termo-ácido en el cual una relación sólido/líquido 1:10 (paja de colza o poda de olivo / ácido sulfúrico 2% p/v) fue tratada por 1 hora a 121°C en una autoclave. Posteriormente el licor fue separado del sólido residual (compuesto por celulosa y lignina principalmente) mediante prensado y sometido a una etapa de detoxificación agregando hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) hasta alcanzar un pH de 10 a una temperatura de 50°C y en agitación (Martínez et al. 2001). Finalmente, el hidrolizado se centrifugó para eliminar los sólidos precipitados y el pH del mismo fue ajustado a 7.0 con ácido sulfúrico diluido.

Una vez detoxificados los hidrolizados se vertieron de forma independiente en biorreactores (1 L de volumen de trabajo) y se esterilizaron por 15 minutos a 121°C, posteriormente se les adicionó en forma aséptica sales de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) y ácido cítrico a concentraciones de 0.25 X y 1X respectivamente de las concentraciones originales del medio AM2, según trabajos previos realizados con hidrolizados de bagazo de caña de azúcar en nuestro grupo (Trujillo-Martínez, 2008). Las condiciones de operación del biorreactor fueron pH 7.0 (mantenido por la adición automática de KOH 2N), 37°C, 300 rpm, 0.1 vvm de aire (correspondiendo a un k_{La} estimado de 7.2 h^{-1}) y un inóculo correspondiente a 1.0 $\text{DO}_{600\text{nm}}$.

4.7 Métodos analíticos

El crecimiento celular se midió espectrofotométricamente por densidad óptica a 600 nm (DU-70, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA) y convertida a peso seco celular por litro usando una

curva de calibración (1 densidad óptica a 600 nm = 0.37 g/L de masa celular en peso seco). Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su análisis. Los ácidos orgánicos como lactato, piruvato, succinato, formiato y acetato; y azúcares como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa se determinaron por HPLC (Waters U6K, Millipore Co., Milford, MA) con una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87H (300 x 7.8 m m; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) acoplada a un detector de índice de refracción (Modelo 2410, Waters, Millipore Co., Milford, MA) y a un detector de arreglo de diodos a 210 nm (Modelo 996, Waters, Millipore Co., Milford, MA). La fase móvil usada fue ácido sulfúrico 5.0 mM a un flujo de 0.5 mL/min y 60°C. En el caso de los azúcares xilosa y glucosa, estos también se determinaron por un analizador bioquímico YSI 2700 (Yellow Springs Inc., OH). El etanol se cuantificó por cromatografía de gases (6850 Series GC System, Agilent, Wilmington, DE) utilizando n-butanol (10 g/L) como estándar interno.

4.7.1 Determinación de actividades enzimáticas de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa II de *Z. mobilis* expresadas en *E. coli* MS04

La vía heteróloga de producción de etanol en la cepa *E. coli* MS04 comprende las enzimas piruvato descarboxilasa (Pdc) y alcohol deshidrogenasa II (AdhB) de *Z. mobilis*, que a partir de piruvato producen etanol (Figura 2.1 y 4.1). La determinación de las actividades específicas de Pdc y AdhB se efectuó espectrofotométricamente a 340 nm y 30°C llevando a cabo reacciones acopladas a la oxidación de NADH⁺ H (Hoppner y Doelle, 1983; Conway et al. 1987; Martínez et al. 1999).

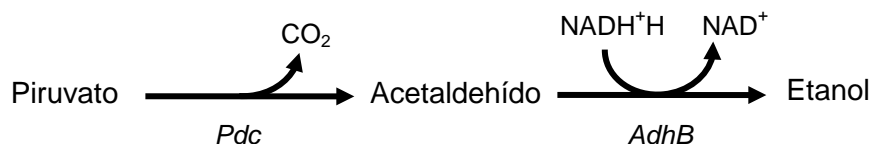


Figura 4.1. Vía heteróloga de producción de etanol en *E. coli* MS04. Pdc: piruvato descarboxilasa; AdhB: alcohol deshidrogenasa B, ambas enzimas de *Z. mobilis*.

La técnica se basó en cosechar células en fase exponencial ($1.0 \text{ DO}_{600\text{nm}}$) en el caso de cultivo en lote, y en el caso de cultivos continuos cosechar las células una vez que estos alcanzaron el estado estable, inmediatamente las células se centrifugaron (4000 rpm , 10 min , 4°C) se lavaron con el amortiguador correspondiente y se resuspendieron en amortiguador de fosfato para sonicarlas en un ultrasonicador Soniprep 150 (Lower Sydenham, London) con 4 pulsos de 15 segundos seguidos por 1 minuto de reposo en hielo cada uno. Después de la sonicación las muestras se centrifugaron a $10,000 \text{ rpm}$, 10 min y 4°C , y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para determinar la actividad enzimática específica ($\text{UI}/\text{mg}_{\text{Proteína}}$), definiendo una unidad internacional (UI) como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la conversión de 1 mmol de sustrato en producto por minuto (Martínez et al. 1999). La cuantificación de proteína total se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

V. Resultados y Discusión

5.1 Construcción de la cepa de *E. coli* homoetanológica MS04 y su caracterización fenotípica en presencia de acetato

La cepa etanológica *E. coli* MS04 ($\Delta pflB$, $\Delta adhE$, $\Delta frdA$, $\Delta xylFGH$, evolucionada, $\Delta ldhA$, $PpflB::pdc_{Zm}-adhB_{Zm}$, Figura 5.1) presenta la ventaja que en condiciones no aireadas gran parte del carbono se canaliza a la producción de etanol y a su vez regenera NAD^+ para ser utilizado por la ruta de glucólisis. Además, la vía heteróloga de producción de etanol mantiene el balance redox pues sólo se consume una molécula de $NADH^+H$ por molécula de piruvato convertida a etanol (Figura 5.1). La cepa MS04 no tiene interrumpidas las vías de producción o consumo de acetato (genes *pta*, *ackA* y *acs*), lo cual potencialmente le permite sintetizar pequeñas concentraciones de acetyl CoA a partir de acetato (Wolfe, 2005). Esto es de gran importancia ya que la cepa *E. coli* MS04 tiene interrumpido el gene *pflB* y no es capaz de sintetizar acetyl CoA a partir de piruvato en condiciones estrictamente anaerobias, pero sí a partir de acetato el cual está presente en los hidrolizados de hemicelulosa (Klinke et al. 2004; Martinez et al. 2001). Una vez construida la cepa etanológica, se caracterizó en minifermentadores en medio mineral AM2 con glucosa (50 g/L), con y sin la adición de acetato de sodio (2 g/L) en las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos. La caracterización se llevó a cabo para observar si existía algún efecto favorable o desfavorable en el crecimiento celular y producción de etanol por la presencia de acetato en el medio de cultivo, ya que se ha reportado que es tóxico aun por debajo de 1 g/L (Eiteman y Altman et al. 2006). Los resultados de las cinéticas con glucosa y en presencia o ausencia de acetato de sodio se muestran en la figura 5.2, donde se puede observar, en comparación al medio sin acetato, que en presencia de acetato hubo un incremento en la

concentración de biomasa (de 0.5 a 2.5 g_{DWC}/L) y en la producción de etanol (de 8 a 23 g/L), además del consumo total de glucosa en dos días (50 g/L), con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.3 h⁻¹, rendimiento de etanol con respecto al teórico máximo (Y_{PS}) del 93% y una productividad volumétrica de etanol (Q_P) de 0.67 g_{EtOH}/L h.

Previamente se ha reportado que en algunas cepas de *E. coli* $\Delta pflB$, en condiciones no aireadas, el crecimiento es limitado si el medio de cultivo no es suplementado con acetato (Böck y Sawers, 1996); de esta manera, el incremento en la biomasa y etanol por la cepa *E. coli* MS04 en presencia de acetato se puede relacionar con el metabolismo de acetato y la formación de acetyl CoA que se utiliza en vías biosintéticas y energéticas, además de regular varias reacciones del metabolismo central como la de piruvato deshidrogenasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa (Vallari y Jackowski, 1988). Por otro lado, el crecimiento alcanzado en ausencia de acetato de sodio (Figura 5.2) puede deberse a que la cepa probablemente sintetice bajas concentraciones de acetyl CoA por medio del complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa (Pdh), responsable de la oxidación de piruvato a acetyl CoA en condiciones aireadas, aunque en condiciones no aireadas este complejo se sintetiza a un nivel bajo (Cassey et al. 1998, Utrilla et al. 2009) y mantiene aproximadamente un 5% de su actividad específica (Zhou et al. 2008a). Además, como se describe más adelante, en los minifermentadores empleados en el presente trabajo no existen condiciones estrictamente anaerobias, por lo cual también se favorece la expresión del gen que codifica para la enzima Pdh.

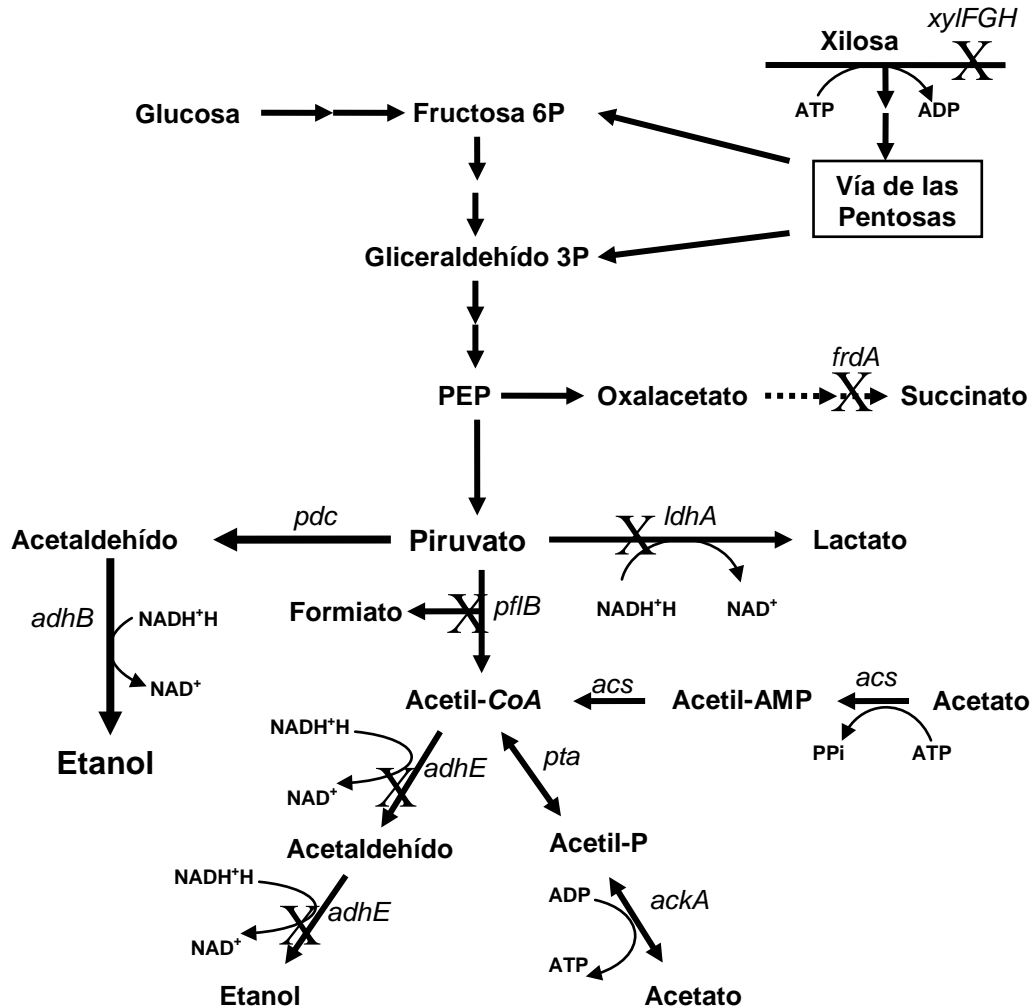


Figura 5.1. Esquema de las rutas metabólicas interrumpidas y clonadas en la construcción de la cepa homoetanológica *Escherichia coli* MS04. Abreviaturas: *frdA*, fumarato reductasa; *adhE*, alcohol deshidrogenasa; *pflB*, piruvato formato liasa; *pta*, fosfotransacetilasa; *ackA*, acetato cinasa; *acs*, acetil-CoA sintetasa; *ldhA*, lactato deshidrogenasa; *xylFGH*, operón del transportador de xilosa dependiente de ATP; *pdc*, piruvato descarboxilasa y *adhB*, alcohol deshidrogenasa de *Z. mobilis* integradas bajo el control del promotor de *pflB* en esta cepa.

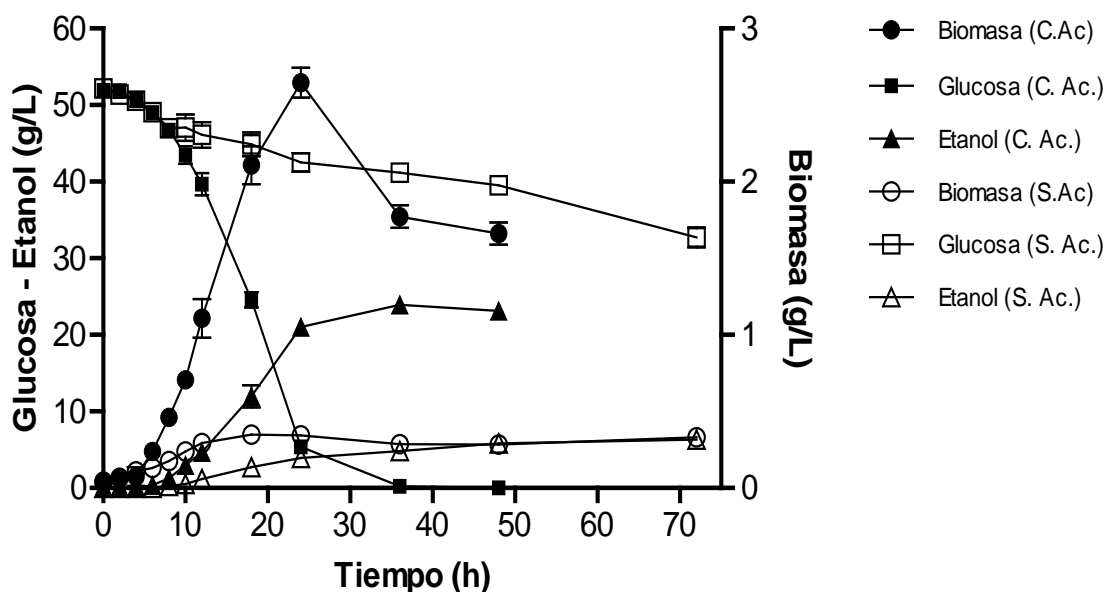


Figura 5.2. Cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol de la cepa etanológica *E. coli* MS04 en condiciones no aireadas en medio mineral con glucosa (50g/L) con 2 g/L de acetato de sodio (C. Ac.) (símbolos llenos), y sin acetato de sodio (S. Ac.) (símbolos vacíos).

En las cinéticas en presencia de acetato, se puede inferir que éste podría haber sido metabolizado hacia la formación de acetil CoA por las vías de Pta-Ack o Acs (Figura 5.1), ya que la concentración de acetato en el medio (1.44 g/L ó 24.4 mM) se mantuvo por arriba del valor de K_m de las enzimas Pta-AckA (K_m 7-10 mM) y Acs (K_m 0.2 mM; Wolfe, 2005), no existiendo alguna limitación al menos en la velocidad de las reacciones enzimáticas debido a la concentración de sustrato. Por otro lado, se ha reportado que la poza de acetil CoA en *E. coli* creciendo sobre glucosa es de 324 mM (Jackowski, 1996) y la concentración específica en células en condiciones aerobias a 30°C es de 0.6 mM/g_{DWC} (Chohnan et al. 1997), y comparando con estos datos, se puede determinar que la concentración de acetato en el medio de cultivo fue mayor (24.4 mM) de lo requerido por la célula para sintetizar acetil CoA a partir de

éste. Tal exceso se pudo confirmar debido a que el acetato consumido durante la etapa de crecimiento fue alrededor de 0.5 g/L de los 1.44 g/L iniciales; durante la etapa estacionaria del crecimiento la concentración de acetato incrementó hasta aproximadamente 2.5 g/L al final del cultivo (datos no mostrados).

5.1.1 La cepa *E. coli* MS04 requiere acetato para alcanzar altas concentraciones de biomasa y etanol al utilizar fuentes de carbono como glucosa y xilosa

La caracterización de la cepa *E. coli* MS04 se llevó a cabo en minifermentadores sin aireación usando medio AM2 en 6 condiciones: glucosa (50 g/L); xilosa (50 g/L) y la mezcla glucosa-xilosa (7.5 g/L y 42.5 g/L respectivamente) todas con o sin acetato de sodio (2 g/L). Los resultados de las cinéticas con xilosa en presencia o ausencia de acetato mostraron resultados semejantes a los obtenidos con la cepa *E. coli* MS04 (Figura 5.2) con incrementos en la μ , Y_{PS} y Q_P con respecto a la condición sin acetato de sodio de 0.14 h^{-1} a 0.26 h^{-1} , 76% a 92% y 0.12 g/L h a 0.65 g/L h respectivamente (Tabla 5.1). Se obtuvieron valores menores de μ y concentración celular en el caso de las cinéticas con xilosa, debido a que el rendimiento energético es menor con este azúcar que cuando *E. coli* metaboliza glucosa en condiciones de fermentación (Lawford y Rousseau, 1995; Hasona et al. 2004).

Al utilizar la mezcla glucosa-xilosa (7.5 g/L-42.5 g/L, respectivamente) con acetato de sodio (2 g/L), la μ y concentración de biomasa fueron menores que en los casos donde se utilizó únicamente uno de estos azúcares con acetato, debido a que cuando un microorganismo crece en una mezcla de sustratos la μ es cercana a un promedio de la que se presenta en cada uno de los

sustratos de manera independiente (Kompala, 1996). En esta cinética se alcanzó un Y_{PS} del 93%, existiendo el fenómeno de represión catabólica (Brückner y Titgemeyer, 2002), pues aunque se observa un consumo parcialmente simultáneo de azúcares durante las primeras 12 h (Figura 5.3), no fue a la misma velocidad, y sólo cuando la glucosa se agotó en el medio de cultivo la xilosa se metabolizó a una mayor velocidad (de 0.27 a 1.08 g/L h). Este comportamiento también se ha observado en otras cepas etanológica como *E. coli* KO11 (Ohta et al. 1991) cuando se cultiva en presencia de xilosa y glucosa (Dumsday et al. 1999). Cuando el acetato fue omitido del medio de cultivo, con la mezcla de azúcares (glucosa-xilosa), se obtuvo el menor crecimiento y producción de etanol de todas las condiciones presentadas en esta sección, y un consumo parcial de los azúcares (Figura 5.3). Una posible explicación de esto es el gasto energético para la co-utilización de las dos fuentes de carbono debido a los mecanismos de expresión, regulación e inhibición para el consumo secuencial de los azúcares; la persistencia del fenómeno de represión catabólica; y la ausencia de acetato, que trae por consecuencia una baja concentración intracelular de acetyl CoA y otros componentes biosintéticos derivados de este metabolito.

Tabla 5.1. Parámetros cinéticos de *E. coli* MS04 en medio AM2 con glucosa (50 g/L); xilosa (50 g/L); o xilosa-glucosa (42.5 y 7.5 g/L), en presencia o ausencia de acetato de sodio (2 g/L)

Condiciones	μ (h ⁻¹)	Q_P (g _{EtOH} /L h)	Y_{PS} (%)
Glucosa	0.16	0.08	71
Glucosa - acetato	0.3	0.67	93
Xilosa	0.14	0.12	76
Xilosa – acetato	0.26	0.65	92
Glucosa – xilosa	0.08	0.04	52
Glucosa – xilosa – acetato	0.25	0.65	93

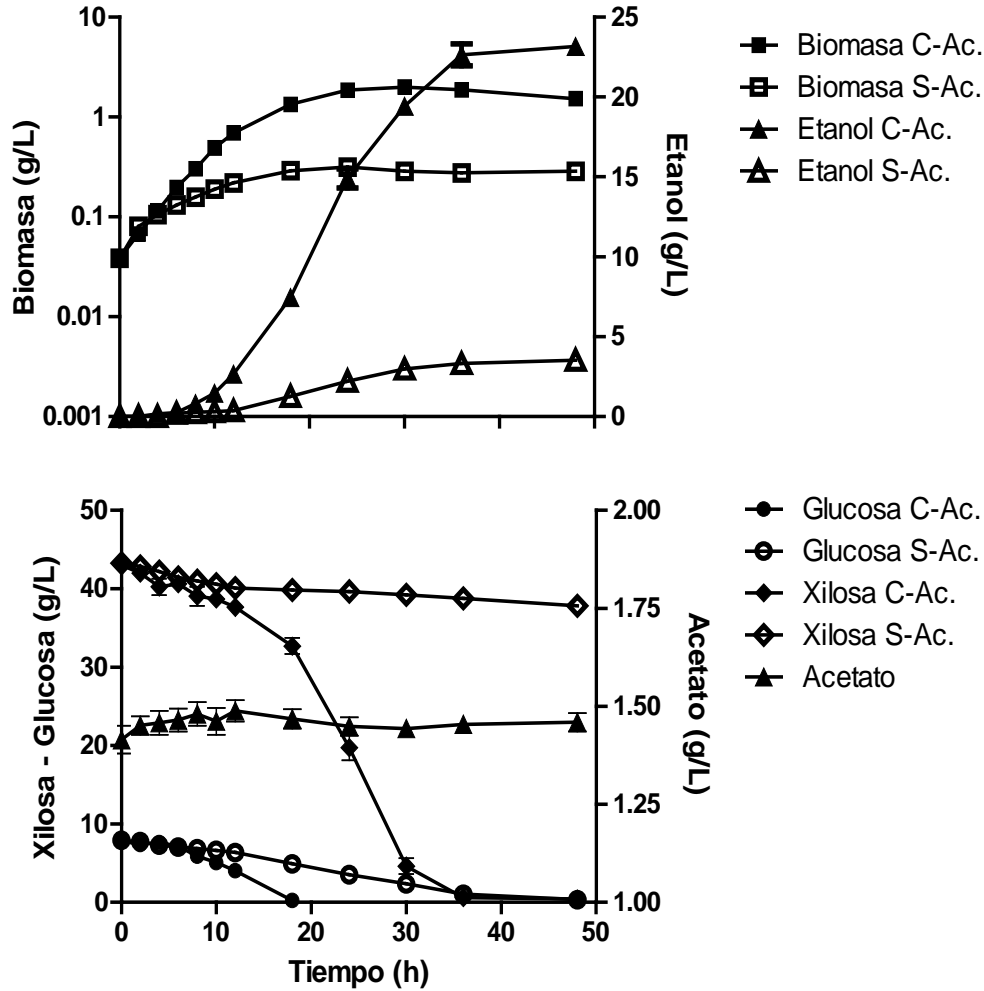


Figura 5.3. Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcares, y producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04 en condiciones no aireadas en medio mineral AM2 con xilosa (42.5 g/L), glucosa (7.5 g/L) y acetato de sodio (2 g/L). C-Ac: en presencia de acetato; S-Ac: en ausencia de acetato.

Los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04 en medio mineral en presencia de acetato se muestran en la tabla 5.2 y se comparan con los obtenidos con otras cepas de *E. coli* etanológicas como KO11, LY01, LY160, FBR5, SE378 y ET1bc en medios ricos y mínimos. En la tabla 5.2 se puede apreciar que la cepa *E. coli* MS04

presenta ciertas ventajas en su crecimiento y producción de etanol en medios mínimos con glucosa y xilosa.

Tabla 5.2. Comparación de parámetros cinéticos en medios mínimos y ricos de cepas de *E. coli* etanológicas

Cepa	Medio	Azúcares (g/L)	μ (h^{-1})	Q_P ($g_{EtOH}/L\ h$)	$Y_{P/S}$ (%)	Referencia
KO11	Rico	Glucosa (100)	---	0.76	100	Ohta et al. 1991
LY01	Rico	Xilosa (140)	---	0.85	85	Yomano et al. 1998
FBR5 ⁺	Rico	Glucosa (85)	---	0.77	90	Dien et al. 2003
SE378*	Rico	Xilosa (50)	---	0.38	82	Kim et al. 2007
ET1bc ⁺	Rico	Xilosa (100)	---	0.81	96	Wang et al. 2008
KO11	Mínimo	Glucosa (40)	0.45	0.32	67	Huerta-Beristain et al. 2008
LY160	Mínimo	Xilosa (90)	---	0.61	95	Yomano et al. 2008
MS04	Mínimo	Glucosa (50)	0.30	0.67	93	Este estudio
MS04	Mínimo	Xilosa (50)	0.26	0.65	92	Este estudio

En todas las cepas los genes *pdh*, *adhB* y/o *adhA* de *Zymomonas mobilis* se integraron en cromosoma, a excepción de las cepas FBR5 y ET1bc que tienen los genes en plásmidos (+). La cepa SE378 no tiene genes heterólogos (*). Los números entre paréntesis en la columna de azúcares indican su concentración.

Esta comparación de resultados, aunque no estrictamente con el mismo medio de cultivo, muestran a la cepa *E. coli* MS04 como una mejor cepa productora de etanol en medios minerales con acetato que la cepa KO11, la cual es sensible a bajas concentraciones de acetato, como

también lo son otras cepas etanológica reportadas en la literatura como *E. coli* FBR3 pLOI297 (Dien et al. 2003).

5.2 Cultivos continuos en una o múltiples etapas bajo condiciones no aireadas no permiten el consumo total de azúcares ni elevadas productividades de etanol respectivamente por *E. coli* MS04

La cepa *E. coli* MS04 se evaluó en cultivo continuo simple etapa (CCSE) con tasas de dilución (D) en el intervalo de 0.05 h^{-1} a 0.25 h^{-1} en medio mineral adicionado con xilosa-glucosa-acetato y en biorreactores con 750 mL de volumen de trabajo (1 L de capacidad). Como se observa en la figura 5.4, tanto la producción de biomasa, etanol y el consumo de glucosa-xilosa presentaron una relación inversa con la D, con un mayor consumo de sustratos y producción de biomasa y etanol a la D más baja (0.05 h^{-1}). Sin embargo, aunque a esta D toda la glucosa fue consumida (7.5 g/L), la xilosa residual fue aproximadamente 21 g/L, sin lograrse el consumo total de la misma, aunque sí su consumo simultáneo con glucosa. La Q_P máxima fue de $0.85 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{L h}$ ($D= 0.1 \text{ h}^{-1}$), la cual fue mayor que la obtenida en cultivo en lote ($0.65 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{L h}$) y mayor también a la que presentó *E. coli* KO11 en medio LB con glucosa y xilosa (20 g/L) de $0.48 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{L h}$ (Dumsday et al. 1999). A cualquier D utilizada las concentraciones de ácidos orgánicos como lactato, fumarato, succinato, formiato y piruvato fueron nulas, con un bajo consumo de acetato.

Los parámetros cinéticos en cultivo continuo como q_S y q_P mostraron una relación directa con la μ que en este caso es igual a la D. Para el caso de la relación q_S vs μ se pudo estimar la constante de mantenimiento (**m**) y el rendimiento de biomasa máximo (**Y_g**) del modelo de Pirt (Pirt, 1975,

Ec. 5); y para la relación q_p vs μ las constantes α y β del modelo de Luedeking-Piret (Luedeking y Piret, 1959, Ec. 6), que se denominan constantes de velocidad de producción asociadas y no asociadas al crecimiento respectivamente.

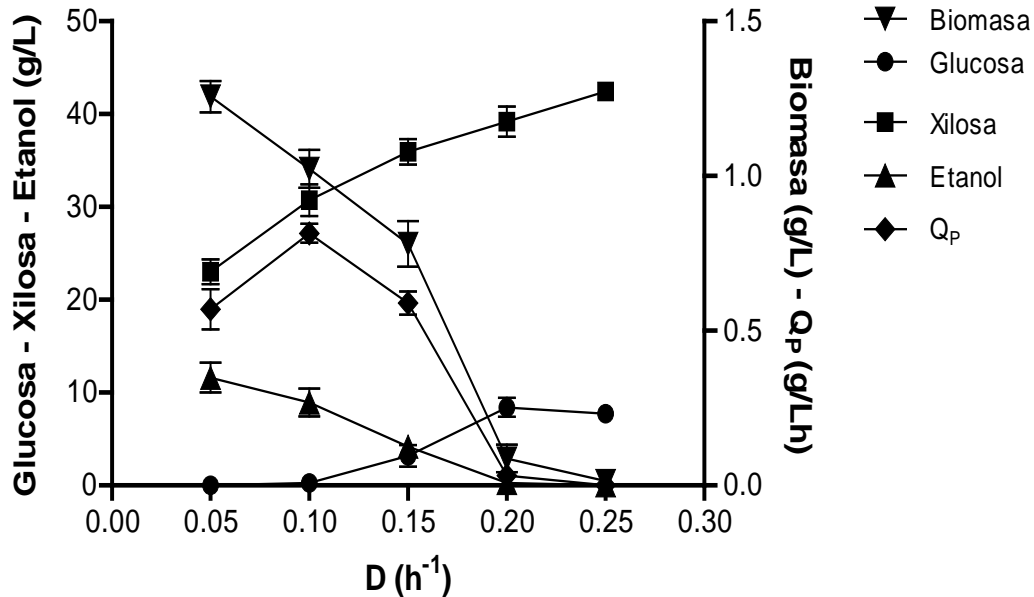


Figura 5.4. Relación entre la velocidad de crecimiento ($\mu = D$) y el consumo de glucosa-xilosa, producción de biomasa, y concentración y productividad volumétrica de etanol (Q_p) de la cepa *E. coli* MS04 en el estado estable de cultivo continuo en simple etapa bajo condiciones no aireadas. Medio de alimentación: medio mineral AM2 con xilosa (42.5 g/L), glucosa (7.5 g/L) y acetato de sodio (2 g/L).

Con respecto al consumo de sustratos, el valor estimado de m fue de 0.0375 g_{Sust}/g_{DWC} h, mientras que el de Y_g fue de 0.23 g_{DWC}/g_{Sust}. Para el caso de la producción de etanol, la constante α fue estimada en 3.21 g_{EiOH}/g_{DWC} y β en 0.35 g_{EiOH}/g_{DWC} h. Las constantes relacionadas con el consumo de sustrato (m y Y_g) indican que el valor de m es bajo comparado con el de otras bacterias como *Lactobacillus* y *Aerobacter* (0.1-0.15 g_{Sust}/g_{DWC} h; Pirt, 1975), o el de la misma *E. coli* creciendo en condiciones aerobias con valores entre 0.12-0.41 g_{Sust}/g_{DWC} h

(Zelic et al. 2004; Bhattacharya y Dubey, 1995), pudiendo ser el valor estimado de m de *E. coli* MS04 consecuencia del metabolismo anaerobio el cual gasta menos energía que el metabolismo aerobio.

$$q_s = m + \frac{\mu}{Y_g} + \frac{q_p}{Y_p} \quad \text{Ec. 5}$$

$$q_p = \alpha\mu + \beta \quad \text{Ec. 6}$$

El Y_g estimado es un límite teórico de la biomasa que se podría alcanzar si todo el sustrato consumido se utilizara para crecimiento, él cual es bajo comparado con el que se estima en condiciones aerobias (0.5 g_{DWC}/g_{Sust}) y puede ser atribuido a la distribución del consumo de sustrato para la producción de etanol. Con respecto a las constantes de producción estimadas (α y β), los valores de ambas constantes indican que la producción de etanol está asociada tanto a la fase exponencial como a la fase estacionaria de crecimiento, principalmente en esta última o cuando la cepa crece a una μ baja, por lo que es favorable operar los cultivos continuos a una baja μ para tener concentraciones de biomasa elevadas y así lograr una elevada concentración de etanol aunque la Q_p sería baja. Lo anterior en parte explicaría la tendencia de la producción de biomasa y etanol que se muestra en la figura 5.4 con un comportamiento asintótico. Con respecto al Y_{ps} este fue cercano al 80% en la D más baja, disminuyendo conforme incrementó la D . En comparación con el Y_{ps} obtenido en cultivo en lote (93%), el Y_{ps} en cultivo continuo fue menor (80% en el mejor de los casos) debido a que es obtenido en un solo estado estable, mientras que en cultivo en lote se estima en forma global durante toda la fermentación, sin embargo, este Y_{ps} (80%) es muy aceptable en comparación al mostrado por *E. coli* KO11 creciendo en medio LB

con una mezcla glucosa-xilosa (20 g/L) el cual fue del 78% a una D de 0.06 h^{-1} (Dumsday et al. 1999).

Una vez comprobado que no es posible el consumo total de azúcares (xilosa 42.5 g/L y glucosa 7.5 g/L) utilizando un solo reactor en cultivo continuo aún a baja D (0.05 h^{-1}) en condiciones no aireadas, se procedió a utilizar el cultivo continuo en múltiples etapas (CCME) (Bayrock e Ingledew, 2005), en el cual es posible incrementar el consumo de sustratos y la productividad de etanol. Los experimentos consistieron en operar en serie dos fermentadores (Figura 5.5), en los cuales el primer reactor fue operado a una baja D (0.05 h^{-1}) con el fin de generar una mayor concentración de biomasa para inocular con ésta el segundo reactor (Xu et al. 2005). El segundo reactor se operó a una D mayor (0.15 h^{-1}) con el fin de que las células produjeran etanol a una Q_P mayor. En esta configuración $F_0=F_1=F_2$, por lo cual el volumen de operación definió la D para cada etapa.

Los parámetros obtenidos al estado estable confirmaron la ventaja del uso de sistemas multietapa, pues en la segunda etapa incrementaron con respecto a los de la primera, en principio por el cambio a una mayor D y a la adaptación que puede existir en cada etapa del sistema a condiciones de estrés como la presencia de etanol (Páca, 1980; Xu et al. 2005). De igual forma el consumo de azúcares y la cantidad de biomasa incrementaron en la segunda etapa, además de que el sistema permitió un incremento sustancial en la Q_P en la segunda etapa con respecto a la primera. De acuerdo a esto, Laluece et al. (2002) reportan que en CCME con cinco reactores en cascada usado *S. cerevisiae* se obtuvieron concentraciones máximas de biomasa y etanol en la última etapa con un consumo gradual de sustrato en cada etapa hasta casi el consumo total del mismo (150 g/L de azúcares reductores). Sin embargo, en nuestro caso, aun teniendo dos etapas en cultivo continuo, las concentraciones de biomasa y etanol fueron bajas existiendo azúcares sin

consumir a la salida del segundo fermentador. Con respecto a estos resultados se propuso que la limitante de este sistema era la baja concentración de biomasa en la primera etapa, debido seguramente al oxígeno disuelto, el cual se sabe que limita el crecimiento celular en cualquier tipo de cultivo.

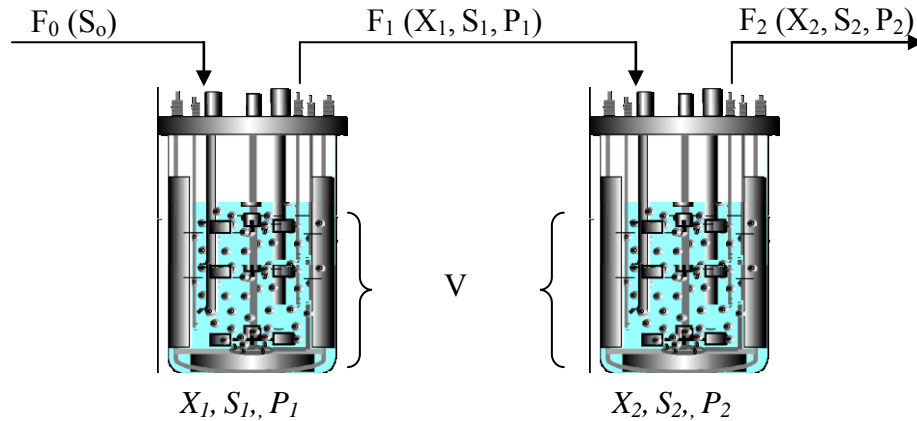


Figura 5.5. Esquema del cultivo continuo en dos etapas operando a un mismo flujo de alimentación y de descarga. F_0 flujo de alimentación con medio estéril; F_1 flujo de salida de la primera etapa y alimentación de la segunda; F_2 flujo de salida de la segunda etapa; S_0 concentración de sustratos en el medio de alimentación; X_1, S_1, P_1 concentración de biomasa, sustratos residuales y etanol respectivamente en la primera etapa; X_2, S_2, P_2 concentración de biomasa, sustratos residuales y etanol respectivamente en la segunda etapa; V , volumen de operación en los reactores.

Para probar la hipótesis planteada en el párrafo anterior se realizaron cultivos continuos ($D = 0.15 \text{ h}^{-1}$) en condiciones aireadas (0.5 vvm de aire) y 200 rpm ; bajo estas condiciones la concentración de biomasa y etanol alcanzadas fueron más del triple (datos no mostrados) en comparación a las obtenidas a la misma D pero en condiciones no aireadas.

5.3 La inactivación de la enzima alcohol deshidrogenasa II (AdhB) en condiciones aireadas impide una elevada producción de etanol por *E. coli* MS04 en cultivos continuos en dos fases

Se realizaron cultivos continuos en cascada en dos fases (CCDF) en los cuales la primera fue aireada y alimentada con medio mineral AM2 con 3 veces la concentración de sales del medio original para incrementar la producción de biomasa, y posteriormente alimentarla a una segunda fase no aireada y alimentada solamente con la mezcla de azúcares xilosa-glucosa (42.5 y 7.5 g/L respectivamente) y acetato de sodio (2.0 g/L) para tratar de favorecer la producción de etanol. La primera fase se operó a 1 vvm y 600 rpm ($k_{La} = 162 \text{ h}^{-1}$) ó 1 vvm y 800 rpm ($k_{La} = 528 \text{ h}^{-1}$); mientras que la segunda fase sólo se agitó a 400 rpm y se alimentó independientemente.

En la tabla 5.3 se muestran 3 condiciones (C1, C2 y C3), en las cuales se varió únicamente la velocidad de agitación en la primera fase, y/o el flujo de alimentación en la segunda fase. Por ejemplo, la primera fase de C2 y C3 operó a 800 rpm y 1 vvm de aireación ($D=0.1 \text{ h}^{-1}$); mientras que la segunda fase no aireada de C2 (400 rpm) se alimentó a un flujo igual al de su primera fase, correspondiendo a una $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$; en el caso de C3 el flujo de alimentación fue el doble de la primera fase correspondiendo a una $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ como se observa en la tabla 5.3. Los resultados muestran que la producción de biomasa en las primeras fases alcanzó una concentración importante, hasta $6.6 \text{ g}_{\text{DWC}}/\text{L}$; y que los azúcares fueron consumidos casi en su totalidad, aunque el etanol fue producido en una concentración baja debido a la aireación. En las segundas fases, la concentración de biomasa disminuyó, por un lado debido al efecto de dilución del segundo flujo de alimentación, y por otro a la baja velocidad de crecimiento (cercana a cero). La cantidad de azúcares consumidos fue semejante a los de las primeras etapas (de 32 a 45 g/L), sin embargo las concentraciones de etanol fueron muy bajas (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Parámetros en el estado estable de cultivos continuos en dos fases (CCDF) con la cepa *E. coli* MS04 en cada etapa y en forma global. La forma global representa una sola etapa con la suma de los volúmenes de trabajo y flujos de alimentación de las etapas individuales

	CCDF (Fase aireada, 1vvm)			CCDF (Fase No aireada)			CCDF (Global)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
k_{La} (h^{-1})	162	528	528	0	0	0			
F (mL/min)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	2.5	3.75
D (h^{-1})	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.15
Biomasa (g/L)	3.6	6.6	6.6	2.3	3.3	2.4	4.1	6.6	6.7
Azúcares (g/L)	46.3	40	39	44.7	43.2	32.3	91	83	71
Etanol (g/L)	12	4.3	4.0	12.4	6.3	3.5	18.4	8.4	6.2

Biomasa: Concentración del peso seco celular obtenido en el estado estable en cada fase

Etanol: Concentración de etanol obtenido en el estado estable en cada fase

Azúcares: Concentración de azúcares consumidos en cada fase

D: Tasa de dilución; **F:** Flujo de alimentación

A pesar de las bajas concentraciones de etanol en ambas fases, la Q_p en la condición de menor transferencia de oxígeno ($k_{La} = 162 h^{-1}$; 600 rpm) fue mayor a $1 g_{EtOH} / L h$ y disminuyó conforme la primera fase tuvo una mayor transferencia de oxígeno ($k_{La} = 528 h^{-1}$; 800 rpm) como se muestra en la figura 5.6. En ambas fases, a pesar de la aireación, la TOD fue siempre

0%. Por otro lado, el Y_{PS} siempre fue bajo en todas las fases y en forma global (Figura 5.6). Al producirse tan bajas concentraciones de etanol en las segundas fases se intuyó la posible producción de algún ácido orgánico como el acetato en lugar de la producción de etanol, sin embargo, al analizar las muestras por HPLC sólo se encontraron concentraciones máximas de 3.8 g/L de acetato, existiendo concentraciones trazas de otros ácidos orgánicos.

Al parecer, la razón principal por la cual en la segunda fase (no aireada) se consumió una cantidad considerable de azúcares (>40 g/L) y hubo una limitada producción de etanol, se debe a las bajas actividades específicas que presentaron las enzimas Pdc y AdhB bajo estas condiciones (Figura 5.7). En el caso de Pdc, las actividades específicas fueron bajas principalmente en las condiciones de mayor aireación (800 rpm); mientras que las menos aireadas (600 rpm) estuvieron en un valor aceptable (> 1 UI/mg_{Prot.}), sin embargo, al estimar los valores de actividad enzimática de AdhB se pudo observar que dichas actividades fueron casi nulas en ambos casos (cercasas a cero), lo que ocasionó que en ambas fases la producción de etanol fuera limitada. La baja actividad específica de AdhB en estos sistemas puede tener explicación en su inactividad en presencia de oxígeno debido a que en su sitio catalítico contiene Fe^{2+} que se oxida fácilmente a Fe^{3+} (Cabiscol et al. 1994; Tamarit et al. 1997); así, es muy probable que en la primera fase esta enzima se haya inactivado por la presencia de oxígeno en el sistema, permaneciendo inactiva en la segunda fase a pesar de no ser aireada, ya que la μ y el crecimiento celular fueron muy bajos en las segundas fases de los experimentos.

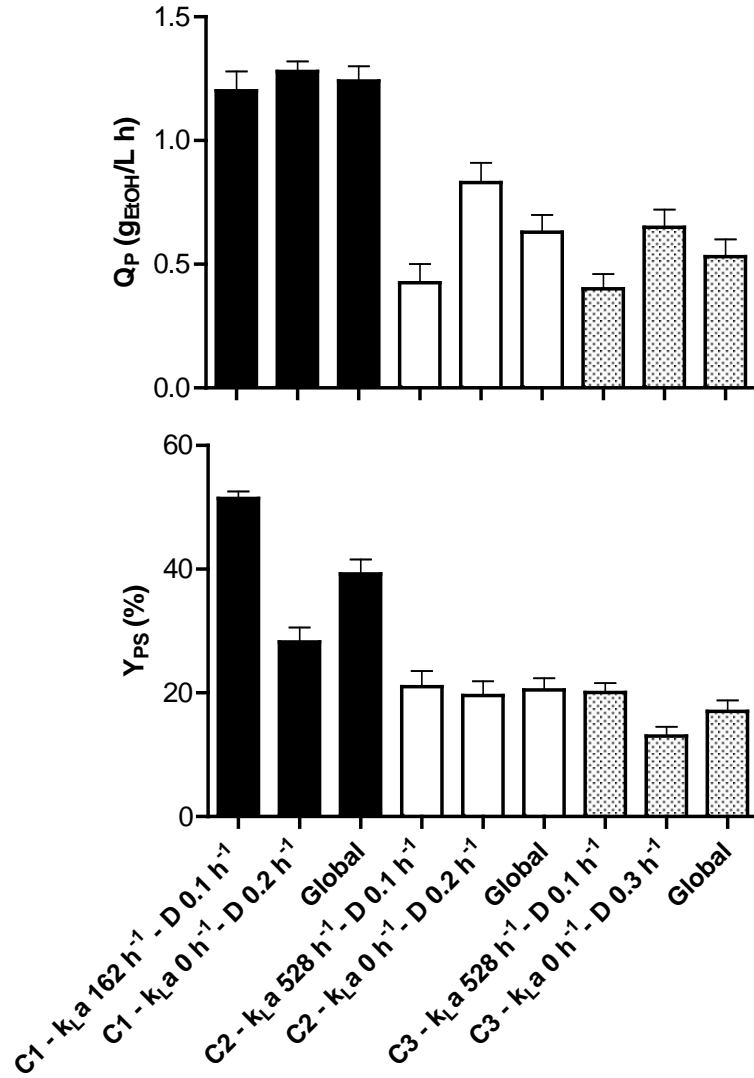


Figura 5.6. Productividades volumétricas (Q_p) y rendimientos de etanol (Y_{ps}) en cada fase de un cultivo continuo en dos fases (CCDF) de la cepa *E. coli* MS04. Cultivos alimentados en la primera fase con medio AM2 adicionado con xilosa (42.5 g/L), glucosa (7.5 g/L) y acetato de sodio (2 g/L); y en las segunda fase sólo con xilosa (42.5 g/L) y glucosa (7.5 g/L). C1, C2 y C3: condiciones 1, 2 y 3 respectivamente; D: tasa de dilución (h⁻¹).

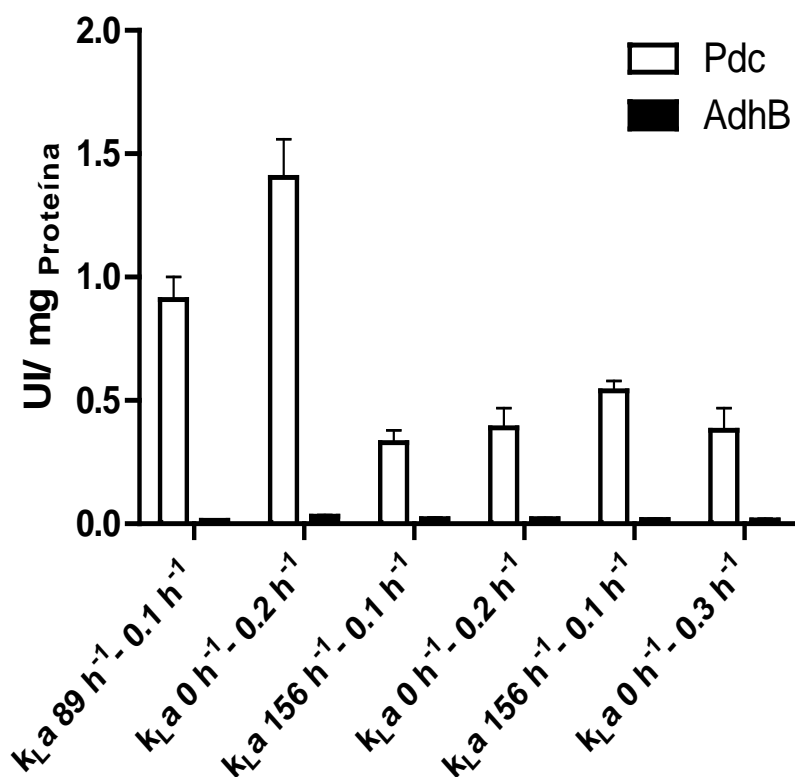


Figura 5.7. Actividades enzimáticas específicas de piruvato carboxilasa (Pdc) y alcohol deshidrogenasa II (AdhB) de *E. coli* MS04 en cada fase de cultivos continuos en dos fases (CCDF). Cultivos alimentados de la misma forma como se describe en la figura 5.6. C1, C2 y C3: condiciones 1, 2 y 3 respectivamente; D: tasa de dilución (h^{-1}).

5.4 Una baja transferencia de oxígeno (expresada como k_{La}) mejora el crecimiento y productividad de etanol por *E. coli* MS04 en medio mineral con glucosa, xilosa y acetato

5.4.1 Cultivo en lote con baja transferencia de oxígeno

Al observar los resultados con respecto a la producción de etanol en condiciones no aireadas y en cultivos en dos fases (aireados y no aireados), se decidió llevar a cabo cultivos en lote con baja

transferencia de oxígeno usando niveles de aireación de 0.0 - 0.2 vvm, con una agitación de 400 rpm, 37°C y pH 7.0; esto para promover un mayor crecimiento de la cepa sin provocar una baja actividad de Pdc y AdhB, y que además permitiera mantener niveles de oxígeno disuelto igual a cero para favorecer el proceso de fermentación de los azúcares a etanol. Estas cinéticas se realizaron con el fin de incrementar la Q_P y el Y_{PS} . En el caso de 0 vvm, se suministró nitrógeno gaseoso en el fondo del biorreactor a un flujo de 0.1 vvm para asegurar que el cultivo fuera anaerobio estricto. Además de los resultados obtenidos, en cada condición se determinó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA}). La figura 5.8 muestra una relación directa entre la concentración de biomasa y la aireación del sistema, al igual que lo muestra la velocidad volumétrica de consumo de azúcares, sin embargo, en las cinéticas de producción de etanol se puede observar que en el intervalo de 0.0 a 0.1 vvm la producción de etanol llegó a una misma concentración. En todos los casos, la condición anaerobia (0 vvm) fue la más lenta haciendo referencia a la necesidad de condiciones de bajos niveles de aireación para favorecer mayores productividades volumétricas de etanol por esta cepa. Con respecto a parámetros cinéticos, el Y_{PS} se mantuvo en un rango del 85-90% y sólo decreció en la condición de mayor aireación (0.2 vvm); mientras que la Q_P fue mayor en la condición de 0.1 vvm (1.25 g_{EiOH}/L h), duplicando casi a aquella lograda en condiciones anaerobias (0.76 g_{EiOH}/L h) como se muestra en la tabla 5.4.

Aunque la TOD fue cero en todos los casos, es un hecho que la transferencia de oxígeno se incrementó al aumentar la aireación, comprobado por los valores de k_{LA} determinados (y corregidos por el tiempo de respuesta del electrodo; Tabla 5.4). El valor de k_{LA} a 0.1 vvm (la mejor condición por una mayor Q_P) fue de 7.2 h⁻¹ (OTR = 49.7 mg O₂ /L h = 1.55 mmol O₂ /L h), el cual se utilizó posteriormente como criterio de escalamiento para fermentadores de 10 L.

Tabla 5.4. Parámetros cinéticos de la cepa *E. coli* MS04 en la fase exponencial de cultivo en lote con diferentes niveles de aireación. Medio AM2 con glucosa, xilosa y acetato de sodio

vvm (aire)	μ (h⁻¹)	Y_{P/S} (%)	Q_P (g_{EtOH}/L h)	k_{La} (h⁻¹)	OTR_{máx} (mgO₂/L h)
0.0	0.17	88.4	0.76	0	0
0.025	0.38	89.5	1.0	2.2	15.2
0.05	0.40	85.8	1.1	4.8	33.4
0.1	0.47	86.5	1.25	7.2	49.7
0.2	0.64	81.0	1.2	13.6	93.7

Con estos resultados se puede concluir que el oxígeno es un sustrato limitante en los cultivos de producción de etanol por la cepa MS04. Con respecto a lo anterior algunos investigadores han reportado el efecto benéfico de bajos niveles de aireación en la producción de etanol, por ejemplo, Okuda et al. (2007) reportan que una condición de aireación de OTR igual a 4 mmol O₂/L h incrementó el consumo de xilosa y la producción de etanol en *E. coli* KO11, comparada con una condición anaerobia y una de mayor OTR (15 mmol O₂/L h). Así mismo, Furlan et al. (1994) reportan que *Pichia stipitis* mejoró su rendimiento y productividad de etanol en condiciones de baja transferencia de oxígeno ($k_{La} = 4.8 \text{ h}^{-1}$) en comparación con una condición de mayor transferencia ($k_{La} = 35.4 \text{ h}^{-1}$).

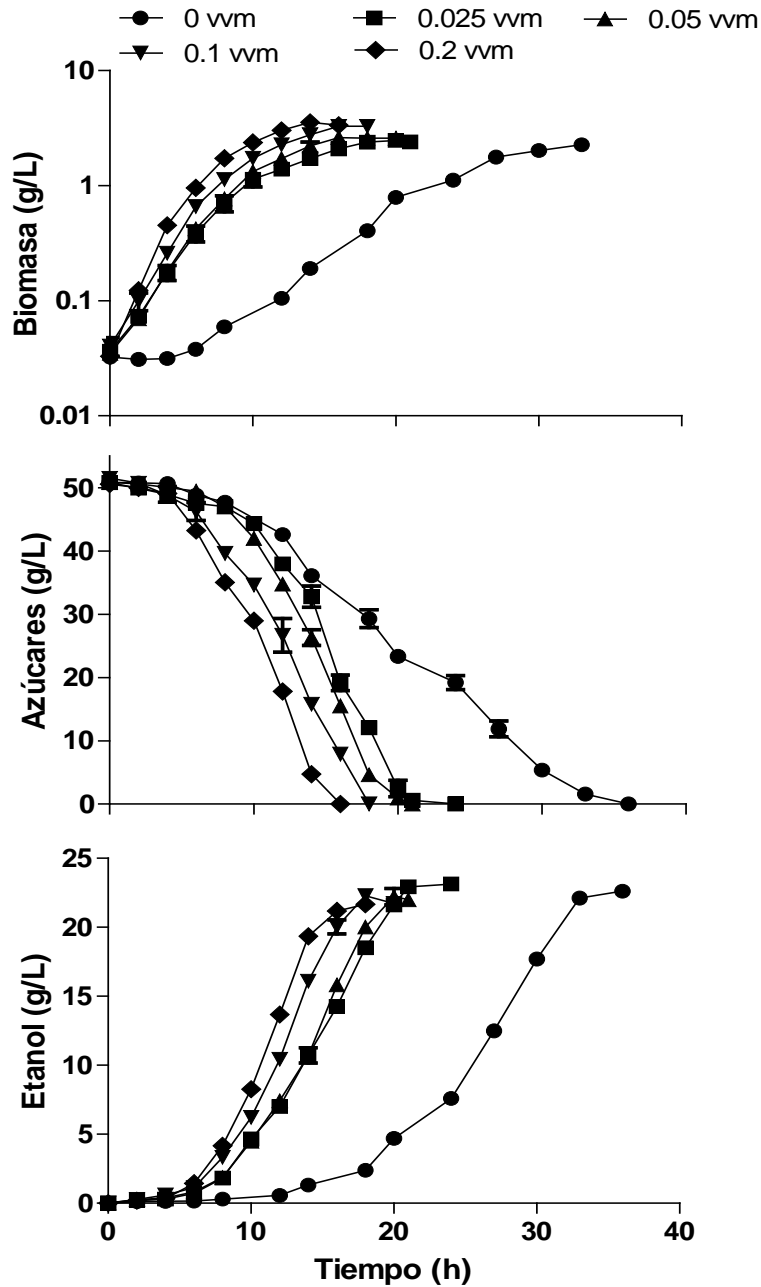


Figura 5.8. Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcares y producción de etanol en cultivo lote de la cepa *E. coli* MS04 en medio mineral con xilosa, glucosa y acetato de sodio (42.5-7.5-2.0 g/L) usando bajos niveles de aireación (vvm), a 400 rpm, 37°C y pH 7.0.

5.4.2 Escalamiento de la producción de etanol por *E. coli* MS04 empleando como criterio el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

Una vez determinada la condición de microaireación (0.1vvm y k_{La} 7.2 h⁻¹) donde se obtuvo la mayor productividad volumétrica de etanol sin reducir de manera considerable el rendimiento de etanol, se llevó a cabo el escalamiento ascendente de la fermentación utilizando un biorreactor de 14 L de capacidad manteniendo la similitud geométrica (relaciones que corresponden al diámetro de impulsor, diámetro de tanque, altura del impulsor, tipo y número de impulsores y altura de líquido) con respecto al biorreactor de 1 L. El volumen de trabajo fue de 9.16 L y se utilizó 0.1 vvm de aire en el sistema, tomando como criterio de escalamiento el k_{La} constante (Marques *et al.*, 2010). Para mantener el k_{La} constante (7.2 h⁻¹) se emplearon algunas correlaciones (Nielsen *et al.* 2003; Marques *et al.* 2010) para estimar la potencia volumétrica requerida en el sistema, manteniendo la velocidad superficial del gas constante, y así determinar un valor aproximado de agitación (rpm) necesaria para mantener el k_{La} en este valor; finalmente la velocidad de agitación se ajustó experimentalmente hasta obtener un k_{La} de 7.2 h⁻¹, correspondiente a una velocidad de agitación de 200 rpm.

Los resultados de las cinéticas de escalamiento en biorreactor con 9.16 L de volumen de trabajo a un k_{La} de 7.2 h⁻¹ se muestran en la figura 5.9; por cuestiones de comparación también se grafican la cinéticas llevadas a cabo en biorreactor de 750 mL de volumen de trabajo a 0.1 vvm y un k_{La} de 7.2 h⁻¹. En ambas escalas la TOD fue de 0% después de 2 horas de cultivo, aun cuando las fermentaciones fueron aireadas.

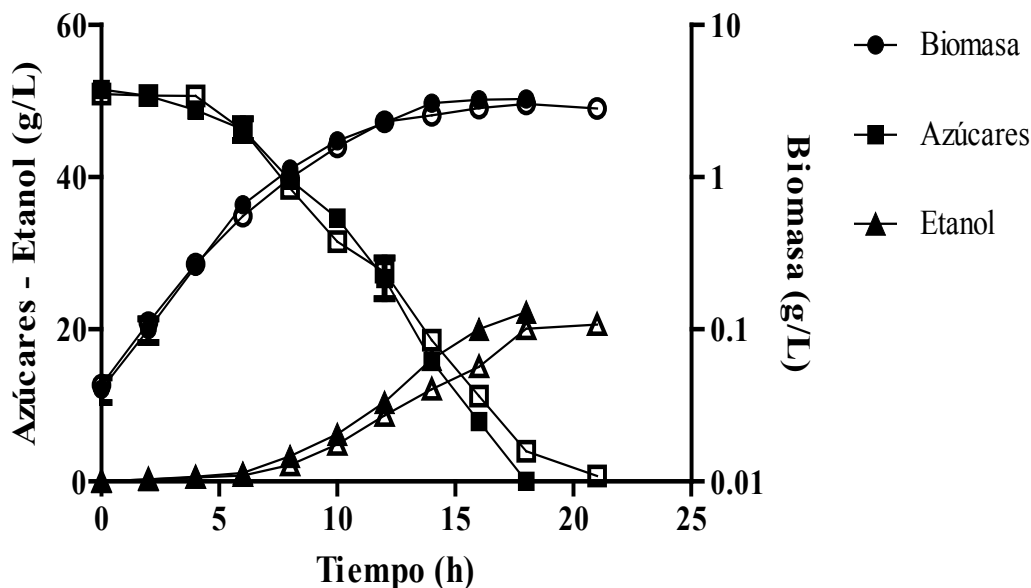


Figura 5.9. Cinéticas de escalamiento de la producción de etanol por *E. coli* MS04, utilizando el k_{La} como criterio de escalamiento, en medio mineral suplementado con xilosa (42.5 g/L), glucosa (7.5 g/L) y acetato de sodio (2.0 g/L). Condiciones: 0.1 vvm de aire, 37°C y pH 7.0. Símbolos rellenos representan cinéticas en biorreactor con un volumen de 750 mL a 400 rpm. Símbolos vacíos representan cinéticas en biorreactor con un volumen de 9.16 L a 200 rpm. Los azúcares representan la suma de glucosa y xilosa presente a diferentes tiempos en los cultivos.

Como puede observarse en la figura 5.9, al emplear el k_{La} como criterio de escalamiento para la producción de etanol por *E. coli* MS04 dio como resultado la obtención de cinéticas reproducibles en ambas escalas; tanto la producción de etanol y biomasa como el consumo de azúcares fueron muy semejantes, así como los parámetros cinéticos (μ , Y_{PS} y Q_P) (datos no mostrados). El escalamiento usando como criterio el k_{La} constante es uno de los más usados en cultivos aireados (Bandaipheth y Prasertsan, 2006; Islam et al. 2008), y aunque el cultivo que se escaló corresponde a un proceso en el que se lleva a cabo la transferencia de electrones de los azúcares a un producto final como el etanol para mantener un balance óxido-reducción adecuado,

la transferencia de bajos niveles de oxígeno permitió un incremento en la concentración biomasa lo cual favoreció la producción y productividad de etanol hasta alcanzar valores mayores de $1 \text{ g}_{\text{EtOH}} / \text{L h}$. La adición controlada de bajos niveles de aireación en un fermentador también tiene ventajas como manejar un valor de $k_L a$ constante, tener una presión positiva en el fermentador minimizando así riesgos de contaminación, además de no depender de la aireación superficial, la cual es difícil de estimar y controlar a escalas mayores, a parte de un bajo consumo de energía por los valores bajos de aireación, etc.

5.4.3 Cultivo continuo en dos etapas con baja transferencia de oxígeno

En base a los resultados presentados en las secciones anteriores, se realizaron cultivos continuos en dos etapas con baja transferencia de oxígeno ($k_L a$ 7.2 h^{-1} ; 0.1 vvm ; 400 rpm) a diferentes D para determinar el número de etapas necesarias para el consumo total de azúcares e incrementar la Q_P , además de estimar algunas constantes cinéticas de producción de etanol, crecimiento celular y consumo de sustratos. Los resultados en el estado estable de este sistema en sus dos etapas a distintas D ($0.05, 0.1, 0.15, 0.2$ y 0.3 h^{-1}) se muestran en las figuras 5.10 y 5.11 respectivamente.

Bajo esas condiciones fue posible consumir los 50 g/L de azúcares en una sola etapa cuando el sistema operó a $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ (Figura 5.10), con una producción de etanol de 20 g/L . Al incrementar la D , tanto la biomasa producida (que en el mejor de los casos fue de aproximadamente 2 g/L a $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$), como la concentración de etanol y los azúcares consumidos disminuyeron hasta casi alcanzar la concentración de azúcares en el flujo de alimentación a una $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ (Figura 5.10).

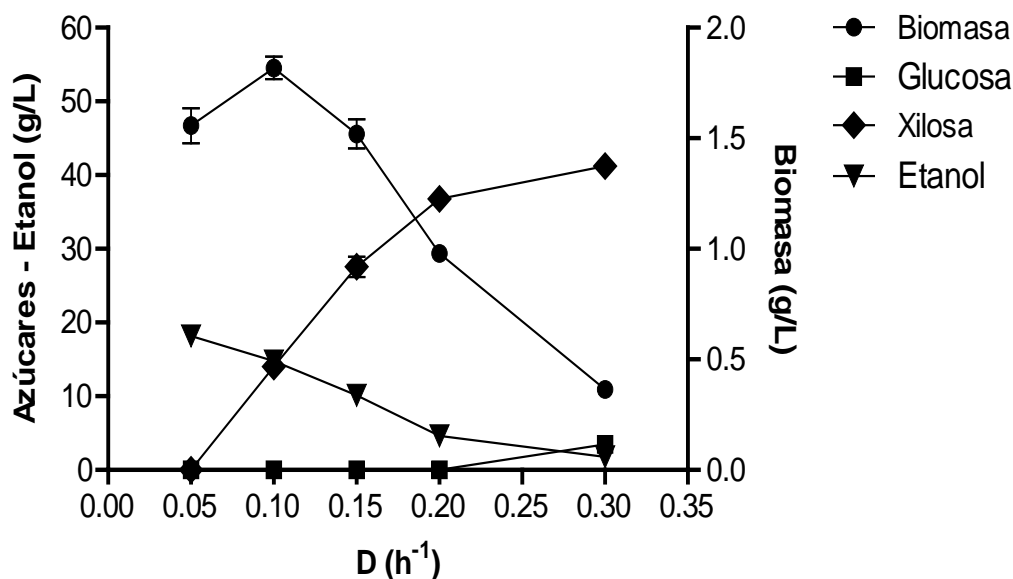


Figura 5.10 Concentraciones en el estado estable de biomasa, azúcares residuales y etanol a diferentes tasas de dilución (D) en la etapa 1 de un CCME limitado por oxígeno ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$). Sistema alimentado con medio AM2 adicionado con xilosa, glucosa y acetato de sodio.

En el caso de la segunda etapa (Figura 5.11) operada a las mismas D que la primera, al utilizar una $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ fue posible el consumo total de los azúcares con una producción de etanol de 20 g/L, igual a la obtenida con la $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$. De la misma forma, al incrementar la D , la biomasa, el etanol producido y los azúcares consumidos disminuyeron, con excepción del etanol a $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$ (Figura 5.11). La máxima Q_P de etanol se encontró a una $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$ en ambas etapas y en forma global ($1.5 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{L h}$), mientras que la misma Q_P se alcanzó en la primera etapa a $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$ y en las segundas etapas de los cultivos a $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$ y 0.3 h^{-1} (Figura 5.11). Con respecto al Y_{PS} , éste se mantuvo entre 75 y 85% (Figura 5.12), nuevamente estando por debajo del obtenido en cultivo en lote (90%); debido probablemente a los bajos valores de actividad enzimática de Pdc ($0.8 \text{ UI}/\text{mg}_{\text{Prot}}$) y AdhB ($0.3 \text{ UI}/\text{mg}_{\text{Prot}}$) encontrados en estas condiciones en comparación a los de cultivo en lote no aireado ($1.8 \text{ UI}/\text{mg}_{\text{Prot}}$ y $0.4 \text{ UI}/\text{mg}_{\text{Prot}}$); y

también, como ya se citó anteriormente, a que en cultivo en lote se presentan una amplia variedad de estados pseudoestables que contribuyen en conjunto a un mayor Y_{PS} en comparación al cultivo continuo donde sólo se encuentra un estado estable. En general los valores de actividad enzimática mostraron un ligero incremento conforme la D aumentó y también un valor mayor en las segundas etapas con respecto a las primeras.

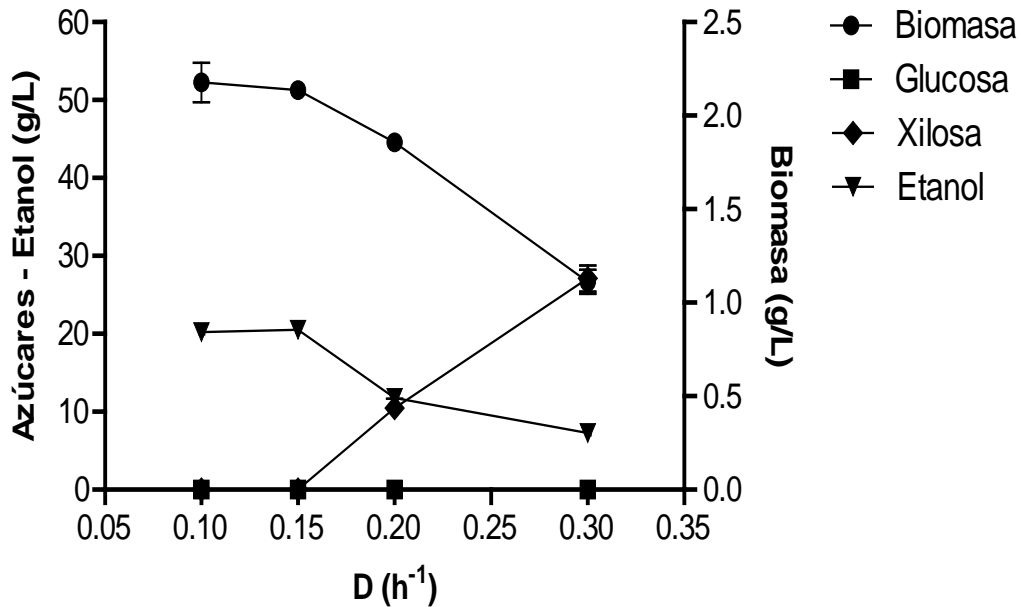


Figura 5.11. Concentraciones en el estado estable de biomasa, azúcares residuales y etanol a diferentes D en la Etapa 2 del CCME limitado por oxígeno ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$). Sistema alimentado sólo en la Etapa 1 como se describe en la figura 5.10.

Nuevamente los valores de las constantes m y Y_g del modelo de Pirt (Ec. 5), y aquellos del modelo de Luedeking-Piret (Ec. 6) en condiciones de baja transferencia de oxígeno ($k_{La} 7.2 \text{ h}^{-1}$; 0.1 vvm) fueron estimados, confirmando que la producción de etanol con *E. coli* MS04 está asociada tanto a la fase de crecimiento como a la de no crecimiento, según las constantes de producción de etanol α y β ($3.21 \text{ g}_{EtOH}/\text{g}_{DWC}$ y $0.44 \text{ g}_{EtOH}/\text{g}_{DWC} \text{ h}$, respectivamente).

Por otro lado las constantes de consumo de sustrato para mantenimiento (m) y rendimiento teórico máximo (Y_g) se estimaron en $0.143 \text{ g}_{\text{Sust}}/\text{g}_{\text{DWC}} \text{ h}$ y $0.35 \text{ g}_{\text{DWC}}/\text{g}_{\text{Sust}}$ respectivamente, siendo mayores a las encontradas en condiciones no aireadas en este mismo trabajo. Estas diferencias probablemente se deban a cambios en el metabolismo de la cepa en condiciones microaireadas donde se pudieron activar vías metabólicas como cadena respiratoria y ciclo de Krebs, lo cual representa un mayor gasto energético para la célula.

En este estudio la cepa *E. coli* MS04 fue capaz de consumir hasta 50 g/L de azúcares (xilosa-glucosa) y producir hasta 20 g/L de etanol en un cultivo continuo en una etapa ($D = 0.05 \text{ h}^{-1}$) o utilizando dos etapas ($D = 0.1$ o 0.15 h^{-1}) con un $k_{\text{La}} = 7.2 \text{ h}^{-1}$, lo cual compara favorablemente con otros cultivos continuos de múltiples etapas de cepas modificadas genéticamente de *S. cerevisiae* para producir etanol a partir de pentosas. Por ejemplo, Govindaswamy y Vane (2010) reportan que *S. cerevisiae* 424A-LNH-ST no fue capaz de consumir toda la xilosa presente en una mezcla de azúcares (glucosa 33 g/L - xilosa 16 g/L) en medio rico, incluso usando 3 etapas, a bajas tasas de dilución ($D < 0.05 \text{ h}^{-1}$). En otro ejemplo, Toon et al. (1997) reportan que utilizando la misma cepa (*S. cerevisiae* 424A-LNH-ST) en cultivo continuo en dos etapas con medio rico (24 g/L de glucosa y 34 g/L de xilosa) la cepa fue capaz de consumir toda la glucosa y sólo 29 g/L de xilosa en cultivos operados a una $D = 0.043 \text{ h}^{-1}$. Lo anterior muestra la eficiencia de la cepa *E. coli* MS04 para producir etanol a partir de pentosas y hexosas en medios mínimos en sólo una o dos etapas de cultivo continuo, sin embargo, aun con estas ventajas el Y_{PS} apenas fue cercano al 85%, lo cual debe ser mejorado y mantenido por arriba del 90% como ocurre en cultivos en lote de la misma cepa etanológica.

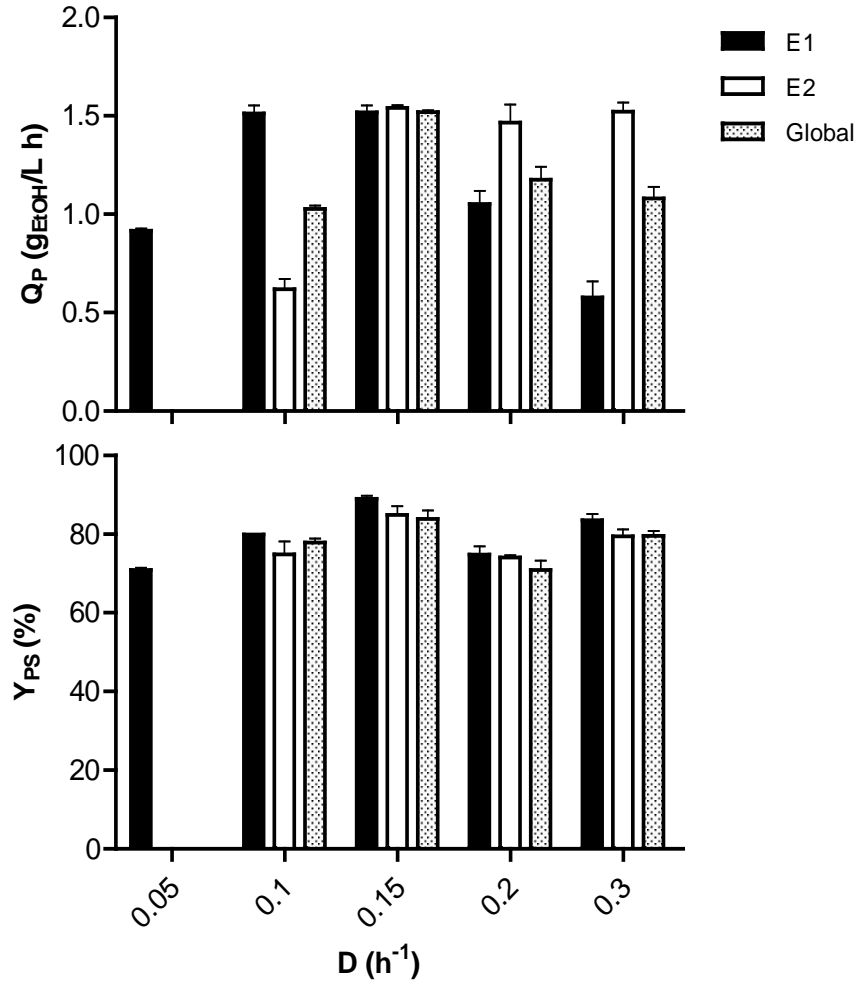


Figura 5.12. Productividades volumétricas (Q_P) y rendimientos de etanol (Y_{PS}) en cada etapa y en forma global de cultivos continuos en dos etapas microaireados de la cepa *E. coli* MS04 en medio AM2 con xilosa (42.5 g/L), glucosa (7.5 g/L) y acetato de sodio (2 g/L).

5.4.4 Evaluación de las constantes cinéticas estimadas y del modelo cinético de inhibición por etanol en cultivo en lote y continuo

Con las constantes estimadas de crecimiento, consumo de sustratos y producción de etanol se evaluaron diferentes modelos cinéticos de crecimiento y producción de etanol, de los cuales el

modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales, por simulación de bioprocesos, fue el de Aiba y Shoda (1969) (Ec. 7), el cual es un modelo hiperbólico que relaciona la velocidad específica de crecimiento con la concentración de producto inhibitorio (P ; etanol), y toma en consideración la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}), la concentración del sustrato limitante (S ; azúcares), la constante de saturación por sustrato (K_S) y una constante de inhibición por etanol (K_P), análoga a K_S .

$$\mu = \left(\frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \right) \left(\frac{1}{1 + (P / K_P)} \right) \quad \text{Ec. 7}$$

El valor calculado de K_S para *E. coli* MS04 en ambos azúcares fue de 0.6 g/L, lo cual muestra una elevada afinidad por la glucosa y xilosa presentes en un medio de cultivo; para el caso de K_P , estimada en 3.7 g_{EiOH}/L, este valor representa la concentración de etanol en la cual la velocidad específica de crecimiento se reduce a la mitad con respecto a la condición sin producto inhibitorio (Aiba y Shoda, 1969). Esta concentración de etanol es muy baja si se compara con el valor que generalmente presenta *S. cerevisiae* de aproximadamente 20 g/L (Daugulis y Swaine, 1987). Utilizando las constantes cinéticas estimadas y el modelo de Aiba y Shoda en un simulador generado en el programa *Mathematica* 8.0 (Wolfram Research, USA), fue posible describir el comportamiento y producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04 en cultivo en lote y continuo con la mezcla xilosa, glucosa y acetato de sodio (42.5, 7.5 y 2.0 g/L) con muy buenas aproximaciones (Figura 5.13), sin embargo, al tratar de optimizar el proceso de producción de etanol en CCME con el medio AM2 y la mezcla de azúcares y acetato de sodio bajo las condiciones de operación antes descritas, se encontró que la máxima productividad volumétrica de etanol que se alcanzaría sería de 1.5 g_{EiOH}/L h en cualquier configuración que se utilice, es

decir cambiando el flujo o la tasa de dilución en las diferentes etapas y que serían necesarios sólo dos etapas para alcanzar esa productividad y el consumo total de los azúcares.

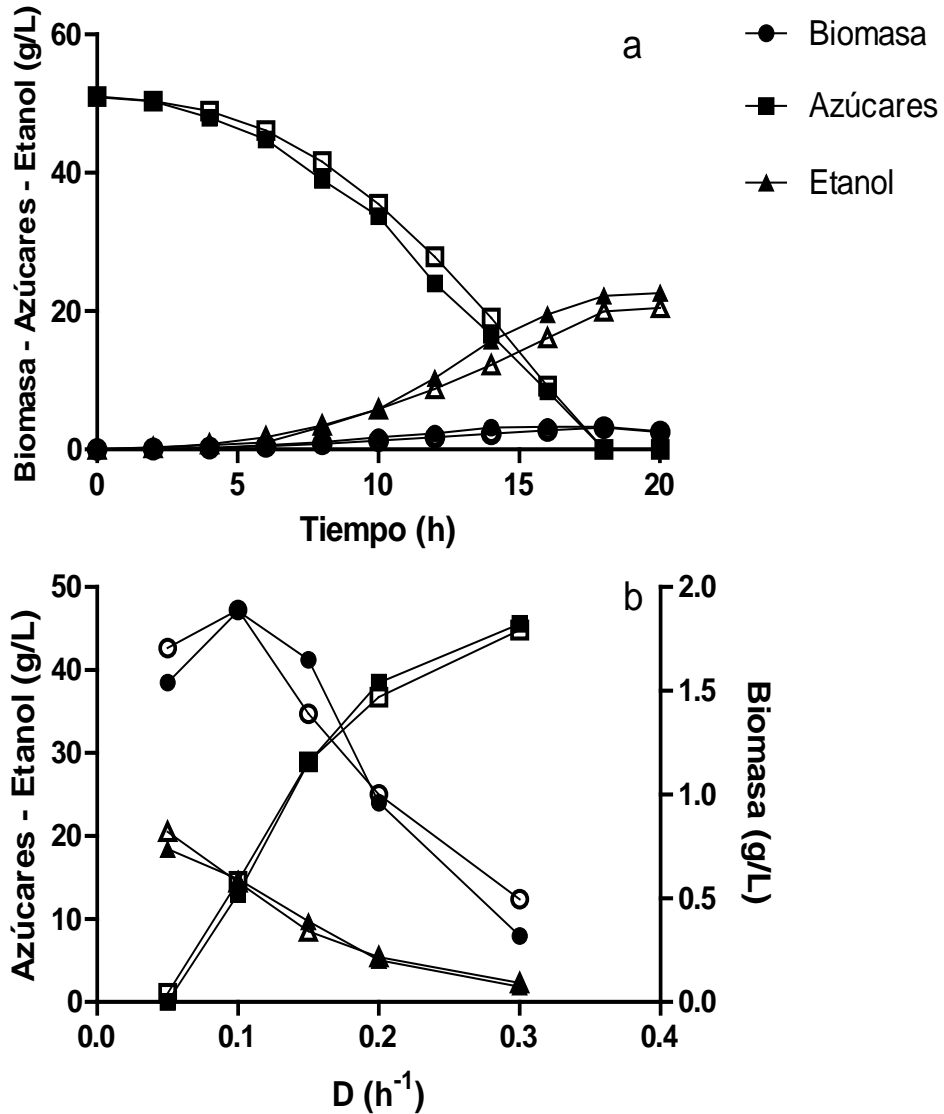


Figura 5.13. Comparación de los datos experimentales (símbolos rellenos) de la cepa *E. coli* MS04 obtenidos en cultivo en lote (a), y continuo simple etapa (b) microaireados ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$), con aquellos generados en un simulador con el modelo de Aiba y Shoda utilizando las constantes cinéticas estimadas (símbolos vacíos).

Sin embargo, al evaluar en el simulador un valor de K_P de 20 g_{EtOH}/L para *E. coli* MS04 (como es el caso de *S. cerevisiae*) en cultivo continuo, se encontró que se podría alcanzar una productividad volumétrica de etanol de 3.0 g/L h con un consumo prácticamente total de los azúcares (50 g/L) en una sólo etapa, de esta manera se puede determinar como la inhibición por etanol afecta considerablemente la productividad de etanol y el consumo de azúcares en estos sistemas.

5.5 La cepa *E. coli* MS04 es capaz de crecer y producir etanol en presencia de elevadas concentraciones de acetato de sodio, siendo la concentración no disociada de ácido acético la causante de la inhibición del crecimiento

Como se ha citado antes, la cepa *E. coli* MS04 requiere acetato en bajas concentraciones en el medio de cultivo para alcanzar una concentración de biomasa elevada e incrementar su producción de etanol en condiciones no aóreas, por lo tanto, se decidió evaluar distintas concentraciones de acetato de sodio (0 - 40 g/L) con el objetivo de determinar las concentraciones que promueven el crecimiento o inhibición en esta cepa, ya que los hidrolizados de hemicelulosa contienen de 2 a 15 g/L de acetato (Zaldivar et al. 1999; Martinez et al. 2001). En el presente estudio, el pH del medio fue controlado a 7.0 y utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch fue posible calcular la concentración de la forma no disociada de ácido acético (0.5%) así como la concentración disociada del ion acetato (99.5%) al emplear distintas concentraciones de acetato de sodio. También se llevaron a cabo pruebas manteniendo constante la concentración de acetato de sodio (2 g/L) y variando el pH del medio de cultivo, modificando

así las concentraciones de las formas no disociadas (0.5-8%) y disociadas de ácido acético (92-99.5%).

Los resultados de las cinéticas de crecimiento de la cepa *E. coli* MS04 en presencia de acetato de sodio mostraron que los niveles para alcanzar una elevada concentración de biomasa y etanol están en el intervalo de 2 a 10 g/L, con una disminución en la velocidad de crecimiento cuando el acetato de sodio se omitió del medio de cultivo (Tabla 5.5). A concentraciones mayores a 10 g/L el efecto inhibitorio del acetato fue notable, impidiéndose el consumo total de glucosa al utilizar 30 y 40 g/L de acetato de sodio, sin embargo, el crecimiento no cesó aun cuando se emplearon concentraciones de 40 g/L. Con respecto a los parámetros cinéticos se observó que a concentraciones mayores a 10 g/L de acetato de sodio, la mayoría de estos (μ , Y_{PS} y Q_P) disminuyeron por el efecto inhibitorio del acetato (Tabla 5.5). El comportamiento de esta cepa en presencia de bajas concentraciones de acetato con el incremento de sus parámetros cinéticos se discutió en las secciones 5.1 y 5.1.1.

El ácido acético en solución existe en dos formas, dependiendo del pH del medio y de su pK_a (4.76). La forma no disociada (CH_3COOH) existe en mayor proporción a pH menor al pK_a , mientras que la forma disociada (CH_3COO^-) se encuentra en mayor proporción a pH mayor al pK_a . Ambas formas tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento microbiano, pero la forma no disociada es más inhibitoria que la forma disociada (Presser et al. 1997). El mecanismo de inhibición que se ha propuesto por ácidos orgánicos en su forma no disociada consiste en que estas moléculas son capaces de difundir a través de la membrana celular, disociarse en el citoplasma y liberar protones reduciendo así el pH intracelular e incrementando el gradiente de pH (ΔpH). Lo anterior provoca una descompensación en la fuerza protón motriz, la cual es

utilizada para el transporte de diversas moléculas, síntesis de ATP, locomoción y control del pH intracelular (Zilberstein et al. 1984). El ión acetato aunque menos tóxico, se ha reportado que se acumula en el citoplasma de *E. coli* hasta valores de 240 mM cuando crece en presencia de 8 mM de ácido acético en el medio de cultivo con desplazamiento de iones fisiológicos como el glutamato (Roe et al. 1998), provocando que la célula desvíe parte de su energía para reducir la concentración intracelular de acetato al inducir un sistema de transporte, el cual ocasiona que disminuya el rendimiento celular (Takahashi et al. 1999).

Dado que la concentración de acetato de sodio para un adecuado crecimiento y producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04 a pH 7.0 estuvo en el rango de 2 a 10 g/L, se procedió a evaluar el efecto del pH (pH: 5.8, 6.2, 6.6 y 7.0) sobre el crecimiento de la cepa en las condiciones de cultivo antes mencionadas con 2 g/L de acetato de sodio y 50 g/L de glucosa. El objetivo de estos experimentos fue determinar el pH mínimo de crecimiento de la cepa en presencia de acetato de sodio y relacionar una posible inhibición con la concentración no disociada o disociada del ácido acético. Los resultados de estas cinéticas mostraron que en el intervalo de pH de 6.6 - 7.0 el crecimiento fue el óptimo seguido de la condición a pH 6.2; a pH 5.8, tanto el crecimiento como el consumo de glucosa y producción de etanol fueron los más bajos. En la tabla 5.5 también se observa una relación directa entre el pH y la μ en la cepa *E. coli* MS04 al igual que la Q_p , sin embargo, el Y_{ps} no se afectó demasiado. Los resultados anteriores mostraron un efecto desfavorable a pH ácido (5.8 y 6.2), pues a estos valores (los cuales se aproximan al pK_a del ácido) la toxicidad del ácido acético incrementó debido a una mayor concentración de la forma no disociada (Takahashi et al. 1999), la cual fue mayor a 60 mg/L, considerando que la inhibición de crecimiento por *E. coli* ocurre a concentraciones mayores a 30 mg/L (Luli y Strohl, 1990). En los experimentos reportados en la tabla 5.5, concentraciones mayores a 30 mg/L de la

forma no disociada del ácido acético se alcanzaron al evaluar concentraciones de 10 - 40 g/L de acetato de sodio, razón por la cual el efecto inhibitorio del ácido acético se empezó a observar. También el efecto del ión acetato pudo haber inhibido el crecimiento celular por un efecto osmótico potenciado por la glucosa (50 g/L), o por acumularse intracelularmente alterando la osmolaridad del citoplasma (Roe et al. 1998).

Tabla 5.5. Parámetros cinéticos de *E. coli* MS04 en condiciones no aireadas evaluando diferentes concentraciones de acetato de sodio y valores de pH en medio mineral con glucosa

Acetato de sodio (g/L)	pH	μ (h ⁻¹)	Y _{PS} (%)	Q _P (g _{EtOH} /L h)
2	5.8	0.13	87	0.3
2	6.2	0.24	93	0.63
2	6.6	0.26	93	0.68
2	7.0	0.30	92	0.67
0	7.0	0.16	70	0.08
5	7.0	0.30	91	0.64
10	7.0	0.28	88	0.61
20	7.0	0.17	87	0.32
30	7.0	0.11	82	0.17
40	7.0	0.08	77	0.06

Otros autores han reportado el mismo fenómeno de inhibición por la forma disociada de ácidos orgánicos utilizando distintos valores de pH, por ejemplo, Presser et al. (1998) mostraron que

conforme la concentración de ácido láctico incrementó, el pH mínimo que permitió el crecimiento de *E. coli* incrementó también debido a que la inhibición de la μ fue proporcional a la concentración de la forma no disociada del ácido láctico. Takahashi et al. (1999) también investigaron el efecto de diferentes valores de pH en medio LB con glucosa (80 g/L) y acetato de sodio (5 g/L) sobre la cepa *E. coli* KO11 observando que el consumo de glucosa y el Y_{PS} se afectaron a bajos valores de pH, principalmente al valor más bajo (5.5) como resultado de la elevada concentración de la forma no disociada del ácido a este pH.

Para descartar algún efecto del pH sobre la disminución de la μ de la cepa *E. coli* MS04 en las condiciones de prueba, se llevaron a cabo cultivos aireados a pH 5.8 y 6.2 en medio AM2 con glucosa (2 g/L) sin la adición de acetato de sodio. En comparación con pH 7, los resultados de estos cultivos mostraron que la μ decreció sólo 6 y 12% respectivamente, demostrando que el pH no fue la principal causa de la disminución de la μ bajo condiciones no aireadas. La figura 5.14 muestra de una mejor manera la relación que existe entre la μ de la cepa *E. coli* MS04 y la concentración de la forma no disociada del ácido acético, esta relación inversamente lineal es independiente de cómo se obtenga la concentración de la forma no disociada del ácido, ya sea utilizando diferentes concentraciones de acetato de sodio (pH 7.0) o diferentes valores de pH (2 g/L de acetato de sodio).

Para complementar este estudio, en experimentos posteriores utilizando ácido láctico y ácido propiónico, se igualaron algunas concentraciones de la forma no disociada del ácido acético que ya se habían evaluado, con las formas no disociadas del ácido láctico y propiónico (Tabla 5.6). El medio de cultivo empleado fue el AM2 adicionado con glucosa (50 g/L) y acetato de sodio (2 g/L), además de diferentes concentraciones de ácido láctico o ácido propiónico. En forma

general se observó el mismo comportamiento en la μ y otros parámetros cinéticos cuando se compararon bajo las mismas concentraciones de la forma no disociada de los ácidos empleados, aunque cuando se evaluaron elevadas concentraciones de ácido láctico y propiónico (para igualar algunas concentraciones de la forma no disociada del ácido acético), hubo una mayor inhibición, seguramente debido a un efecto osmótico (Tabla 5.6). De esta manera se pudo corroborar que es la concentración de la forma no disociada del ácido acético la que causa la mayor inhibición en el crecimiento y la producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04.

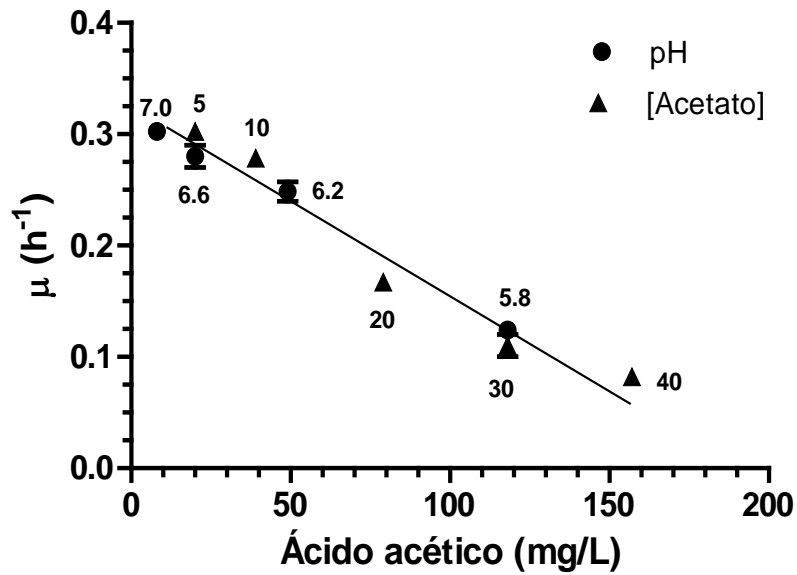


Figura 5.14. Relación entre la μ de *E. coli* MS04 y la concentración de la forma no disociada de ácido acético obtenida variando las concentraciones de acetato de sodio o el pH del medio de cultivo. Los números en los símbolos indican concentraciones de acetato de sodio o valores de pH. Cultivo en lote en condiciones no aireadas en medio AM2 con glucosa (50g/L).

Tabla 5.6. Parámetros cinéticos de la cepa *E. coli* MS04 en medio mineral a pH 7.0 con glucosa y diferentes concentraciones de acetato, lactato o propionato

Ácido	μ (h ⁻¹)	Y _{PS} (g _{EtOH} /g _{Glc}) (%)	Q _P (g _{EtOH} /L h)
Acetato (5 g/L)*	0.3	91	0.64
Acetato (10 g/L)**	0.28	88	0.61
Acetato (40 g/L)***	0.08	77	0.06
Lactato (16 g/L)*	0.27	86	0.49
Lactato (43.2 g/L)**	0.18	89	0.46
Propionato (1.6 g/L)*	0.28	84	0.48
Propionato (20.3 g/L)***	0.1	83	0.11

Cinéticas con el mismo símbolo (*,**,***) representa la misma concentración de la forma no disociada del ácido respectivo.

5.6 La cepa etanológica *E. coli* MS04 es más tolerante a acetato que la cepa parental *E. coli* MG1655 en condiciones no aireadas

Con el fin de tener un control y hacer un estudio comparativo más riguroso, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento con la cepa parental (*E. coli* MG1655) en las mismas condiciones empleadas con la cepa *E. coli* MS04, usando acetato de sodio en el rango de 0 a 40 g/L en minifermentadores a pH 7.0 bajo condiciones no aireadas. Los resultados de las cinéticas de la cepa parental *E. coli* MG1655 mostraron que la inhibición por acetato de sodio se presentó a

partir de 5 g/L, tanto en el crecimiento celular como en el consumo de glucosa, con un decremento muy apreciable de las variables de estado a partir de 20 g/L (datos no mostrados). La μ se redujo a sólo el 7% con 40 g/L de acetato de sodio con respecto al valor en la ausencia de acetato. En cambio la μ de la cepa *E. coli* MS04 mejoró 70% en promedio cuando el acetato de sodio se adicionó en el rango de 2 a 10 g/L, pero no de bajo de 2 g/L. Interesantemente los valores de μ fueron similares cuando se evaluaron concentraciones de acetato de sodio entre 2 y 10 g/L. La concentración de acetato de sodio que redujo la μ un 50% (IC₅₀) con respecto a la condición en ausencia de acetato en las cepas *E. coli* MG1655 y MS04 fueron 10 g/L (30 mg/L de ácido acético) y 40 g/L (157 mg/L de ácido acético) respectivamente. Similar a la cepa parental, la μ de la cepa *E. coli* MS04 decreció cuando la concentración de acetato de sodio incrementó por arriba de 10 g/L, sin embargo los valores de μ de la cepa *E. coli* MS04 fueron mayores que los de la cepa *E. coli* MG1655 cuando se evaluaron concentraciones de acetato de sodio mayores a 10 g/L.

Con respecto a otras cepas silvestres, la μ de *E. coli* W3110 decreció hasta 80% en presencia de 5 g/L de acetato en medio rico a 30°C (Chohnan et al. 1997), y en el caso de *E. coli* JM105 la μ decreció casi el 50% en presencia de sólo 5 g/L de acetato en medio rico y 37°C (Luli y Strohl, 1990). También, el crecimiento de la cepa *E. coli* K12 (cepa progenitora de la cepa *E. coli* MG1655, de la cual deriva *E. coli* MS04) se evaluó en medio mineral con glucosa (acetato: 0-20 g/L) a pH 7.0 en un biorreactor agitado a 800 rpm y 1 vvm de aire encontrando una reducción en la μ de aproximadamente 50% con 10 g/L de acetato de sodio (Aristidou et al. 1999).

En otros estudios con cepas etanológicas, Lawford y Rousseau (1993) y Takahashi et al. (1999) observaron un comportamiento similar a *E. coli* MS04 cuando trabajaron con *E. coli* B

(pLOI1597) y *E. coli* KO11 respectivamente, en medio LB a pH 7.0 y 10 g/L de acetato de sodio, sin existir una gran inhibición en el crecimiento de estas cepas. Sin embargo, la inhibición en el crecimiento celular producida por ácidos orgánicos se incrementa cuando se utilizan medios mínimos y otros azúcares como pentosas; tal y como reportan Zaldivar e Ingram (1999), quienes evaluaron la tolerancia a acetato de la cepa etanológica *E. coli* LY01 en medio LB adicionado con xilosa (30°C y pH 7.0) en condiciones no aireadas. Estos investigadores reportaron la completa inhibición del crecimiento en presencia de 25 g/L de acetato; como estos autores, otros también han reportado el mismo fenómeno (Lawford y Rousseau, 1993; Takahashi et al. 1999; Foster, 2000). Extrapolando la tendencia de la figura 5.14, ésta indica que una concentración aproximada de 190 mg/L de ácido acético sería la concentración de inhibición total del crecimiento de *E. coli* MS04 correspondiendo a 34.3 g/L del ion acetato a pH 7.0 en medio mínimo. En resumen estos resultados sugieren que la cepa *E. coli* MS04 es más tolerante a acetato que la cepa parental y otras cepas etanológicas de *E. coli*.

5.6.1 El fenotipo de la cepa *E. coli* MS04 en presencia de acetato sólo se presenta en condiciones no aireadas

Después de determinar el efecto del acetato de sodio en condiciones no aireadas sobre la cepa etanológica *E. coli* MS04 y la cepa parental *E. coli* MG1655, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento de ambas cepas bajo condiciones aireadas (1 vvm de aire, 600 rpm; $k_{La} = 162 \text{ h}^{-1}$), ya que se ha reportado que en condiciones aerobias las cepas de *E. coli* son más resistentes a acetato que en condiciones anaerobias (Smirnova y Oktyabrsky, 1985; Nakano et al. 1997). De esta manera, utilizando el mismo medio de cultivo pero con una baja concentración de glucosa (2

g/L), se evaluaron tres diferentes concentraciones de acetato de sodio (0, 5 y 10 g/L) en biorreactores con un volumen de trabajo de 750 mL y control de pH y temperatura a 7.0 y 37 °C respectivamente, empleando inóculos a $DO_{600nm} = 0.05$ (0.0185 g_{DWC}/L). Los resultados de las cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa mostraron que no existieron diferencias entre las cepas *E. coli* MG1655 y *E. coli* MS04, comportándose exactamente de la misma manera (datos no mostrados). Sin embargo, la inhibición por acetato en condiciones aireadas fue mayor que en condiciones no aireadas, pues con sólo 5 y 10 g/L de acetato de sodio, ambas cepas se inhibieron en su μ un 40 y 67% respectivamente (Tabla 5.7), en comparación a la disminución en la μ de la cepa *E. coli* MG1655 de un 30 y 47%; y un incremento en la μ de la cepa *E. coli* MS04 del 80 y 62% respectivamente en condiciones no aireadas. La tabla 5.7 muestra el promedio de la μ y q_s de las cepas *E. coli* MG1655 y *E. coli* MS04 en condiciones aireadas al evaluar diferentes concentraciones de acetato de sodio, mostrando una inhibición sobre la μ y q_s por acetato que no permitiría el crecimiento de las cepas a una concentración aproximada de 15 g/L de acetato de sodio (59 mg/L de ácido acético) a pH 7.0 bajo condiciones aireadas.

Tabla 5.7. Parámetros cinéticos promedio de las cepas *E. coli* MG1655 y *E. coli* MS04 en medio mineral con acetato de sodio bajo condiciones aireadas

Acetato de sodio (g/L)	μ (h ⁻¹)	q_s (g _{Glc} /g _{DWC} h)
0	0.62	1.56
5	0.38	0.94
10	0.20	0.52

Al comparar la μ relativa de ambas cepas en función de la concentración de ácido acético o acetato de sodio en condiciones aireadas, se pudo observar de mejor manera un mayor decremento de la μ de ambas cepas en condiciones aireadas con respecto a las condiciones no aireadas (Figura 5.15), donde la cepa *E. coli* MS04 se diferenció claramente de la cepa *E. coli* MG1655 en todas las concentraciones de acetato de sodio probadas, pues la cepa *E. coli* MG1655 disminuyó su μ conforme incrementó la concentración de acetato de sodio (a partir de 5 g/L), mientras que la cepa *E. coli* MS04 requirió la presencia de acetato en concentraciones de 2-10 g/L para alcanzar la mayor μ (0.3 h^{-1}), siendo esta todavía menor que la μ de *E. coli* MG1655 en ausencia de acetato de sodio (0.44 h^{-1}) debido a las múltiples interrupciones en genes del metabolismo fermentativo.

Se ha reportado que cepas silvestres como *E. coli* W3110 disminuyen su μ un 80% con sólo 5 g/L de acetato en medio rico en condiciones aireadas (Lasko et al. 1997). En relación con la cepa *E. coli* MG1655 esta inhibición no fue tan drástica (Tabla 5.7) como para otras cepas silvestres; sin embargo, al comparar el crecimiento y consumo de glucosa en condiciones aireadas de las cepas *E. coli* MG1655 y *E. coli* MS04, con respecto a las condiciones no aireadas, es evidente que bajo las últimas condiciones ambas cepas son más tolerantes a acetato (Figura 5.15), siendo esto contrario a lo que se ha visto con otras cepas de *E. coli*. Una posible explicación a este fenómeno sería la presencia de una mayor concentración de CO_2 en el medio de cultivo en condiciones no aireadas, la cual se ha relacionado con el incremento en la resistencia a condiciones ácidas en *E. coli* W3110 (Sun et al. 2005). Los mecanismos por los cuales el CO_2 puede proteger de la acidez a cepas de *E. coli* son aún desconocidos, pero se sabe que el CO_2 es necesario para el crecimiento de *E. coli* en condiciones anaerobias por su uso con enzimas de carboxilación y en la biosíntesis de carbamoil fosfato, esencial para la síntesis de nucleótidos

(Sun et al. 2005). La mayor tolerancia a acetato en los cultivos sin airear de la cepa *E. coli* MS04 podría deberse a la cantidad de CO₂ que se produce (por descarboxilación del piruvato) y a la baja agitación en los minifermentadores (100 rpm), lo cual no permite que se desorba del medio de cultivo contrario a lo que sucede en cultivos aireados donde rápidamente se desorbe.

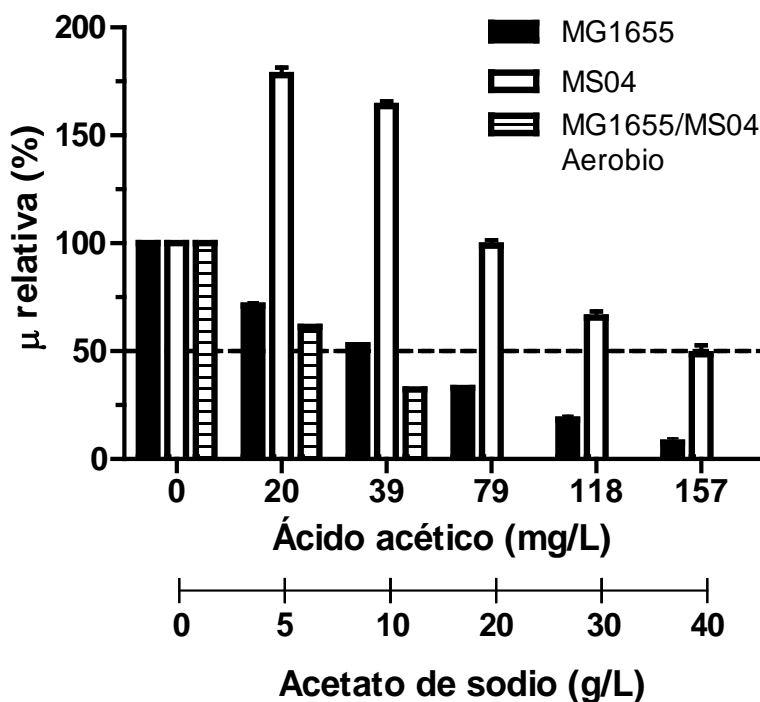


Figura 5.15. Velocidades específicas de crecimiento relativas a la condición sin acetato de sodio de las cepas *E. coli* MG1655 y *E. coli* MS04 bajo condiciones aireadas y no aireadas en función de la concentración de ácido acético y acetato de sodio. La línea punteada indica el 50% de la velocidad específica de crecimiento relativa en todas las condiciones.

Otros mecanismos que confieren tolerancia a medios ácidos en condiciones no aireadas comprenden la expresión de genes involucrados en la síntesis de descarboxilasas de aminoácidos como el glutamato (*gadA* y *gadBC*), arginina y lisina (Blankenhorn et al. 1999; Mills et al. 2009)

las cuales reaccionan con protones (H^+) para llevar a cabo reacciones de descarboxilación impidiendo la acidificación del citoplasma por la entrada de ácidos y su disociación (Warnecke y Gill, 2005). De las tres descarboxilasas mencionadas, la acción de la glutamato descarboxilasa es la más importante como mecanismo de protección en condiciones ácidas en *E. coli* (Mills et al. 2009), presentando una mayor expresión de sus genes en medio mínimo que en medio rico (Castanie-Cornet y Foster, 2001). Por otro lado, Hino et al. (1997), y O'sullivan y Condon (1999) relacionaron la actividad H^+ -ATPasa con la resistencia a condiciones ácidas de *E. coli* K12 y *Lactococcus lactis* respectivamente en anaerobiosis, pues esta actividad incrementa en condiciones ácidas y anaerobias, indicando con ayuda de mutantes en el operon ATPasa, que es necesario mantener la actividad de esta enzima a valores de pH ácidos para expulsar protones del citoplasma y conservar el gradiente de pH en la célula. También existen otros mecanismos de protección a condiciones ácidas que no sólo están restringidos a anaerobiosis, en los cuales se regulan las propiedades de la membrana celular como el contenido de lípidos cambiando la permeabilidad hacia el transporte de iones (Warnecke y Gill, 2005); el regulón *rpoS* que se induce bajo condiciones ácidas y regula muchos genes envueltos en la resistencia a estas condiciones (Mills et al. 2009), entre otros.

5.7 Secuenciación genómica de las cepas *E. coli* JU15 y MS04: La pérdida de un gran fragmento de ADN en ambas cepas favorece el crecimiento de las cepas en presencia de acetato y decrece su efecto inhibitorio

Las diferencias en el comportamiento de las cepas *E. coli* MG1655 y MS04 en presencia de acetato de sodio bajo condiciones no aireadas se pueden deber a mutaciones en la última que le

permiten tener un mayor crecimiento en presencia de bajas concentraciones de acetato y tolerar concentraciones superiores de este ácido orgánico en comparación con la cepa parental. La cepa etanológica *E. coli* MS04 fue construida interrumpiendo varios genes del metabolismo anaerobio y llevando a cabo algunos procesos de evolución adaptativa en azúcares y acetato (como se describe en la sección 4.1), por lo que el genoma de esta cepa y la cepa antecesora (*E. coli* JU15) se secuenciaron para identificar las posibles interrupciones y/o mutaciones que han sufrido y así tratar de explicar el fenotipo de *E. coli* MS04 en presencia de acetato (Tabla 4.1).

La secuenciación del genoma de *E. coli* JU15 y MS04 reveló la eliminación de un gran fragmento de ADN en el cromosoma de ambas cepas de 27,335 pb, además de la presencia de 2 mutaciones puntuales (SNPs) en *E. coli* JU15 y 1 SNP más en *E. coli* MS04. Del fragmento de ADN perdido, muchos genes tenían funciones relacionadas a respiración anaerobia de nitratos, reparación de ADN alquilado, proteínas transportadoras, síntesis de citocromos C, síntesis de cápsula celular y síntesis de tiamina (Tabla 4.1), lo cual pudiera contribuir de alguna manera al fenotipo en presencia de acetato. En este contexto, la interrupción en la síntesis de tiamina probablemente pudiera contribuir a la tolerancia a acetato, ya que se ha reportado que es un importante cofactor para la activación del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (Pdh) (Bisswanger, 1974), que es el complejo que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA principalmente en condiciones aerobias (Figura 2.1). De esta manera al crecer a la cepa *E. coli* MS04 en un medio mineral libre de tiamina, la actividad de Pdh pudiera haber sido muy baja o nula, impidiendo que se sintetizaran bajas concentraciones de acetil-CoA a partir de piruvato, y por lo tanto permitiendo el consumo de acetato para sintetizar acetil-CoA y disminuir en cierto grado su toxicidad intracelular.

Con respecto a los SNPs encontrados en los genes *gatC* y *arpA* en la cepa *E. coli* JU15 y el SNP *hyfR* en la cepa *E. coli* MS04 (Tabla 4.1), el SNP del gen *gatC* sólo cambió un aminoácido en la proteína original, lo cual es probable que este transportador se haya convertido en promiscuo para otros azúcares como xilosa, esto fue demostrado por Utrilla (2010), comprobando que GatC S184L actúa como un transportador de xilosa. El gen *hyfR* presentó un SNP el cual generó un codón de paro e interrumpió la traducción de la proteína HyfR en un 53%; esta proteína actúa como activador del operón *hyf* que se cree forma un segundo complejo formato deshidrogenoliasa que puede catalizar la conversión de formato en H₂ y CO₂ en condiciones anaerobias y bajos valores de pH (Andrews et al. 1997; Skibinski et al. 2002); sin embargo, la cepa *E. coli* MS04 está interrumpida en el gen *pflB* y se ha reportado que el operón *hyf* no se expresa en niveles significativos en cepas silvestres de *E. coli* por la baja actividad de HyfR (Andrews et al. 1997; Self et al. 2004).

Finalmente, el SNP que se encontró en el gen *arpA* también produjo un codón de paro reduciendo la traducción de la proteína correspondiente en un 42%. La fracción de la proteína ArpA que se perdió corresponde a 4 repeticiones de dominios de ankirina los cuales funcionan para mediar interacciones proteína-proteína y DNA-proteína principalmente en eucariontes, aunque en procariontes también se presentan (Díaz-Guerra et al. 1997; Li et al. 2006). Se ha reportado que el crecimiento de *E. coli* sobre acetato como única fuente de carbono puede ser inhibido por la presencia de dominios de ankirina presentes en la proteína humana RNasa L cuando esta es expresada en *E. coli* (Díaz-Guerra et al. 1997). Estas repeticiones de ankirina se encuentran únicamente en una proteína codificada en *E. coli* producto del gen *arpA* (Neuwald y Green, 1994). Los estudios de Díaz-Guerra et al. (1997) demostraron que *E. coli* fue incapaz de crecer en medio mineral M9 adicionado con acetato (2 g/L) como única fuente de carbono

cuando se expresaron los dominios de ankirina de la enzima RNasa L, no así cuando se expresaron otros dominios de la misma enzima. De esta manera el SNP encontrado en el gen *arpA* podría tener algún efecto sobre el fenotipo encontrado en presencia de acetato de la cepa *E. coli* MS04. Por otra parte, se ha propuesto a ArpA como regulador de la expresión de Acs (ecocyc.com) que es la enzima que tiene una elevada afinidad por acetato y cataliza la síntesis de acetil-CoA a partir del mismo (Figura 2.1), por lo que también es probable que la actividad de Acs esté sobreexpresada en esta cepa activando acetato a acetil-CoA, removiendo el acetato del citoplasma (en sus pequeñas concentraciones) y evitando parcialmente su inhibición sobre el crecimiento celular (Kumari et al. 1995).

Para evaluar la contribución del SNP encontrado en el gen *arpA*, y de la región de ADN eliminada de 27,335 pb (ocurridas durante la evolución adaptativa de la cepa *E. coli* JU01 y generando la cepa *E. coli* JU15) sobre el incremento del crecimiento y la tolerancia a acetato en la cepa evolucionada *E. coli* MS04, la cepa lactogénica *E. coli* JU01 ($\Delta pflB$) no evolucionada (Tabla 4.1) se utilizó para introducir las interrupciones cromosómicas en el gen *arpA* en su forma parcial y total ($\Delta midarpA$ y $\Delta arpA$ respectivamente; ver la sección 4.1 en Materiales y Métodos), y en la región eliminada de 27,335 pb (Δreg 27.3 kb). Las cepas *E. coli* JU01 y JU15 se utilizaron como control y la comparación de las cinéticas se llevó a cabo en minifermentadores con medio mineral AM2 adicionado con glucosa (50 g/L), con y sin acetato de sodio (0 y 5 g/L) bajo condiciones no aireadas. Los resultados de las cinéticas se muestran en la figura 5.16.

La comparación entre las dos condiciones nos permitieron confirmar que la adición de acetato mejoró el crecimiento celular para cualquiera de las cepas $\Delta pflB$ evaluadas (Figura 5.16). Sin embargo, en ambas condiciones (0 y 5 g/L de acetato de sodio), las cepas *E. coli* JU15 y JU01 Δreg 27.3 kb se comportaron de forma similar, con un incremento en el crecimiento celular en

presencia y ausencia de acetato de sodio. Con respecto a las cepas interrumpidas en el gen *arpA*, la interrupción parcial del gen *arpA* en la cepa *E. coli* JU01 (JU01 Δ midarpA), para evaluar la misma mutación encontrada en la cepa *E. coli* JU15 y MS04, y la interrupción completa de este mismo gen (JU01 Δ arpA), indicaron que estas mutaciones no contribuyen al mejoramiento del crecimiento celular o a la tolerancia a acetato en las cepas Δ pflB evolucionadas, y por lo tanto en *E. coli* JU15 y MS04. No obstante, aunque un análisis inicial de las secuencias genómicas de las cepas *E. coli* JU15 y MS04 reveló que los genes perdidos dentro de la región de 27,335 pb aparentemente no tenían un papel importante en incrementar la tolerancia a elevadas concentraciones de acetato debido a que ellos están relacionados a la respiración de nitratos, reparación de ADN alquilado, y síntesis de la porina C (gen *ompC*), citocromos C, tiamina y ácido colónico, la interrupción de este fragmento (27,335 pb) en la cepa *E. coli* JU01 no evolucionada creó el mismo fenotipo de la cepa *E. coli* JU15 en ausencia o presencia de 5 g/L de acetato de sodio. Tomando los datos anteriores, estos indican que la interrupción de 27,335 pb llamada reg 27.3 generó el mejoramiento del crecimiento celular y la tolerancia a acetato en la cepa *E. coli* MS04 reportada en este trabajo. Sin embargo, con esta información es difícil precisar que gen o genes están envueltos en la tolerancia a acetato en la cepa *E. coli* MS04, y por lo tanto es necesario llevar a cabo un estudio más detallado para identificar los genes que confieren este fenotipo en el fragmento genómico perdido de 27,335 pb, para describir y entender las causas del mejoramiento del crecimiento celular y la tolerancia a acetato de la cepa *E. coli* MS04 bajo condiciones no aireadas.

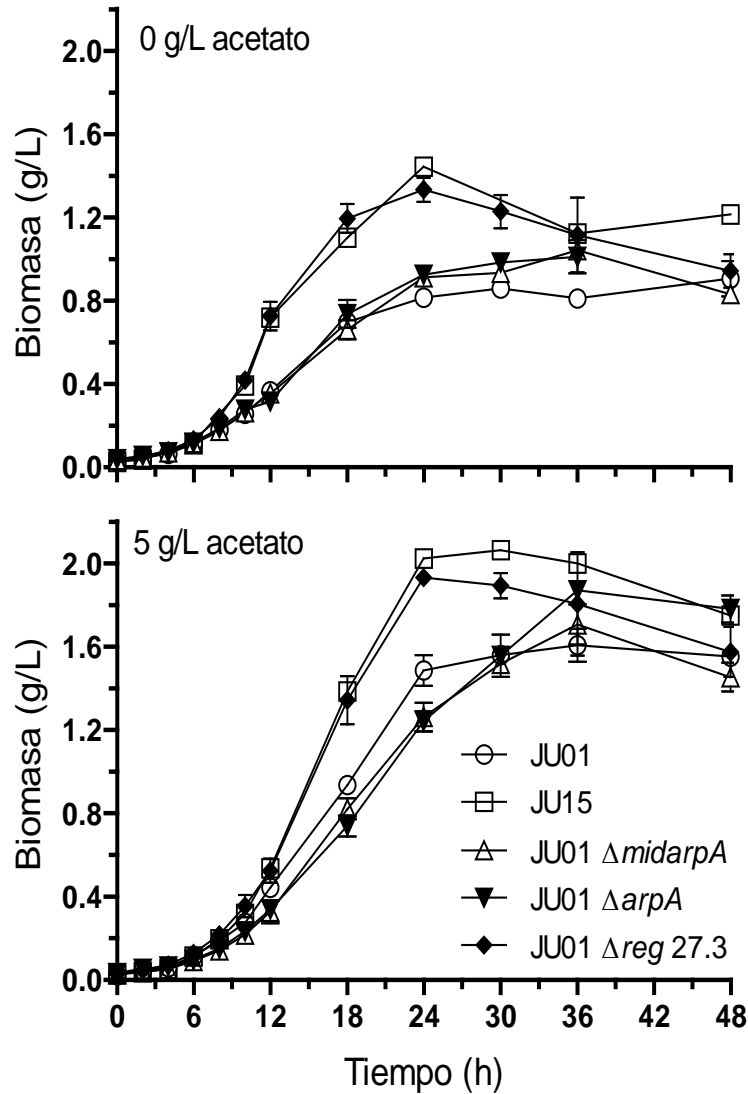


Figura 5.16. Cinéticas de crecimiento de las cepas *E. coli* JU15, JU01 y derivadas de JU01 interrumpidas en el gen *arpA* ($\Delta midarpA$ y $\Delta arpA$) y en la región de ADN eliminada de 27.3 kpb ($\Delta reg 27.3$) en ausencia y presencia de acetato de solido (5 g/L). Cultivo en lote en medio mineral AM2 adicionado con glucosa (50 g/L), bajo condiciones no aireadas, 37°C, 100 rpm y pH 7.0.

5.8 *E. coli* MS04 es capaz de producir etanol con buenos rendimientos utilizando hidrolizados hemicelulósicos en cultivo en lote en condiciones de baja transferencia de oxígeno

Durante la estancia de investigación llevada a cabo en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Jaén, España, se obtuvieron por hidrólisis ácida hidrolizados de hemicelulosa de paja de colza y poda de olivo los cuales se acondicionaron y se fermentaron con *E. coli* MS04 para producir etanol en condiciones de baja transferencia de oxígeno ($k_{La} = 7.3 \text{ h}^{-1}$).

El cultivo de colza y olivo en España se lleva a cabo principalmente para producir aceite comestible, alimento para ganado y últimamente para la generación de biodiesel (Díaz et al. 2010; Castro et al. 2011). La paja de colza contiene más del 62% de azúcares fermentables en base seca (Jeong et al. 2010). Por otro lado los residuos de poda de olivo son baratos y abundantes en la región de Andalucía España, y se ha propuesto su uso para la producción de etanol (Cara et al. 2008a; Cara et al. 2008b) ya que contienen un 44% de azúcares polimerizados (Cara et al. 2008b). El análisis de los hidrolizados de paja de colza mostró la siguiente composición en promedio (g/L): xilosa 23; glucosa 4; acetato 9 y formiato 2; sin la presencia de furfural ni hidroximetilfurfural (compuestos tóxicos derivados de la deshidratación de pentosas y hexosas respectivamente; Klinke et al. 2004). Mientras que los hidrolizados de poda de olivo tuvieron la siguiente composición en promedio (g/L): glucosa 18; xilosa 16; fructosa 3; galactosa 3; manosa 1; acetato 7 y formiato 1; nuevamente sin la presencia de furfural e hidroximetilfurfural.

Una vez acondicionados los hidrolizados a pH 7 (como se describe en la sección de 4.6), estos se esterilizaron en los biorreactores donde se llevó a cabo la fermentación, previa adición, en forma

estéril, de sales de amonio y ácido cítrico del medio AM2. La agitación y aireación que se establecieron (300 rpm y 0.1 vvm) fueron para alcanzar una transferencia de oxígeno equivalente a un k_{La} de 7.3 h^{-1} (medida por el método de gassing-out) según los resultados obtenidos en cinéticas con medio AM2 y mezclas de azúcares y acetato antes expuestos (Sección 5.4.1). Las cinéticas de consumo de xilosa y glucosa (azúcares totales y mayoritarios en los hidrolizados de colza y olivo respectivamente) y la producción de etanol por la cepa *E. coli* MS04 en cada hidrolizado se presentan en la figura 5.17. Para el caso del hidrolizado de paja de colza (Figura 5.17a) *E. coli* MS04 consumió todos los azúcares (glucosa y xilosa) en 21 horas de cultivo, alcanzándose 14 g/L de etanol, un Y_{PS} del 93% y una Q_P de $0.62 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{L h}$, manteniéndose prácticamente constantes las concentraciones de acetato y formiato durante toda la fermentación, sin que existiera inhibición por estos ácidos. Con respecto al hidrolizado de poda de olivo (Figura 5.17b), todos los azúcares se consumieron a las 42 horas con una producción de etanol de 20 g/L correspondiente a un Y_{PS} del 87% y una Q_P de $0.60 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{L h}$.

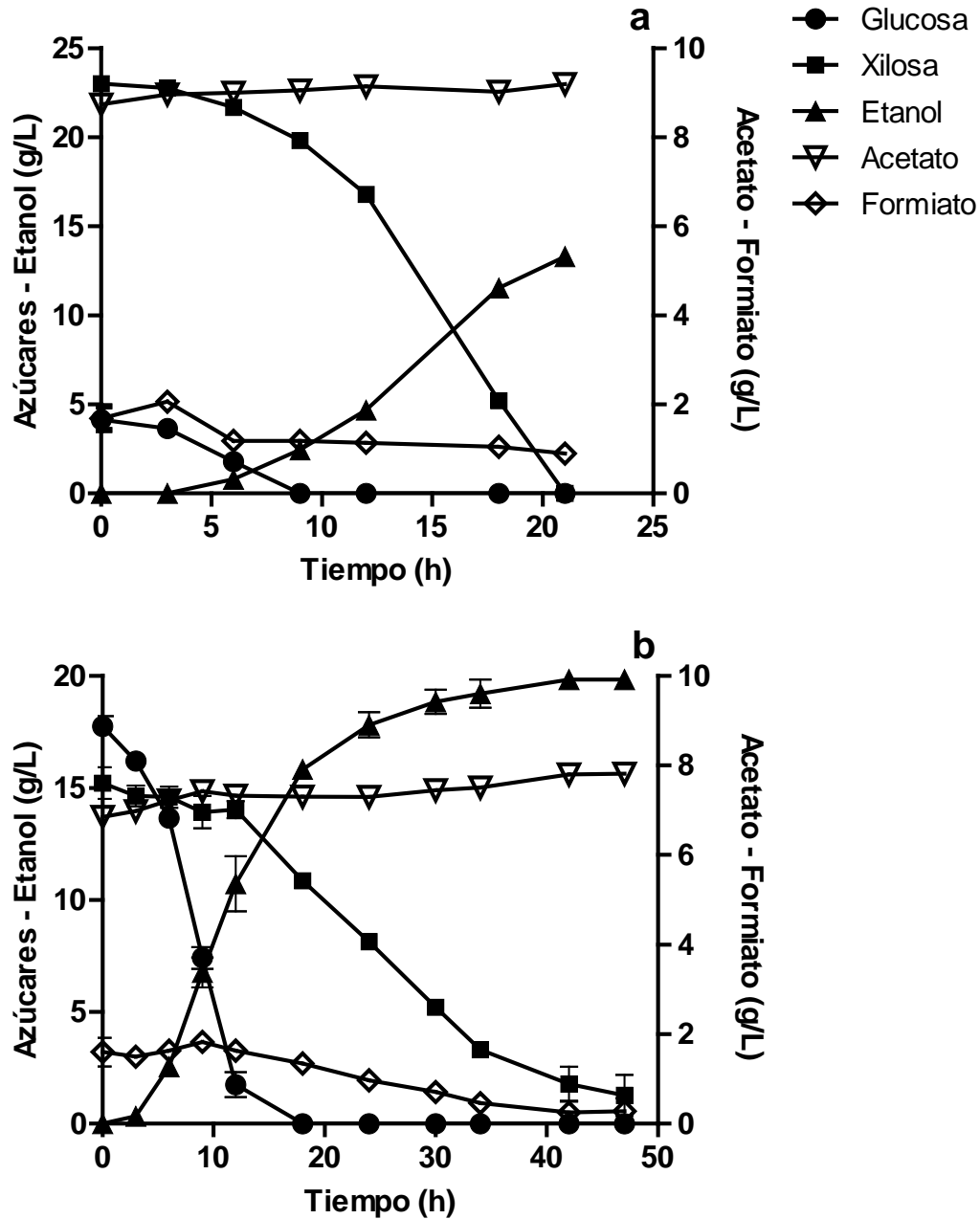


Figura 5.17. Cinéticas de consumo de azúcares y producción de etanol por *E. coli* MS04 a partir de hidrolizados de paja de colza (a) y poda de olivo (b) adicionados con sales de amonio y ácido cítrico en cultivo en lote. Condiciones: pH 7.0, 37°C, 300 rpm y 0.1 vvm de aire ($k_{La} = 7.3 \text{ h}^{-1}$).

Al comparar el desempeño de la cepa *E. coli* MS04 con algunos microorganismos fermentadores de hidrolizados de hemicelulosa que son utilizados en la Universidad de Jaén, España (*Pichia*

stipitis CBS6054), se ha reportado que *Pichia stipitis* CBS6054 fermentó en matraz hidrolizados de rastrojo de maíz adicionados con nutrientes (peptona o extracto de levadura) y conteniendo xilosa, glucosa y acetato (34, 8, 8 g/L respectivamente) a 15 g/L de etanol en 72 h de cultivo con un Y_{PS} de 78% a pH 6.0 (Agbogbo y Wenger, 2007). En otro caso, esta misma cepa se evaluó en medio rico con diversas mezclas de glucosa y xilosa (60 g/L totales) a pH 6.3 en matraces agitados y aireados, obteniendo una producción y Q_P de etanol de 23 g/L y 0.2 g/L h respectivamente y un Y_{PS} de 86% en 120 h de cultivo (Agbogbo et al. 2006). Sin embargo, en estos experimentos fue necesario suplementar el medio de cultivo o el hidrolizado con nutrientes complejos para que *P. stipitis* CBS6054 pudiera fermentar los azúcares.

En otros experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo, la cepa *E. coli* MS04 ha fermentado eficientemente a etanol hidrolizados de bagazo de caña, agave, rastrojo de maíz o sorgo, y pastos de crecimiento rápido con resultados similares, y sin que se presente inhibición por los ácidos orgánicos (acético y fórmico) presentes en los hidrolizados.

VI. Conclusiones

Con respecto a la producción de etanol a partir de la cepa etanológica *E. coli* MS04, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- La cepa *E. coli* MS04 es capaz de producir etanol en cultivo en lote a partir de azúcares como glucosa y xilosa en medio mineral con buenos rendimientos y productividades en presencia de acetato, pues requiere este compuesto para lograr un buen crecimiento en condiciones no aireadas debido a un déficit en la poza de acetyl CoA ya que tiene interrumpido el gen *pflB*.
- Las actividades específicas Pdc y AdhB de *E. coli* MS04 aparentemente no limitan la velocidad de producción de etanol en medio mineral con glucosa y xilosa en cultivo en lote, pues sus valores (1.8 y 0.4 UI/mg_{Proteína}) son semejantes a las de otras cepas etanológicas y son apenas inferiores a aquellos donde los genes de estas enzimas se expresan usando plásmidos multicopia.
- Por medio del uso de cultivos continuos en dos etapas es posible incrementar la productividad de etanol del sistema en comparación a cultivos en lote o cultivos continuos de una etapa, además de incrementar la concentración de biomasa y consumo de sustratos usando varias etapas, no obstante no se logra el consumo total de azúcares (50 g/L) en condiciones no aireadas usando una o dos etapas.
- De acuerdo a las constantes estimadas del modelo de producción de Luedeking-Piret, la producción de etanol en la cepa *E. coli* MS04 está relacionada tanto a la fase de crecimiento como a la fase de no crecimiento celular.

-
- La transferencia de oxígeno a bajas tasas ($k_{La} = 7.2 \text{ h}^{-1}$) tiene un efecto positivo sobre el consumo de sustratos y la productividad volumétrica de etanol en cultivo en lote y continuo permitiendo el consumo total de los azúcares en una sola etapa en cultivo continuo ($D = 0.05 \text{ h}^{-1}$) y alcanzando productividades de etanol de 1.5 g/L h .
 - El k_{La} es un criterio de escalamiento para la producción de etanol con *E. coli* MS04 en condiciones de bajas tasas de transferencia de oxígeno.
 - Las actividades específicas de Pdc y AdhB de *E. coli* MS04 limitan la producción de etanol en cultivos continuos, ya que en cultivos en dos fases (aireada y no aireada) la actividad enzimática de AdhB es nula, y en cultivos con bajos niveles de aireación ambas actividades están por debajo de aquellas obtenidas en cultivos en lote.
 - La cepa etanológica *E. coli* MS04 presenta una baja tolerancia a etanol, con una constante de inhibición por producto (K_p) de 3.7 g/L , valor en el cual se reduce su velocidad específica de crecimiento a la mitad, y limita su productividad volumétrica de etanol en cultivos continuos con alta concentración del mismo.

Referente al crecimiento de la cepa etanológica en presencia de acetato se concluye que:

- La cepa *E. coli* MS04 presenta un fenotipo en el cual mejora su velocidad de crecimiento y producción de etanol en presencia de moderadas concentraciones de acetato de sodio ($2\text{-}10 \text{ g/L}$) en condiciones no aireadas; y muestra además una mayor tolerancia a acetato que la cepa parental, ya que mantiene su crecimiento en concentraciones elevadas de acetato de sodio (hasta 40 g/L).

- El fenotipo de la cepa *E. coli* MS04 en presencia de acetato de sodio sólo se presenta en condiciones no aireadas en medio mineral, debido probablemente a mecanismos metabólicos y de regulación genética que se presentan en condiciones anaerobias, además de la interrupción del gen *pflB* (que causa un déficit en la poza de acetil-CoA) y la actividad de algunas enzimas del metabolismo del acetato tales como Acs, Pta y AckA.
- La forma no disociada del ácido acético y otros ácidos orgánicos es la responsable de la toxicidad sobre el crecimiento y producción de etanol de la cepa *E. coli* MS04.

Con respecto a la producción de etanol utilizando hidrolizados hemicelulósicos se concluye que:

- La cepa etanológica *E. coli* MS04 es capaz de fermentar todos los azúcares presentes en hidrolizados hemicelulósicos (de una amplia variedad de residuos agroindustriales, incluyendo paja de colza y poda de olivo) a etanol con rendimientos mayores al 90% del teórico máximo, y con productividades volumétricas de $0.6 \text{ g}_{\text{EtOH}}/\text{L h}$ en cultivos en lote.

VII. Perspectivas

A continuación se presentan algunas propuestas, las cuales pueden contribuir al incremento en la producción y productividad de etanol por la cepa etanológica a partir de medios conteniendo hexosas y pentosas, y a comprender su fenotipo en presencia de acetato

- Integrar el gen *adhA* de *Z. mobilis* en el genoma de la cepa *E. coli* MS04 bajo un promotor constitutivo, ya que la enzima AdhA no es sensible a oxígeno; o llevar a cabo la integración de los tres genes etanológicos *pdh*, *adhA* y *adhB* de *Z. mobilis* en multicopia en cromosoma bajo promotores aerobios y anaerobios de *E. coli*.
- Incrementar la tolerancia a etanol de la cepa *E. coli* MS04 mediante evolución metabólica, en la que la cepa se adapte a concentraciones cada vez más elevadas de etanol en medio mineral, ya que la cepa presenta baja tolerancia a etanol, la cual limita la productividad del mismo en cultivo continuo.
- Evaluar cultivos continuos con recirculación externa de biomasa para incrementar la concentración de biomasa en el reactor y aumentar la productividad volumétrica de etanol del sistema.
- Medir los niveles de transcritos por RT-PCR de los genes del metabolismo anaerobio para explicar de una mejor manera el fenotipo en presencia de acetato de la cepa *E. coli* MS04.
- Estudiar las bases moleculares del fenotipo en presencia de acetato de la cepa *E. coli* MS04 relacionadas con la pérdida del fragmento cromosomal de 27,335 pb de nominado *reg 27.3*.

VIII. Bibliografía

- Agbogbo FK, Coward-Kelly G, Torry-Smith M, Wenger KS (2006). Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry*, 41: 2333-2336.
- Agbogbo FK, Wenger KS (2007). Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34: 723-727.
- Aiba S, Shoda M (1969). Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation. *Journal of Fermentation Technology*, 47(12):790-794.
- Alterthum F, Ingram LO (1989). Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 55 (8): 1943-1948.
- Andrews SC, Berks BC, McClay J, Ambler A, Quail MA, Golby P, Guest JR (1997). A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology*, 143:3633-3647.
- Aristidou AA, San KY, Bennet GN (1999). Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnology Progress*, 15:140-145.
- Asghari A, Bothast RJ, Doran JB, Ingram LO (1996). Ethanol production from hemicellulose hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KO11. *Journal of Industrial Microbiology*, 16 (1): 42-47.
- Bai FW, Chen LJ, Zhang Z, Anderson WA, Moo-Young M (2004). Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *Journal of Biotechnology*, 110 (3): 287-293.
- Bandaipheth C, Prasertsan P (2006). Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_{La} in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers*, 66: 216-228.
- Barbosa MFS, Beck MJ, Fein JE, Potts D, Ingram LO (1992). Efficient fermentation of *Pinus sp.* acid hydrolysates by an ethanologenic strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (4): 1382-1384.
- Bayrock DP, Ingledew WM (2001). Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27:87-93.
- Bayrock DP, Ingledew WM (2005). Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:83-88.
- Beall DS, Ohta K, Ingram LO (1991). Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 38: 296-303.
- Bisswanger H (1974). Regulatory properties of the pyruvate-dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 48: 377-387.
- Blannkenhorn D, Phillips J, Slonczewski JL (1999). Acid-and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 181(7): 2209-2216.

- Bhattacharya SK, Dubey AK (1995). Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpressing target gene. *Biotechnology Letters*, 17(11): 1155-1160.
- Böck A, Sawers G (1996). Fermentation. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology, Capítulo 18, (Neidhardt et al. eds.), pp. 262-282. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brückner R, Titgemeyer F (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 209: 141-148.
- Cabiscol E, Aguilar J, Ros J (1994). Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(9): 6592-6597.
- Cara C, Ruiz E, Oliva JM, Sáez F, Castro E (2008a). Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 99: 1869-1876.
- Cara C, Ruiz E, Ballesteros M, Manzanares P, Negro MJ, Castro E (2008b). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, 87: 692-700.
- Cassey B, Guest JR, Attwood MM (1998). Environmental control of pyruvate dehydrogenase complex expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 159: 325-329.
- Castanie-Cornet MP, Foster JW (2001). *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp *cis*-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology*, 147: 709-715.
- Castro E, Díaz JM, Cara C, Ruiz E, Romero I, Moya M (2011). Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation. *Bioresource Technology*, 102: 1270-1276.
- Chohnan S, Furukawa H, Fujio T, Nishihara H, Takamura Y (1997). Changes in the size and composition of intracellular pools of nonesterified coenzyme A and coenzyme A thioesters in aerobic and facultatively anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2): 553-560.
- Conway T, Osman YA, Konnan JI, Hoffmann EM, Ingram LO (1987). Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Journal of Bacteriology*, 169(3): 949-954.
- Cox MP, Peterson DA, Biggs PJ (2010). Solexa QA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 11:485.
- Datsenko KA, Wanner BL (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America*, 97 (12): 6640-6645.
- Daugulis AJ, Swaine DE (1987). Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production of ethanol by suspended and immobilized cell reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 29: 639-645.
- De Jesús CDF, Giordano R, Cruz AJG, Alliet-Gaubert M (2007). Weblab in chemical engineering between France and Brazil: validation of the methodology. *International Conference on Engineering Education ICEE*, Coimbra Portugal.
- Díaz JM, Cara C, Ruiz E, Romero I, Moya M, Castro E (2010). Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw. *Bioresources Technology*, 101: 2428-2435.

- Díaz-Guerra M, Esteban M, Martínez JL (1997). Growth of *Escherichia coli* in acetate as a sole carbon source is inhibited by ankyrin-like repeats present in the 2',5'-linked oligoadenylate-dependent human RNase L enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, 149:107-113.
- Dien BS, Hespell RB, Ingram LO, Bothast RJ (1997). Conversion of corn milling fibrous co-products into ethanol by recombinant *Escherichia coli* strains KO11 and SL40. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 619-625.
- Dien BS, Hespell RB, Wyckoff H, Bothast RJ (1998). Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme Microbial Technology*, 23 (6): 366-371.
- Dien BS, Iten LB, Bothast RJ (1999). Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *E. coli* strain FBR3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22: 575-581.
- Dien BS, Nichols NN, O'bryan PJ, Bothast RJ (2000). Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84-86: 181-196.
- Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 258-266.
- Doran PM (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. 1st Edition, London UK. Academic Press Limited. pp. 206.
- Dumsday GJ, Zhou B, Yaquin W, Stanley GA, Pamment NB (1999). Comparative stability of ethanol production by *Escherichia coli* KO11 in batch and chemostat culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 701-708.
- Dourado A, Goma G, Albuquerque U, Sevely Y (1987a). Modeling and static optimization of the ethanol production in a cascade reactor. I. Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 29: 187-194.
- Dourado A, Calvet JL, Sevely Y, Goma G (1987b). Modeling and static optimization of the ethanol production in a cascade reactor. II. Static optimization. *Biotechnology and Bioengineering*, 29: 195-203.
- Eiteman MA, Altman E (2006). Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *TRENDS in Biotechnology*, 24(11): 530-536.
- Fuchs C, Köster D, Wiebusch S, Mahr K, Eisbrenner G, Märkl H (2002). Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93: 243-251.
- Furlan SA, Bouilloud P, Castro HF (1994). Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochemistry*, 29: 657-662.
- Galbe M, Zacchi G (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 618-628.
- Ghose TK, Tyagi RD (1979). Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering*, 21: 1401-1420.
- Girio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 101:4775-4800.
- Gordon D, Abajian C, Green P (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8:195-202.
- Govindaswamy S, Vane LM (2010). Multi-stage continuous culture fermentation of glucose-xylose mixtures to fuel ethanol using genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* 424A. *Bioresource Technology*, 101:1277-1284.

- Gray KA, Zhao L, Emptage M (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10:141-146.
- Hahm DH, Pan J, Rhee JS (1994). Characterization and evaluation of a *pta* (phosphotransacetylase)-negative mutant of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 181:6656-6663.
- Hamelinck CN, van Hooijdonk G, Faaij APC (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28: 384-410.
- Han K, Hong J, Lim HC (1993). Relieving effects of glycine and methionine from acetic acid inhibition in *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:316-324.
- Hasona A, Kim Y, Healy FG, Ingram LO, Shanmugam KT (2004). Pyruvate formate lyase and acetate kinase are essential for anaerobic growth of *Escherichia coli* on xylose. *Journal of Bacteriology*, 186 (22): 7593-7600.
- Hespell RB, Wyckoff H, Dien BS, Bothast RJ (1996). Stabilization of *pet* operon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lacking lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (12): 4594-4597.
- Hilay AK, Karim MN, Linden JC (1994). Comparison of ethanol production from xylose by a recombinant *Escherichia coli* in batch, fedbatch and continuous fermentations. *Journal Genetic Applied Microbiology*, 40: 463-467.
- Hino T, Esaki H, Miwa T, Umemori J (1997). Significance of H⁺-ATPase in acid tolerance of *Escherichia coli*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture - Meiji University*, 113:1-9.
- Hoppner TC, Doelle HW (1983). Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17: 152-157.
- Hoskisson PA, Hobbs G (2005). Continuous culture – making a comeback? *Microbiology*, 151: 3153-3159.
- Huerta-Beristain G, Utrilla-Carreri J, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, Martínez A (2008). Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15: 55-64.
- Ingram LO, Conway T (1988). Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied Environmental and Biotechnology*, 54:397-404.
- Ingram LO (1990). Ethanol tolerance in bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9(4): 305-319.
- Ingram LO, Gomez PF, Lai X, Moniruzzaman M, Wood BE, Yomano LP, York SW (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, 58: 204-214.
- Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martinez A, Morales F, Saleh A, Underwood SA, Yomano LP, York SW, Zaldivar J, Zhou S (1999). Enteric bacterial catalyst for fuel ethanol production. *Biotechnology Progress*, 15:855-866.
- Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ (2008). Scale-up of *Escherichia coli* growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale based on matched k_{La} . *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5): 1128-1139.

- Jackowski S (1996). Biosynthesis of Pantothenic Acid and Coenzyme A. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, Capítulo 44, (Neidhardt et al. eds.), pp. 687-694. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.
- Jarboe LR, Grabar TG, Yomano LP, Shanmugan KT, Ingram LO (2007). Development of ethanologenic bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 237-261.
- Jeong T, Um B, Kim J, Oh K (2010). Optimizing diluted-acid pretreatment of rapeseed straw for extraction of hemicellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161:22-33.
- Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT (2007). Construction of an *Escherichia coli* K12 mutant for homoethanologenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6): 1766-1771.
- Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:10-26.
- Kompala DS (1996). Microbial growth on multiple substrates. In the forthcoming book on "Bioprocess Engineering: Fundamentals and Applications".
- Kumari S, Tishel R, Eisenbach M, Wolfe AJ (1995). Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(10):2878-2886.
- Kuyper M, Toirkens MJ, Diderich JA, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT (2005). Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Research*, 5: 925-934.
- Laluce C, Souza CS, Abud CL, Gattas EAL, Walker GM (2002). Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29: 140-144.
- Lasko DR, Schwerdel C, Bailey JE, Saber U (1997). Acetate-specific stress response in acetate-resistant bacteria: an analysis of protein patterns. *Biotechnology Progress*, 13: 519-523.
- Lawford HG, Rousseau JD (1993). Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenic *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 39-40(1): 301-322.
- Lawford HG, Rousseau JD (1995). Comparative energetics of glucose and xylose metabolism in ethanologenic recombinant *Escherichia coli* B. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51-52: 179-195.
- Lawford HG, Rousseau JD (1996). Factors contributing to the loss of ethanogenicity of *Escherichia coli* B recombinants pLOI297 and KO11. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58: 293-305.
- Leite AR, Guimaraes WV, Fernandes de Araújo E, Silva DO (2000). Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 212-215.
- Li H, Castro NM, Bennett GN, San K (2006). Acetyl-CoA synthetase overexpression in *Escherichia coli* demonstrates more efficient acetate assimilation and lower acetate accumulation: a potential tool in metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:870-874.
- Luedeking R, Piret EL (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4): 393-412.

- Luli GW, Strohl WR (1990). Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4): 1004-1011.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Marques MPC, Cabral JMS, Fernandes P (2010). Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 29: 397-404.
- Martin GJO, Knepper A, Zhou B, Pamment NB (2006). Performance and stability of ethanologenic *Escherichia coli* strain FBR5 during continuous culture on x ylose and glucose. *Journal of Industrial Biotechnology*, 33: 834-844.
- Martínez A, York SW, Yomano LP, Pineda VL, Davis FC, Shelton JC, Ingram LO (1999). Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdh*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 15: 891-897.
- Martínez A, Rodríguez ME, Wells ML, York SW, Preston JF, Ingram LO (2001). Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnology Progress*, 17:287-293.
- Martínez-Jimenez A, Rodríguez Alegría ME, López-Munguía Canales A, y Gosset Lagarda G. ¿Etanol carburante a partir de bagazo de caña?. *Claridades Agropecuarias. Publicación Mensual de la SAGARPA*. pp. 33-39. Julio 2006.
- Martínez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Romano LP, York SW, Ingram LO (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*, 29: 397-404.
- Mielenz JR (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, 4:324-329.
- Mills TY, Sandoval NR, Gill RT (2009). Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*, 2:26-35.
- Nakano K, Rischke M, Sato S, Márkl H (1997). Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 597-601.
- Neale AD, Scopes RK, Kelly JM (1988). Alcohol production from glucose and xylose using *Escherichia coli* containing *Zymomonas mobilis* genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29: 162-167.
- Neuwald AF, Green P (1994). Detecting patterns in protein sequences. *Journal of Molecular Biology*, 239:698-712.
- Nielsen J, Villadsen J, Lidén G (2003). *Mass transfer in bioreaction engineering principles*. Second Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 423-474.
- Nishiwaki A (1997). Analysis of a two-stage fermentor with cell recycling for continuous acetic acid production. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83 (6): 565-570.
- Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT, Ingram LO (1991). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (4):893-900.
- Okuda N, Ninomiya K, Takao M, Katakura Y, Shioya S (2007). Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *Escherichia coli* KO11. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(4): 350-357.

- Orencio-Trejo M, Flores N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, Martínez A (2008). Metabolic regulation analysis of ethanologenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1):8.
- Orencio-Trejo M, Utrilla J, Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Gosset G, Martinez A (2010). Engineering the *Escherichia coli* fermentative metabolism. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 121:71-107.
- O'sullivan E, Condon S (1999). Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H⁺-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 65(6):2287-2293.
- Páca J (1980). Elimination of ethanol inhibition of yeast growth by a multistream ethanol feed in a multistage tower fermenter. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 30: 764-771.
- Paiva TCB, Sato S, Visconti AES, Castro LAB (1996). Continuous alcoholic fermentation process in a tower with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57 (58): 535-541.
- Pirt SJ (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 260-268.
- Peterson JD, Ingram LO (2008). Anaerobic respiration in engineered *Escherichia coli* with an internal electron acceptor to produce fuel ethanol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125: 363-372.
- Presser KA, Ratkowsky DA, Ross T (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6): 2355-2360.
- Presser KA, Ross T, Ratkowsky DA (1998). Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5): 1773-1779.
- Roca C, Olsson L (2003). Increasing ethanol productivity during xylose fermentation by cell recycling of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 560-563.
- Roe AJ, Mclaggan D, Davidson I, O'byrne C, Booth IR (1998). Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids, 180(4): 767-772.
- Roe AJ, O'Byrne C, McLaggan D, Booth IR (2002). Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 148:2215-2222.
- Saha BC (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30 (5): 279-291.
- Saha BC, Cotta MA (2011). Continuous ethanol production from wheat straw hydrolysate by recombinant ethanologenic *Escherichia coli* strain FBR5. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 477-487.
- Sawers G, Böck A (1988). Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 170 (11): 5330-5336.
- Sawers G, Böck A (1989). Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. *Journal of Bacteriology*, 171 (5): 2485-2498.

- Self WT, Hasona A, Shanmugam KT (2004). Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 i soenzyme in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186(2):580-587.
- Skibinski DAG, Golby P, Chang Y, Sargent F, Hoffman R, Harper R, Guest JR, Attwood MM, Berks BC, Andrews SC (2002). Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the σ^{54} -dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *Journal of Bacteriology*, 184(23):6642-6653.
- Smirnova GV, Oktyabrsky ON (1985). The effect of acetate on the growth of *Escherichia coli* under aerobic and anaerobic conditions. *Mikrobiologiya*, 54(2): 252-256.
- Sun Y, Cheng J (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1-11.
- Sun L, Fukamachi T, Saito H, Kobayashi H (2005). Carbon dioxide increases acid resistance in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 397-400.
- Taguchi H, Hunphrey AE (1996). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Journal of Fermentation Technology*, 44:881-889.
- Takahashi CM, Takahashi DF, Carvalhal MLC, Alterthum F (1999). Effects of acetate on the growth and fermentation performance of *Escherichia coli* KO11. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81: 193-204.
- Takahashi CM, de Carvalho Lima KG, Takahashi DF, Alterthum F (2000). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 829-834.
- Tamarit J, Cabisco E, Aguilar J, Ros J (1997). Differential inactivation of alcohol dehydrogenase isoenzymes in *Zymomonas mobilis* by oxygen. *Journal of Bacteriology*, 179(4): 1102-1104.
- Toon ST, Philippidis GP, Ho NWY, Chen ZD, Brainard AP, Lumpkin RE, Riley CJ (1997). Enhanced cofermentation of glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* yeast strains in batch and continuous operating modes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-65: 243-255.
- Trujillo-Martínez B (2008). Producción de D-Lactato a partir de hidrolizados hemicelulósicos de Bagazo de Caña en *Escherichia coli* recombinante. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Veracruz.
- Tyagi RD, Ghose TK (1980). Batch and multistage continuous ethanol fermentation of cellulose hydrolysate and optimum design of fermentor by graphical analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 22: 1907-1928.
- Utrilla J, Gosset G, Martínez A (2009). ATP limitation in a pyruvate lyase mutant of *Escherichia coli* MG1655 increases glycolytic flux to D-lactate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 1057-1062.
- Utrilla Carreri J (2010). Ingeniería metabólica en *Escherichia coli* para la conversión eficiente de xilosa a D-lactato. Tesis de Doctorado, Instituto de Biología, UNAM.
- Utrilla J, Licona-Cassani C, Marcellin E, Gosset G, Nielsen LK, Martínez A (2012). Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. Submitted to: *Metabolic Engineering*, February 15th, 2012.
- Vallari DS, Jackowski S (1988). Biosynthesis and degradation both contribute to the regulation of coenzyme A content in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170(9): 3961-3966.

- Vasconcelos JN, Lopes CE, França FP (2004). Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21 (3): 357-365.
- Von Sivers M, Zacchi G, Olsson L, Hahn-Hägerdal B (1994). Cost analysis of ethanol from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 10:555-560.
- Wang Z, Chen M, Xu Y, Shuying L, Wei L, Shuzhen P, Zhang W, Min L (2008). An ethanol-tolerant recombinant *Escherichia coli* expressing *Zymomonas mobilis pdc* and *adhB* genes for enhanced ethanol production for xylose. *Biotechnology Letters*, 30:657-663.
- Warnecke T, Gill RT (2005). Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, 4: 25-32.
- Winters P (2011). Current status of cellulosic biofuel commercialization in the United States. *Industrial Biotechnology*, 7(5): 365-374.
- Wolfe AJ (2005). The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (1): 12-50.
- Xu TJ, Zhao XQ, Bai FW (2005). Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 634-640.
- Yomano LP, York SW, Ingram LO (1998). Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20:132-138.
- Yomano LP, York SW, Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO (2008). Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnology Letters*, 30:2097-2103.
- Zaldivar J, Ingram LO (1999). Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*, 6(4): 203-210.
- Zaldivar J, Martínez A, Ingram LO (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1): 24-33.
- Zaldivar J, Martínez A, Ingram LO (2000). Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(5): 524-530.
- Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 17-34.
- Zelic B, Vasic-Racki D, Wandrey C, Takors R (2004). Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 26: 249-258.
- Zhou S, Iverson AG, Grayburn WS (2008a). Engineering a native homoethanol pathway in *Escherichia coli* B for ethanol production. *Biotechnology Letters*, 30: 335-342.
- Zhou B, Martin GJO, Pamment NB (2008b). Increased phenotypic stability and ethanol tolerance of recombinant *Escherichia coli* KO11 when immobilized in continuous fluidized bed culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(4): 627-633.
- Zilberstein D, Agmon V, Schuldiner S, Padan E (1984). *Escherichia coli* intracellular pH, membrane potential and cell growth, 158(1): 246-252.

Anexos: Producción Científica

A. Publicaciones

A.1. Carreón-Rodríguez O, Sabido-Ramos A, Centeno-Leija S, Leal-Reyes L, Martínez-Jiménez A y **Fernández-Sandoval M.T. Etanol Carburante.** *Biotecnología y Bioingeniería* (2009), 13: 79-102.

A.2. Orencio-Trejo M, Utrilla J, **Fernández-Sandoval MT**, Huerta-Beristain G, Gosset G, and Martínez A (2010). **Engineering the *Escherichia coli* Fermentative Metabolism.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 121: 71-107.

A.3. Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Bustos P, Gonzalez V, Gosset G and Martínez A (2012). **Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanogenic *Escherichia coli* under non aerated condition in glucose-mineral medium.** In Press. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Fernández-Sandoval MT, Moss C, Galíndez J, Gosset G and Martínez A (2012). **Ethanol volumetric productivity improvement and fermentation scale-up at low controlled oxygen transfer rates with the ethanogenic *Escherichia coli* strain MS04 and xylose-glucose-acetate mixtures or hemicellulosic hydrolysates.** Manuscrito en preparación.

Fernández-Sandoval MT, Galíndez J, Gosset G and Martínez A (2012). **Ethanol production from xylose and glucose in the presence of acetate in one-stage and multi-stage continuous cultures with the ethanogenic *Escherichia coli* strain MS04 under microaerated conditions.** Manuscrito en preparación.

B. Presentaciones en Congresos

B.1. Marco T. Fernández Sandoval, Guillermo Gosset Lagarda y Alfredo Martínez Jiménez. Producción de etanol por una cepa etanológica de *Escherichia coli* en presencia de acetate de sodio. **XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería**, Acapulco, México, 2009. (Presentación Oral).

B.2. Marco T. Fernández Sandoval, Guillermo Gosset Lagarda and Alfredo Martínez Jiménez. Ethanol production by ethanogenic *Escherichia coli* using xylose-glucose-acetate mixtures in batch and continuous cultures. **32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Clearwater Beach, Florida, EUA, 2010. (Poster).

B.3. Marco T. Fernández Sandoval, Gerardo Huerta-Beristain, Guillermo Gosset Lagarda and Alfredo Martínez Jiménez. Fuel ethanol production with bacteria from sugars of agro-industrial residues in the presence of acetate. **VII Reunión Nacional Red Mexicana de Bioenergía**, Cuernavaca, Morelos, México, 2010. (Poster).

B.4. Marco T. Fernández Sandoval, Cristóbal Cara, Alfredo Martínez Jiménez and Eulogio Castro. Fermentation of hydrolysates from pretreated rapeseed straw by xylose-fermenting microorganisms. **Biomass Derived Pentoses: from Biotechnology to Fine Chemistry**. Reims, Francia, 2010. (Poster).

B.5. Marco T. Fernández Sandoval, Alfredo Martínez, Cristobal Cara, Mercedes Pérez and Eulogio Castro. Fermentation of liquors from pretreated olive tree biomass by ethanogenic *Escherichia coli*. **33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Seattle, Washington, EUA, 2011. (Poster).