

Cuernavaca, Morelos a 12 de mayo de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Karla Vianey Martínez Conde**, con el título del trabajo: **Obtención y caracterización de cepas termotolerantes de *Escherichia coli* productoras de ácido D-láctico**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. EDGAR DANTAN GONZALEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. JOSE UTRILLA CARRERI

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LUIS CASPETA GUADARRAMA | Fecha:2021-05-12 14:59:40 | Firmante**

CAC9H718B+eN396MmuXjJmAJ9PJ++rrrv11+BI8jnP9e0XJaJe78zyMnwD5lQd9ZN94OWUS7Dn4P3gJ22r364XGnqvY9T0REIXTROlBjHfQ/R5pF8E+slQPxcLlf06JeqZ74PiEuq+uVRBo+BbboDJYTi+J2PfmY2YwAkOrcCYE1okt9yWZaFGfGi4ofWPSyzET92IMZYQyA9AzONf2+FDYg5RMivveShhEpL8quWxeuWpTP8KAQZxODwNvaV4xcSwWVRCQfEzqDg86Rwb1JVISRyHkMNZBq+NBWnsoF2ibZENkitcnErLQ3/U887O2m8QwxbbYssUISKkNdICg==

**ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ | Fecha:2021-05-12 17:20:39 | Firmante**

IKufzYXDRvUG6e7nAjdPEMfPzjaNkwA7yr1xkXjkHL7VMxwEoYOEuz1pxHYi7GsKC61CFA+QkYcfudnFHH7S/gTnxooDy+mX5DkNGdp/UOjf/+artym7RU9GcVEOjUfB0iXQa/Qh2diDjuudWBsEQILGBKyY24svz0za2f9DjCfFk4pol72E450bupkgOW4AwOJPnxLuq+f9w4v9MmOsaYAiLKjaeA98wy97kjYUp7OHRU1LEzGISHr150LUf/9el5LJsLFy1NIOveR5LDYsduC8NlhwShN4p7yQqOz9oHr6hg4vrH2NcoA4rpeSnRhVc7xxJZ6dG86fTQimg==

**JOSÉ UTRILLA CARRERI | Fecha:2021-05-12 20:34:20 | Firmante**

MOSNh4lv22LGhZrc6gd+llf8+xn+6VI0k8SFuxDrKLx/oyZg4a+XCJUvuPxsCo9xTdlaujg8fow87iVQ9mUMVddgr7CmZC3MI+wgCgVjuorVj07N7nVIC/XdY1z8EYdlCDzWVWnvxwgTLRwrraJ7O6gF37hZK1qTgZlqUVQDTZ6cYka4Xn5mfA++XS4DgtYlxxbTOgsbqYXOnGsXujDFtVoSVX9yyTokZZGIQDh4VSCyh44NHwZDCIECdZOL6+Stf+Z86TPkBzZaSoOLuzD9Jl3VwQp+8Ct026tJpTHHbaiTdPSQ9T1StdVWVrGMD7pFtiOVsfY+gLAKxlvzFBWLA==

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2021-05-12 20:37:08 | Firmante**

IzutgbC5/w9SGhKfhrAduc8A+sED1xoGCKUEWCILwt2lwr89DWQSAWQxYBwqe+pUwOWwmjzyYr5VyPuGQ+3uHGAF15tNaNSEPOZ03N0sIVcqAkEwLfKqvyYUGNI/gjkkGs5ScGJV3zeQ+CcnO284VbNqTZ8PAjPn0GT0wHUPA60hqXC1O59uBhgELNqYeUfrshebgZRhGNFYlsy5Ru4eqqTPznqQ21pjaW0cjAob5JUthGO4O8ciZ17E0tWx4ahoZZGnbfWyHka6N9PYJ84UasAytPIbsOlyxREWQDneJAsbGiMT3QMBZCbusC+L6fDQtdc2V35BKl0l3LjIRNu+A==

**EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2021-05-19 08:17:56 | Firmante**

kuhFqLwS5bM6DTMEU4Kkk3RBZk1EDXygAiJOwcFNbf+Df73nYxo5wLC3AD2ugD6THOXNoVPuO1xKCqwf0pBxkjWK2yZNxlzVAqgNXyT2sDmAilrszP0JS9nUE/9acx/jpfPDR9j9qJT3SkcdGNwvLIYZtSH049ypB4MQbn7u4hLTKUqMtwJOr+u0ydRbK15dfJ8sKG1F+9PxFhGJOHDcNAY6ipj8LCqkGCvggag1A/EwgurKPEqPOcWEK3GmhkLk1ve9SOFWtJ7URSW3541qV/y2R5e1gTQYSjmEsWFLiHPhuF8cO43YKOSHFNIJQJ5AluzV6cdcrf7x5+9kATIOA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



giEAW1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5JUXL3yKQLa2gSrVfm6tE7KwtenzlqMG>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS  
TERMOTOLERANTES DE *Escherichia coli*  
PRODUCTORAS DE ÁCIDO D-LÁCTICO**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**KARLA VIANEY MARTÍNEZ CONDE**

**DIRECTOR**

**DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ**

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

Para su realización se contó con el financiamiento de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM: IV100119; y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con un apoyo de beca a Karla Vianey Martínez Conde, como ayudante de investigador, con número de expediente ayudante 17626.

## **Dedicatoria:**

A mi papá Renato por darme el carácter, coraje y motivación para realizar con entrega todo aquello que me propongo. Gracias por dejarme ser tu princesa. A mis hermanos Renato y Ricardo por ser el motor para ser mejor y poder darles el ejemplo como hermana mayor, por acompañarme en todo momento. Gracias porque a pesar de las peleas están ahí, sin dejarme caer. A mi mamá Rosa que a pesar de la distancia ha estado cerca como una madre.

Gracias por todo su amor y apoyo.

Los amo.

**“Si puedes soñarlo, puedes lograrlo.”**

Walt Disney

## **Agradecimientos**

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo. Porque a pesar de las dificultades, me brindó su apoyo y confianza para realizar el proyecto. Me llevo un gran aprendizaje de usted como profesional y como ser humano. Gracias por creer en la “magia tepozteca” para obtener las cepas termotólerantes.

Al Dr. Luis Caspeta Guadarrama por sus enseñanzas en clase y en laboratorio, por sus aportaciones y apoyo durante el proyecto.

A mis sinodales, Dr. José Utrilla Carreri, Dr. Edgar Dantán González y Dr. Ramón Suárez Rodríguez por sus observaciones y aportaciones al proyecto en cada seminario.

Al M. en C. Tlakaheel A. Rios por sus enseñanzas y paciencia. A pesar de tus regaños aprendí muchísimo de ti. Eres una increíble persona y un gran amigo.

A la Dra. Estefanía Sierra por sus enseñanzas y recomendaciones durante el proyecto.

Al personal académico, por su apoyo técnico y metodológico. A la M. en C. Georgina Hernández por su enorme paciencia, apoyo y disposición en el HPLC, sin usted no habría sido posible gran parte de este proyecto. A la Q. I. Luz María Martínez Mejía por su ayuda en técnicas de biología molecular, y también por los ricos postres.

Al personal técnico. A la Sra. Aurelia Gonzales, que además de brindarme apoyo técnico, siempre me recibió con un enorme abrazo al llegar al laboratorio. al Biól. Manuel Saucedo por su dedicación.

A Iseo, Fide y Pato por sus aportaciones al proyecto, pero también por la amistad que me brindaron, por el chisme intenso y risas en fermentaciones. Al grupo selecto de las microalgas, Carlitos, Francisco, Leo, por tantas risas y ocurrencias. Los quiero muchísimo.

A Dani, Fer, Angie por escucharme y acompañarme cuando que lo necesitaba. Me llevo su amistad por siempre, pegguitos.

A Fabian por su amistad y compañía, por las tardes de entrenamiento y mucha comida. Eres una persona muy especial para mí.

A todo el laboratorio de IVM por hacer mi estadía más amena y cálida, me llevo un poquito de todos. Siempre recordaré con emoción los jueves deportivos y los días de convivio.

A la administración de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UAEM. Al Biól. Samuel Aréchaga por facilitar siempre mis tramites. Al Dr. José Guadalupe Granados Ramírez por su apoyo incondicional. A todos los académicos que fueron parte de mi formación profesional.

A mis amigos de la facultad; Marce, Alo, Hugo, Bryan, Dany, Zuri y Regi, por ser parte de esta aventura.

## Indice

<b>I. Resumen.....</b>	<b>10</b>
<b>II. Introducción .....</b>	<b>12</b>
<b>III. Marco teórico .....</b>	<b>16</b>
3.1. Generalidades del ácido láctico .....	16
3.2. Aplicaciones del ácido láctico .....	16
3.3. Síntesis del ácido láctico.....	17
3.3.1. Síntesis química .....	17
3.3.2. Síntesis biológica .....	17
3.4. Fermentación de ácido láctico a partir de residuos lignocelulósicos.....	19
3.5. Sacarificación y fermentación simultanea .....	22
3.6. <i>Escherichia coli</i> lactogénica .....	23
3.7. Evolución adaptativa en laboratorio (ALE).....	25
<b>IV. Antecedentes.....</b>	<b>29</b>
4.1. <i>Escherichia coli</i> JU15*.....	29
4.2. Efecto de la temperatura y termotolerancia en <i>Escherichia coli</i> .....	30
4.3. Evolución adaptativa en laboratorio térmica: termotolerancia .....	34
<b>V. Justificación .....</b>	<b>35</b>
<b>VI. Hipótesis .....</b>	<b>36</b>
<b>VII. Objetivos .....</b>	<b>37</b>
7.1. Objetivo general.....	37
7.2. Objetivos específicos .....	37
<b>VIII. Materiales y métodos.....</b>	<b>38</b>
8.1. Microorganismos .....	38
8.2. Obtención de cepas termotolerantes mediante evolución adaptativa en laboratorio ....	38
8.2.1. Medio de cultivo y condiciones para la evolución adaptativa en laboratorio.....	38
8.2.1.1. Medio de cultivo .....	38
8.2.1.2. Condiciones en minifermentadores.....	39
8.3. Recuperación de la cepa JU15* e inicio de la evolución adaptativa .....	39
8.4. Pases durante la evolución adaptativa en laboratorio y preparación .....	40

8.5.	Selección y evaluación de las variantes termotolerantes .....	41
8.5.1.	Preparación de cultivo para el preinóculo.....	41
8.5.2.	Preparación de cultivo para inóculo.....	42
8.5.3.	Preparación de cultivo para la fermentación.....	42
8.6.	Métodos analíticos .....	43
8.6.1.	Cuantificación de la biomasa.....	43
8.6.2.	Cuantificación de la glucosa y ácido láctico.....	43
8.6.3.	Medición de los parámetros cinéticos y estequiométricos.....	43
<b>IX.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>46</b>
9.1.	Evolución adaptativa en laboratorio en la cepa JU15* .....	46
9.2.	Obtención de cepas termotolerantes .....	47
9.3.	Selección de variantes termotolerantes .....	51
9.4.	Evaluación de las cepas termotolerantes.....	52
9.4.1.	Evaluación de JU15*, ECL45 y ECL47 a 37 °C .....	53
9.4.2.	Evaluación de JU15*, ECL45 y ECL47 a 45 °C .....	56
<b>X.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>59</b>
<b>XI.</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>60</b>
<b>XII.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>61</b>
<b>XIII.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>68</b>
<b>Apéndice 1.....</b>	<b>68</b>	
<b>Apéndice 2.....</b>	<b>69</b>	
<b>Apéndice 3.....</b>	<b>70</b>	

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales aplicaciones del PLA.....	14
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos utilizados.....	38
<b>Tabla 3.</b> Número de pases y generaciones de cada temperatura a evaluar a partir de la primera transferencia.....	50
<b>Tabla 4.</b> Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, ECL45 y ECL47. ....	53
<b>Tabla 5.</b> Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15*, ECL45 y ECL47 a 45°C. ....	56
<b>Tabla 6.</b> Grupo de genes identificados en el estudio de Murata y colaboradores (2018). ....	68
<b>Tabla 7.</b> Análisis estadístico ANOVA.....	70

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química del ácido láctico .....	16
<b>Figura 2.</b> Diagrama de flujo general del proceso convencional para la producción de ácido láctico a partir de biomasa lignocelulósica.....	21
<b>Figura 3.</b> Técnicas de evolución adaptativa en laboratorio.....	28
<b>Figura 4.</b> Metabolismo de <i>Escherichia coli</i> JU15.....	30
<b>Figura 5.</b> Equipo empleado durante ALE .....	39
<b>Figura 6.</b> Tren de pasos para la recuperación de la cepa JU15* .....	40
<b>Figura 7.</b> Tren de pasos para llevar a cabo las transferencias durante ALE y preparación de crioviales. ....	41
<b>Figura 8.</b> Determinación morfológica de las colonias a seleccionar. ....	41
<b>Figura 9.</b> Cambio en la velocidad de crecimiento durante la evolución adaptativa. ....	50
<b>Figura 10.</b> Selección de variantes. ....	52
<b>Figura 11.</b> Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido D-láctico de las cepas JU15*, ECL45 y ECL47 en medio mineral AM1 y 40 g/L de glucosa. ....	53
<b>Figura 12.</b> Producción de ácido D-láctico a 37°C. ....	54
<b>Figura 13.</b> Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa JU15*, ECL45 y ECL47 en medio AM1 con 40 g/L de glucosa.....	54
<b>Figura 14.</b> Producción de ácido D-láctico a 45 °C. ....	56
<b>Figura 15.</b> Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa JU15*, ECL45 y ECL47 en medio AM1 con 40 g/L de glucosa.....	57
<b>Figura 16.</b> Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa ECL45 y ECL47 en medio AM1 con 40 g/L de glucosa a 45 °C. ....	57
<b>Figura 17.</b> Comparación de crecimiento en medio AM1 suplementado con casa aminoácidos, metionina y medio LB. ....	69
<b>Figura 18.</b> Comparación de la velocidad específica de crecimiento mediante análisis estadístico ANOVA de las cepas obtenidas por ALE ( <b>ECL45 y ECL47</b> ) y la cepa ancestral ( <b>JU15*</b> ) a 37° C. ....	70
<b>Figura 19.</b> Comparación de la velocidad específica de crecimiento mediante análisis estadístico ANOVA de las cepas obtenidas por ALE ( <b>ECL45 y ECL47</b> ) y la cepa ancestral ( <b>JU15*</b> ) a 45° C .....	71

## Símbolos

%	Porcentaje
±	Más menos (Desviación estándar)
Δ	Eliminación de gen (es)
°C	Grado centígrado
μm	Micrómetro
g	Gramo
h	Hora
L	Litro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
N	Normal

## Abreviatura

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALE	Adaptive laboratory evolutionon (Evolución adaptative en laboratorio)
ANOVA	Analysis of variance (Análisis de varianza)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
DCW	Dry cell weight (peso seco de células)
DO 600nm	Densidad óptica a 600nm de longitud de onda
Fc	F calculada
Ft	F de tablas
Kb	Kilo bases
Pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrogeno
rpm	Revoluciones por minuto
SSF	Simultaneous saccharification and fermentation (Sacarificación y fermentación simultanea)

## I. Resumen

La crisis ambiental y social por la que atraviesa el mundo actual requiere de una economía de base biológica (bioeconomía), para la producción sostenible de una amplia gama de productos que incluyen productos bioquímicos como el ácido láctico y bioplásticos como el ácido láctico polimerizado o PLA. De modo que el interés por materias primas que no compitan por el insumo alimenticio y el uso de suelo agrícola ha permitido proponer el uso de desechos lignocelulósicos. Sin embargo, en procesos de conversión como la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) para la fermentación de azúcares a ácido láctico está limitada por la falta de microorganismos que cumplan los requerimientos y vuelvan a este proceso totalmente rentable. Los requerimientos sugieren a microorganismos, que además de fermentar de manera rápida, eficiente y con requerimientos nutricionales simples, lo hagan a temperaturas entre 45 °C y 50 °C. A pesar de que existen diferentes cepas de *Escherichia coli* modificadas por ingeniería de vías metabólicas que cumplen con muchos de los requisitos de fermentación y bajos requerimientos nutricionales, la temperatura óptima de crecimiento de estas cepas es de 37 °C, por lo cual, no coincide con la temperatura requerida para SSF. En el presente proyecto, mediante evolución adaptativa en laboratorio, y después de 31 transferencias en cultivo en lote se obtuvieron variantes de la cepa lactogénica de *Escherichia coli* JU15\*, las cuales se comprobó fueran capaces de crecer a 45 °C. Posteriormente, una vez seleccionada y evaluada, la cepa ECL45 se sometió a una segunda etapa de evolución adaptativa con el fin de obtener y seleccionar otra variante capaz de crecer a 47 °C después de 49 transferencias. De igual manera, se seleccionó y evaluó la cepa denominada ECL47. En comparación con la cepa progenitora JU15\*, las cepas ECL45 y ECL47 a 37 °C fueron capaces de crecer a una velocidad específica similar, en promedio 0.22 h<sup>-1</sup> y de fermentar 40 g/L de glucosa con rendimientos de 0.83, 0.39 y 0.53 g LACTATO /g GLUCOSA, con una productividad

volumétrica de 1.42, 1.00 y 1.35 g LACTATO /L\*h. Respectivamente, la cepa JU15\* no es capaz de crecer a temperaturas mayores a 43 °C. De manera relevante, a 45 °C, ECL45 y ECL47, crecieron con una velocidad específica en promedio de 0.20 h<sup>-1</sup>, produjeron lactato con un rendimiento de 0.89 y 0.76 g LACTATO/g GLUCOSA, logrando una productividad volumétrica de 1.06 y 1.30 g LACTATO /L\*h., respectivamente. Estos resultados demuestran que fue posible evolucionar a la cepa lactogénica de *E. coli* JU15\* y mantener su propiedad de crecer y fermentar glucosa a lactato a temperaturas mayores a 43 °C. Se sugiere que los cambios moleculares generados en las cepas sean dilucidados mediante estudios de secuenciación genómica, ingeniería reversa y caracterización en biorreactores para determinar y entender que modificaciones genéticas y fisiológicas le confirieron la capacidad de crecer y fermentar a temperaturas elevadas, en medio mineral y en ausencia de aireación.

## **II. Introducción**

El incremento de la población y los avances tecnológicos han encaminado a los plásticos a ser el principal componente dentro de la extensa gama de materiales más utilizados por la sociedad moderna. Sin embargo, la mayoría de los monómeros empleados para fabricar estos polímeros se derivan de hidrocarburos fósiles, volviéndose de carácter no renovable y no biodegradable. Como resultado, se acumulan y persisten en el ambiente durante un periodo de tiempo indefinido, generando daños a los diferentes ecosistemas, y así mismo, a la salud humana (Brockhaus et al., 2016). A medida que se conoce la problemática ambiental y social que ocasionan los polímeros sintéticos, aunado al futuro agotamiento de los combustibles fósiles, se ha hecho un esfuerzo considerable por buscar y desarrollar tecnologías sustentables que permitan sustituirlos (Andrady y Neal, 2009; Geyer et al., 2017).

La producción de bioplásticos surge como una alternativa viable y sostenible para mitigar el efecto negativo que causan los polímeros sintéticos. En comparación, los biopolímeros pueden originarse de fuentes renovables, ser biodegradables o exhibir ambas características (Karan et al., 2019). Al ser biodegradables, logran convertirse en material celular, principalmente de microorganismos, y descomponerse en moléculas más pequeñas (dióxido de carbono, agua y otras moléculas de bajo peso molecular) a través de compostaje, evitando su acumulación y un menor impacto ecológico (Avérous, 2008; Tokiwa et al., 2009; Luckachan y Pillai, 2011). El término bioplástico engloba a un extenso grupo de materiales con diversas propiedades y aplicaciones. En la actualidad existen diversos ejemplos de biopolímeros, los más comúnmente conocidos son: poliglicólido (PGA), policaprolactona (PCL), polihidroxialcanoatos (PHA), poli-succinato de butileno (PBS), poli adipato de butileno con tereftalato (PBAT) y polilácticos (PLA) (Tokiwa et al., 2009).

A pesar de que los materiales antes mencionados son considerados biopolímeros, no siempre se originan totalmente de fuentes renovables (algunos presentan proporciones petroquímicas), ni son biodegradables, lo que resulta contraproducente en el afán por buscar tecnologías sostenibles. Asimismo, uno de los polímeros más prometedores para desplazar a sus homólogos a base de petróleo es el ácido poliláctico o PLA, que a diferencia de otros biopolímeros, puede obtenerse de recursos renovables, ser biodegradable y a su vez, cumplir con funciones similares a la de los polímeros convencionales (Hamad et al., 2018; Heidbreder et al., 2019; Thakur et al., 2018).

El PLA es un poliéster alifático termoplástico biodegradable, producto de la polimerización de monómeros de ácido láctico, un ácido orgánico cuya molécula es quiral con dos enantiómeros ópticos (L (+) y D (-)), y que al poseer moléculas quirales, puede existir en cuatro formas diferentes: poli (L-ácido láctico) (PLLA), poli (D-ácido láctico) (PDLA), poli (D, L, ácido láctico) (PDLLA) una mezcla racémica de PLLA y PDLA, y meso-poli (ácido láctico) ( Lim et al., 2008; Luckachan y Pillai, 2011; Ulery et al., 2011). Las cualidades como la alta resistencia mecánica, cristalinidad y biodegradabilidad se ven influenciadas por la composición de los enantiómeros ópticamente puros activos de ácido láctico presentes en cada una sus formas (Drumright, Gruber, & Henton, 2000; Nofar, Sacligil, Carreau, Kamal, & Heuzey, 2019).

Además de ser biodegradable, el PLA destaca por su biocompatibilidad, baja toxicidad y su capacidad para personalizarse en diferentes grados de resinas, y así procesarse a una gran variedad de productos (**Tabla 1**). Dado que sus propiedades son ideales para la fabricación de materiales médicos, ingeniería de tejidos, envasado de alimentos, entre otros, se prevé que la producción y uso de PLA como una alternativa rentable para sustituir a los plásticos sintéticos se incremente considerablemente en un futuro cercano ( Drumright et al., 2000; Avérous, 2008; Lim et al., 2008; Ulery et al., 2011; Singhvi et al., 2019).

**Tabla 1.** Principales aplicaciones del PLA, resaltando su versatilidad en el área biomédica (Drumright et al., 2000; Lim et al., 2008; Ulery et al., 2011; Nofar et al., 2019).

Área biomédica	
Material médico	Farmacéutica
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dispositivos de implante</li> <li>• Barras de fijación ortopédica: placas, tornillos, suturas</li> <li>• Cubierta de heridas</li> <li>• Dispositivos cardiovasculares: estents coronarios e injertos arteriales</li> <li>• Andamios para la remodelación de tejidos (ingeniería de tejidos)</li> <li>• Material dental</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistema de administración de medicamentos</li> <li>• Tratamientos dermatológicos</li> </ul>
Área industrial	
Envasado	Otros
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolsas</li> <li>• Recipientes</li> <li>• Placas de comida</li> <li>• Empaquetado de verduras</li> <li>• Envases de alimentos líquidos y sólidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibras textiles</li> <li>• Filamentos de impresoras 3D</li> <li>• Recubrimiento electrónico y automotriz</li> </ul>

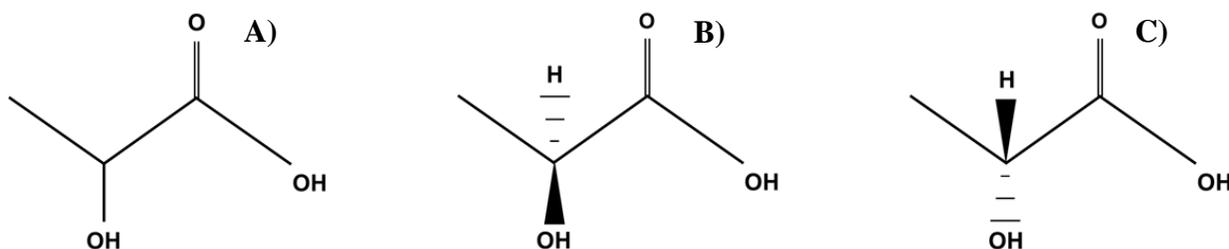
No obstante, el PLA aún presenta deficiencias importantes, como baja procesabilidad, alta fragilidad a la fusión y baja tenacidad, lo que limita sus aplicaciones. Para superar estas limitaciones, se ha propuesto el estudio y desarrollo de diversos sistemas de mezclas

enantioméricas, probando la proporción de cada enantiómero puro activo de ácido láctico, resaltando la importancia de los enantiómeros ópticamente puros, los que únicamente se pueden obtener a partir de la producción biotecnológica de ácido láctico (Nofar et al., 2019). Por otro lado, se han realizado múltiples investigaciones sobre el desarrollo tecnológico para la producción a gran escala de ácido láctico con la finalidad de permitir que el proceso sea más efectivo y económico. Como producto bioquímico, el ácido láctico debe producirse biológicamente a partir de materiales de partida baratos, por ejemplo, los residuos lignocelulósicos. De esta manera se contribuiría a la búsqueda de tecnologías sustentables y al mismo tiempo, se permitiría la obtención de enantiómeros ópticamente puros (Okano et al, 2010; Eiteman y Ramalingam, 2015).

### III. Marco teórico

#### 3.1. Generalidades del ácido láctico

El ácido láctico (ácido 2-hidroxi-propanoico),  $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ , es un ácido orgánico débil, conformado por un grupo hidroxilo unido a un carbono adyacente de un grupo carboxilo. Se caracteriza por la presencia de un centro quiral, por lo que puede existir en dos formas enantioméricas; L (+) y D (-) ácido láctico (**Figura 1**). La presencia de un carbono asimétrico le ha permitido desenvolverse como una sustancia química eficiente para el desarrollo de diferentes productos de alto valor agregado (Eiteman y Ramalingam 2015; Juturu y Wu 2016; PubChem, 2019).



**Figura 1.** Estructura química del ácido láctico **A**) y sus enantiómeros ópticos **B**) L- (+)- láctico, **C**) D (-)-láctico.

#### 3.2. Aplicaciones del ácido láctico

Desde su descubrimiento, el ácido láctico ha tomado una posición privilegiada dentro de la industria. Al ser reconocido como sustancia alimentaria segura (GRAS por sus siglas en inglés) por la federación de drogas y alimentos (FDA por sus siglas en inglés) de los EE. UU., se ha empleado principalmente en la industria de los alimentos, para el procesamiento de carnes, regulación de pH, elaboración de conservadores, saborizantes e inhibición bacteriana. Igualmente, dentro de la industria farmacéutica ha tomado relevancia, como regulador de pH, intermediario quiral, agente quelante, componente natural de medicamentos, preparación de soluciones intravenosas y de diálisis. Por otro lado, en la industria cosmética se ha utilizado para el desarrollo

de cremas hidratantes, humectantes, antiacné, rejuvenecedoras y aclarantes. Y en industria química como regulador de pH, solvente, agente quelante, agente de limpieza e intermedio quirral. (Eiteman y Ramalingam, 2015; Juturu y Wu, 2016; Martínez et al., 2017). No obstante, en la última década, la demanda de ácido láctico ha proliferado notablemente debido a su uso como componente base del PLA (Drumright et al., 2000; Lim et al., 2008).

El tamaño del mercado mundial de ácido láctico fue valuado en 2018 en 2.64 mil millones USD y se espera que crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR por sus siglas en inglés) del 18.7% de 2019 a 2025. En América las principales industrias productoras son Danimer Scientific LLC, NatureWorks LLC y Hawking, entre otros. (Grand View Research, 2020).

### **3.3. Síntesis del ácido láctico**

El ácido láctico puede originarse por dos vías:

#### **3.3.1. Síntesis química**

La obtención sintética de ácido láctico se ha basado particularmente en la hidrólisis de lactonitrillo por ácidos o bases fuertes para después ser hidrolizado. Otras técnicas consisten en la degradación de azúcares catalizadas por bases. El ácido láctico sintético hecho de materias primas petroquímicas es ópticamente inactivo, es decir, una mezcla racémica, por lo tanto, no se logran obtener isómeros ópticamente puros. Por lo anterior, no resulta un proceso técnica y económicamente sostenible para la producción de este compuesto (John et al., 2007; Okano et al., 2010; Juturu y Wu, 2016).

#### **3.3.2. Síntesis biológica**

Hoy en día cerca del 90% de la producción total de ácido láctico se obtiene por medio de fermentación de azúcares, ya que contrario a la síntesis química, ofrece superioridad en términos

e utilización de energías renovables, baja temperatura y bajo consumo de energía para su producción, y alta especificidad, de modo que sus formas enantioméricas se encuentran de manera independiente (L o D – ácido láctico) (Okano et al. 2010; Eiteman y Ramalingam 2015; Juturu y Wu 2016;). El empleo adecuado de microorganismos puede producir selectivamente los enantiómeros requeridos. Existen organismos capaces de sintetizar ácido láctico de manera natural, si bien, cepas de hongos como *Mucor*, *Monilia* y *Rhizopus* y bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Escherichia* son algunos ejemplos (John et al., 2007). En aplicaciones biotecnológicas y relacionadas con los alimentos se han empleado mayormente bacterias ácido lácticas (LAB por sus siglas en inglés) (John et al., 2007; Okano et al., 2010; Cubas-Cano et al, 2018; Eş et al., 2018). Sin embargo, su capacidad de fermentar diferentes fuentes de carbono, específicamente azúcares de cinco carbonos son ineficientes. Por otro lado, las LAB durante su evolución perdieron la capacidad de sintetizar sus propios factores de crecimiento, por lo que necesitan altos requerimientos nutricionales y condiciones específicas para su desempeño, lo que las vuelve poco atractivas económicamente para la producción a escala industrial de ácido láctico para ser utilizado como precursor viablemente económico para la manufactura de PLA (Narayanan et al.,2004).

Con el fin de no competir por el uso de suelo agrícola y el suministro de alimentos, la conversión biológica tiene un papel importante en la utilización de residuos lignocelulósicos, ya que es probable que puedan contener sustratos útiles, que pueden usarse para la síntesis de ácido láctico (Eiteman y Ramalingam, 2015; Fatma et al., 2018).

### **3.4. Fermentación de ácido láctico a partir de residuos lignocelulósicos**

El creciente interés por mitigar los problemas ambientales y sociales que provoca el alto consumo de productos petroquímicos, ha reforzado la motivación para producir productos químicos a partir de recursos renovables (Karan et al., 2019).

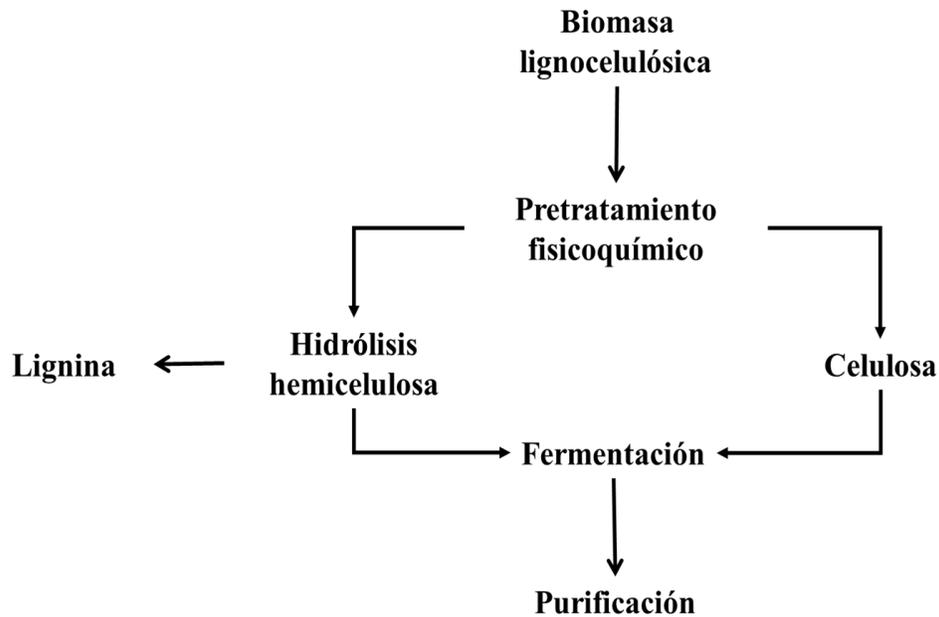
La biomasa lignocelulósica de fuentes agrícolas, agroindustriales y forestales representan una materia prima de carbohidratos potencialmente económica para la fermentación a gran escala de ácido láctico, esto debido a su abundancia, bajo precio, alto contenido de polisacáridos y su carácter renovable (Abdel-Rahman et al., 2011). La biomasa lignocelulósica es constituyente de la pared celular de las plantas y se compone principalmente de tres polímeros (celulosa, hemicelulosa y lignina), que están asociados entre sí, y dependiendo del tipo de biomasa varía su contenido (Fatma et al., 2018). La celulosa se encuentra en mayor proporción dentro de la biomasa vegetal (40-60% de la materia seca total), es un polisacárido-macromolecular lineal que se compone de una región amorfa y cristalina, está formada por una cadena larga de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$  - 1,4 glucosídicos. La segunda fracción corresponde a la hemicelulosa (15-30% de la materia seca total), un heteropolímero corto y altamente ramificado de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (galactosa, glucosa y manosa) y azúcares ácidos, que a diferencia de la celulosa, se puede descomponer fácilmente en monosacáridos debido a su naturaleza no cristalina y al bajo grado de polimerización. La última fracción corresponde a lignina (10-25% total de la materia seca total), un heteropolímero aromático formado por alcoholes cinamílicos, que sirve como protección a las fracciones que se encuentran en mayor proporción y que se encarga de dar rigidez a las plantas (Almeida et al., 2007; Hendriks y Zeeman, 2009; Hassan et al., 2018). . Múltiples factores como la complejidad de los componentes de la pared celular, la heterogeneidad estructural, la cristalinidad de la celulosa y el grado de lignificación son responsables de la

capacidad recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, lo que la hace resistente a la descomposición biológica y química (Almeida et al., 2007). Para llevar a cabo el uso eficiente y poder aprovechar la biomasa, es necesario aplicar procesos fisicoquímicos, biológicos y/o termoquímicos para acceder a sus componentes principales. El método más común es la hidrolisis y fermentación separadas (SHF por sus siglas en inglés), que consiste en cuatro pasos esenciales (Figura 2) (Abdel-Rahman et al., 2011):

- 1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica:** donde se lleva a cabo la ruptura de la cubierta de lignina y la región cristalina de la celulosa mejorando el acceso a las enzimas e hidrolizando parte de la fracción de hemicelulosa. El pretratamiento puede ser fisicoquímico, mecánico, termoquímico o biológico, la elección puede tomarse de acuerdo al tipo de material lignocelulósico a emplear (Zhao et al., 2020).
- 2. Hidrolisis enzimática de la biomasa pretratada:** durante este paso, la lignocelulosa es capaz de descomponerse hidrolíticamente en azúcares simples a través de enzimas lignocelulósicas (endoglucanasas, celobiohidrolasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas), que actúan aleatoriamente sobre enlaces glucosídicos en la región amorfa de celulosa, liberando oligosacáridos con distintos grados de polimerización, obteniendo finalmente un jarabe rico en glucosa. Las condiciones óptimas para la actividad enzimática son: temperaturas de 45° a 50°C y pH 4-5 (Maitan-Alfenas et al., 2015).
- 3. Fermentación de los azúcares hidrolizados a ácido láctico:** una vez despolimerizados los azúcares se fermentan a ácido láctico por microorganismos. En el caso de las hexosas (glucosa, galactosa y manosa) se fermentan más fácilmente en comparación a las pentosas (principalmente xilosa, seguido de arabinosa), ya que pocos microorganismos tienen la capacidad de internalizarlas y fermentarlas, por lo que a menudo resulta también ser una

limitante en el empleo de organismos (Abdel-Rahman et al., 2011; Maitan-Alfenas et al., 2015)

- 4. Purificación del ácido láctico:** finalmente al terminar la fermentación, con la finalidad de separar al ácido láctico de otros posibles productos, es importante llevar a cabo su purificación, para posteriormente comercializarlo. El proceso de lactato de calcio que se basa en la precipitación de hidróxido de calcio es el más empleado para su purificación y actualmente se emplea a escala industrial (Cubas-Cano et al., 2018).



**Figura 2.** Diagrama de flujo general del proceso convencional para la producción de ácido láctico a partir de biomasa lignocelulósica (adaptado de Abdel-Rahman et al., 2011).

Con el objetivo de disminuir el gasto de energía, tiempo del proceso, inhibición enzimática y mejorar la purificación del producto, se ha propuesto mejorar el método de hidrólisis enzimática; que consiste en acoplar los pasos dos y tres presentados en la Figura 2; dando como resultado la sacarificación y fermentación simultánea (SSF por sus siglas en inglés) (Venkatesh, 1997; John et al, 2009).

### **3.5. Sacarificación y fermentación simultánea**

Para un mejor aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos estos requieren ser sometidos a procesos de hidrólisis enzimática con la finalidad de obtener la mayor proporción de azúcares fermentables, principalmente glucosa, para la síntesis de ácido láctico. No obstante, durante la hidrólisis enzimática, las enzimas están sujetas a inhibición por retroalimentación debido a la acumulación de monosacáridos, ocasionando que se requiera un mayor empleo de enzimas y se reduzca la hidrólisis (Anuradha et al., 1999). Para contender con estos problemas, se ha sugerido un método llamado sacarificación y fermentación simultánea (SSF por sus siglas en inglés), que consiste en acoplar la hidrólisis enzimática con la fermentación. El proceso de SSF tiene ventajas como: 1) aumentar la tasa de hidrólisis, 2) reducir la inhibición de la actividad enzimática, 2) disminuir los requerimientos de enzimas, 3) elevar el rendimiento del producto, 4) disminuir el tiempo de proceso y 5) disminuir los costos totales (Venkatesh, 1997; Anuradha et al., 1999; Eş et al., 2018). A pesar de las ventajas que ofrece la SSF, la temperatura afecta al proceso, porque la temperatura óptima de la hidrólisis enzimática (45 °C a 50 °C) y la de los microorganismos que fermentan (27 °C a 37 °C) no coinciden, por lo que contar con microorganismos termotolerantes permitiría resolver esta limitante (Caspeta y Nielsen, 2015). Por otro lado, el empleo de técnicas de evolución adaptativa ha permitido el desarrollo de microorganismos que son capaces de crecer a la temperatura requerida para la hidrólisis enzimática y al mismo tiempo la eficientemente fermentación de ácido láctico (Anuradha et al., 1999; John et al, 2009). Con el propósito de evitar el incremento en costos de producción de ácido láctico a partir de materia lignocelulósica, es preferible que los microorganismos cumplan ciertos requisitos, tales como: que fermenten de manera rápida, consuman diferentes fuentes de carbono con adiciones mínimas de nutrientes

nitrogenados, valores reducidos de pH, y la menor formación de subproductos (Narayananm et al. 2004).

### **3.6. *Escherichia coli* lactogénica**

Un organismo que cumple con los requerimientos antes mencionados para la fermentación de ácido láctico a partir de biomasa lignocelulósica es *Escherichia coli* (Orencio-Trejo et al., 2010; Utrilla et al., 2016; Martínez et al., 2017). El amplio conocimiento fisiológico, genético, metabólico y molecular, así como la fácil manipulación y rápido crecimiento, son cualidades que han puesto a *E. coli* en el centro de la investigación en diferentes áreas científicas (Blount, 2015). La ingeniería de vías metabólicas, mediante técnicas de ingeniería genética y ADN recombinante, ha permitido someter a *E. coli* a diversas modificaciones con el objetivo de mejorar su capacidad como biocatalizador empleado a nivel industrial (Balbas, 2002; Martínez y Gosset, 2007). Existen cepas de *E. coli* capaces de crecer bajo condiciones tanto aerobias, como anaeróbicas, por lo que en condiciones anaerobias (fermentativas) pueden transformar sustratos de carbono como hexosas y pentosas a diferentes productos químicos, entre ellos el ácido láctico (Orencio-Trejo et al. 2010; Martinez et al., 2017). A pesar de que *E. coli* produce ácido láctico bajo condiciones simples, se le han hecho modificaciones para obtener una vía homofermentativa y así tener como producto L o D – láctico, evitando la formación de subproductos que compitan por el flujo de piruvato. Se ha demostrado que la eliminación de genes *pfl*, *adh*, *frd* que codifican para las enzimas piruvato formiato liasa, alcohol deshidrogenasa y fumarato reductasa, respectivamente, permite mejorar el flujo de piruvato hacia la formación de ácido láctico, mientras que la sobre expresión de *ldhL* o *ldhA* (lactato deshidrogenasas) serán importantes para la fermentación de L o D – ácido láctico (Martínez et al., 2017; Orencio-Trejo et al., 2010).

Además de la capacidad para producir tanto L como D – ácido láctico en medios de cultivo simples, *E. coli* puede transformar jarabes obtenidos de hidrolizados lignocelulósicos, ya que en comparación con otros microorganismos, esta bacteria puede consumir los diferentes monosacáridos presentes, principalmente los que se encuentran en mayor abundancia como lo son glucosa y xilosa (Martinez et al., 2017). Se ha demostrado que *E. coli* es capaz de internalizar los azúcares a través de transportadores específicos e inespecíficos presentes en la membrana y que juegan un papel importante en el crecimiento, desarrollo y funcionalidad del organismo (Ríos, 2019). El sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS por sus siglas en inglés), se ha reportado como principal transportador de glucosa en *E. coli*, además de regular el fenómeno de represión catabólica (Aguilar et al., 2012). Por otro lado, existen otros transportadores que permiten la internalización de otras fuentes de carbono. En el caso específico del transporte de xilosa involucra un transportador de tipo ABC, denominado XylFGH. No obstante, a diferencia del transporte de glucosa se invierte un mayor gasto energético, invirtiendo una molécula más de ATP. Por ello, los investigadores se han centrado en aumentar la disponibilidad energética durante el crecimiento y fermentación cuando se emplea xilosa como fuente de carbono. La eliminación del operón *xylFGH* aunado a una estrategia de evolución adaptativa en laboratorio han permitido que *E. coli* sea capaz de consumir xilosa de manera eficiente y sin comprometer un mayor gasto energético (Utrilla, 2010; Martínez et al., 2017).

Las modificaciones por IVM en *E. coli* han permitido un desempeño positivo en la producción de ácido láctico a partir de hidrolizados lignocelulósicos. Sin embargo, al querer llevar a cabo la SSF se ve aún limitado, ya que las condiciones óptimas de cultivo de este organismo son de 37°C y pH 7. La evolución adaptativa se ha empleado como herramienta de la IVM con el

objetivo de superar limitaciones de crecimiento, en este caso; la temperatura (Orencio-Trejo et al., 2010; Martínez et al., 2017).

### **3.7. Evolución adaptativa en laboratorio (ALE)**

La evolución de los organismos vivos es la consecuencia de dos procesos. Primero, la evolución depende de la variabilidad genética generada por las mutaciones que surgen continuamente en las poblaciones. Y segundo, también depende de los cambios dentro de estas poblaciones a lo largo del tiempo. Durante años, los biólogos se han interesado en observar la dinámica evolutiva directamente. Sin embargo, la biología evolutiva ha estado dominada por estudios descriptivos, teóricos y comparativos, siendo susceptible al estudio directo. El empleo de otras disciplinas de la biología y nuevas tecnologías experimentales han dado paso al desarrollo de la evolución experimental, la cual se basa en la observación y estudio directos de la dinámica evolutiva en tiempo “real”, con el propósito de comprender la adaptación, estimar parámetros evolutivos y probar hipótesis evolutivas (Elena & Lenski, 2003; Buckling et al., 2009; Conrad et al. 2011; Kawecki et al., 2012; Barrick & Lenski, 2013). Los estudios de evolución experimental se han llevado a cabo en una amplia gama taxonómica de organismos enfocándose especialmente en microorganismos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Bennett & Hughes, 2009; Elena & Lenski, 2003). Altas tasas de crecimiento, tiempos de generación cortos, gran tamaño de la población, fácil control y manipulación, capacidad de almacenar los clones ancestrales, son virtudes ideales para que los microorganismos sean utilizados ampliamente en estudios de evolución experimental (Elena & Lenski, 2003; Bennett & Hughes, 2009;). Aunque el enfoque de la evolución experimental se ha dirigido principalmente a estudios biológicos, para obtener información sobre mecanismos básicos de evolución, también se ha convertido en una herramienta para satisfacer y mejorar necesidades biotecnológicas (LaCroix et al., 2017; Sandberg et al., 2019).

La evolución adaptativa en laboratorio (ALE por sus siglas en inglés) consiste en someter a una población de organismos a un entorno deseado (presión de selección) durante periodos de tiempo prolongados, y permitir que la selección natural aumente la aptitud general de la población a través de generaciones en condiciones de laboratorio (Conrad et al, 2011; Dragosits & Mattanovich, 2013; LaCroix et al., 2017). ALE como estrategia en la ingeniería de vías metabólicas ha permitido el desarrollo y mejoramiento de microorganismos con características o requerimientos deseados. Por ejemplo: activación de vías latentes, utilización o producción de sustratos no nativos, mejoramiento del consumo de sustratos, como fuentes de carbono, aumento de la tasa de crecimiento y títulos de producción, adaptación a diferentes condiciones ambientales y tolerancia al estrés que ocurre en algún proceso industrial (Portnoy et al, 2011).

De manera general los experimentos de ALE no se encuentran estandarizados, por lo que es importante considerar cuidadosamente una metodología de acuerdo con las necesidades requeridas, el tiempo a disponer y el microorganismo a someter a la dinámica de evolución (LaCroix et al., 2017). Una de las técnicas más empleadas es la adaptación en quimiostato (una variante de cultivo continuo) (**Figura 3a**), la cual consiste en un cultivo en donde las células inicialmente experimentan condiciones ricas en nutrientes, a medida que incrementa la población, los nutrientes disminuyen continuamente hasta que finalmente se agotan, lo que lleva al cultivo a un estado de crecimiento estable, con una velocidad específica constante, pudiéndose mantener en las mismas condiciones ambientales por largos periodos de tiempo, favoreciendo en tiempos cortos la aparición de mutaciones en la población. Otra técnica es la adaptación en cultivo por lotes con pases seriados (**Figura 3b**), en donde se propaga una alícuota del cultivo a otro de manera continua en intervalos regulares (generalmente diario) (Dragosits & Mattanovich, 2013; LaCroix et al., 2015).

En ambos escenarios se busca incrementar la aptitud física deseada. Sin embargo, el éxito de los experimentos dependerá de la ventaja que otorguen las mutaciones, las cuales estarán sujetas a la presión de selección impuestas (una condición ambiental o nutricional), por lo cual es importante determinar el tamaño de pase de cultivo, cantidad de células propagadas al siguiente cultivo, la fase de crecimiento durante la que se realizará la transferencia y factores que intervengan durante operación (Wiser & Lenski, 2015; LaCroix et al., 2017).

Durante los cultivos en modo quimiostato, la tasa de crecimiento se mantiene constante por la limitación de nutrientes y las células pueden mostrar compensaciones de crecimiento en condiciones no limitantes y viceversa (Conrad et al., 2011; Barrick & Lenski, 2013; Dragosits & Mattanovich, 2013; LaCroix et al., 2017). El cultivo discontinuo tiene ciertas deficiencias, como: densidad de población y tasa de crecimiento variables, suministro de nutrientes y condiciones ambientales fluctuantes, como el pH ambiental y el oxígeno disuelto, siendo inconvenientes para los costos de operación. En contraste, el cultivo por lotes seriales, el pasaje es estrictamente en la fase exponencial, donde la escala de tiempo se vuelve restrictiva y hay un pequeño lapso para dividir en alícuotas el cultivo y propagarlo antes de alcanzar la fase estacionaria. Por tales razones el tamaño del pase dependerá del tiempo del experimentador y la aptitud física será equivalente a la tasa de crecimiento. Así mismo, tiene la ventaja de ser fácil de configurar y utilizar, además de controlar diversos factores como la temperatura, homogeneidad del cultivo y relativamente bajos costos de operación, volviendo a la adaptación de cultivo por lotes la más empleada para necesidades biotecnológicas (Dragosits & Mattanovich, 2013; LaCroix et al., 2017; Sandberg et al., 2019).



**Figura 3.** Dos técnicas de ALE: **A)** Cultivo en quimiostato: los nutrientes son limitados y se alcanza una fase estable, la cual puede ser mantenida por largos periodos de tiempo. **B)** Cultivo serial en lotes: las transferencias se realizan en la fase exponencial en un rango de tiempo definido (Barrick et al., 2009; Sandberg et al., 2019).

Dada la velocidad con la que pueden surgir y repararse mutaciones beneficiosas, es seguro que se obtengan relativamente rápido microorganismos “evolucionados adaptativamente”, dependiendo del entorno al cual se somete a las células, y a la vez, asociar los cambios fenotípicos a dicho entorno (Palsson, 2015; Sandberg et al., 2019).

A pesar de la aparente simplicidad de la evolución de laboratorio, existen factores que afectan los resultados de los experimentos de evolución. Factores como el tamaño de la población, la tasa de mutación, presión y métodos de selección, y la frecuencia de mutaciones beneficiosas determinan la estructura de la población durante la evolución y pueden dar lugar a estructuras poblacionales complejas como resultado de la interferencia clonal, un fenómeno en el que los mutantes beneficiosos compiten dentro de una población. Por lo que es necesario que además de determinar la metodología que conduzca a la mejora de la aptitud física en el organismo, los experimentos de ALE se complementen con tecnologías como la secuenciación genómica para facilitar el proceso de encontrar y analizar las mutaciones ocurridas durante la dinámica. Además de comprender los cambios genéticos es importante la caracterización con otras herramientas moleculares (OMICAS) con el propósito de comprender la mecánica de las mutaciones durante ALE (Portnoy, Bezdán et al., 2011; Dragosits y Mattanovich, 2013; LaCroix et al., 2017).

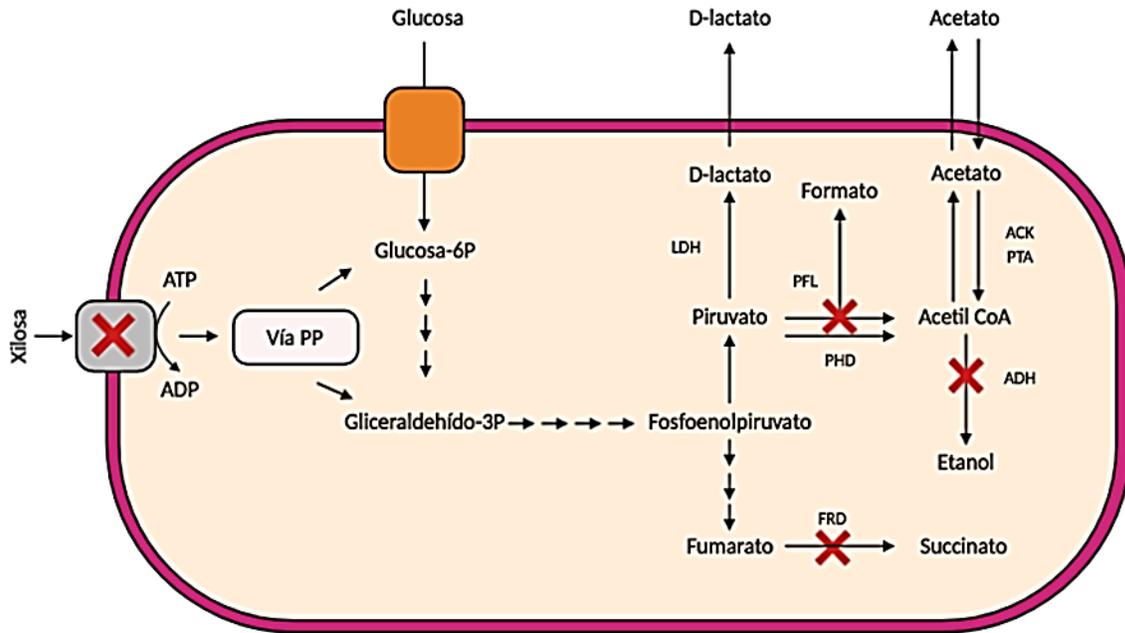
## IV. Antecedentes

### 4.1. *Escherichia coli* JU15\*

El laboratorio de ingeniería de vías metabólicas del Instituto de Biotecnología – UNAM se ha enfocado en la modificación de organismos a través de sus reacciones bioquímicas (metabolismo), con el propósito de mejorar sus propiedades celulares y frecuente dirigirlo a la producción de algún compuesto de interés industrial, como es el ácido láctico.

*E. coli* JU15\* es una cepa generada por el Dr. José Utrilla Carreri, con la finalidad de obtener una vía homofermentativa de ácido D-láctico. Se partió de una cepa silvestre MG1655, a la cual se inactivaron los genes: *pflB* que codifica para la enzima Pfl (piruvato formato liasa), *frdA* que codifica para Frd (fumarato reductasa) y *adhE* que codifica para Adh (alcohol deshidrogenasa). Posteriormente al saber que el consumo de xilosa implica un mayor gasto de energía, se eliminó el operón *xylFGH*, para después realizar un proceso de evolución adaptativa y lograr un consumo relativamente rápido de xilosa, que además implicara un menor gasto energético. Como resultado, se obtuvo la cepa lactogénica JU15 (**Figura 4**). Finalmente se realizó una secuenciación genómica comparativa con la cepa no evolucionada, donde se mostró que JU15 evolucionada habría perdido una región 27.4 kb y una mutación en el gen *gatC* que provoca el cambio de una serina por una leucina en el aminoácido 183 de la proteína GatC (constituida por 451 aminoácidos) (Utrilla, 2010). Por otro lado, la cepa JU15 ha sido empleada para la producción de ácido D – láctico a partir de residuos lignocelulósicos, con un máximo teórico cercano al 90% en condiciones de 37°C y a un pH de 7 (Utrilla et al. 2016). Dichas condiciones no coinciden con las condiciones requeridas para la SSF.

En 2019 el M. en C. Tlakaehl Ríos Hernández, eliminó el casete de resistencia a kanamicina que sustituía el operón *xylFGH* mediante transducción por fagos, por lo que se denominó a la cepa JU15\* (Ríos Hernández, 2019).



**Figura 4.** Metabolismo de *Escherichia coli* JU15 (Adaptado de Sierra, 2011).

#### 4.2. Efecto de la temperatura y termotolerancia en *Escherichia coli*

La temperatura es un factor abiótico importante para todos los organismos, ya que han evolucionado para crecer en un rango de temperatura dado. Un pequeño cambio puede afectar considerablemente su desarrollo, causando daños a la estructura celular y al metabolismo. Por ello, los organismos han desarrollado estrategias que ayudan a contender con los daños causados y así mismo adaptarse al ambiente al que se les ha sometido (Richter et al., 2010; Ezemaduka et al., 2014).

En *E. coli* el mecanismo más estudiado y que funciona como respuesta al calor inducido, es llamado respuesta al choque térmico (HSR por sus siglas en inglés) (Yura et al, 1993; Chung et al., 2006). En incrementos alrededor de 42°C la respuesta a choque térmico está regulada a nivel

transcripcional por el factor  $\sigma^{32}$ , codificado por el gen *rpoH*, representado por cinco regiones promotoras (P1, P2, P3, P4, P5), dependientes de los factores transcripcionales  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{24}$ ,  $\sigma^{38}$ ,  $\sigma^{54}$  y ocurre particularmente en el citoplasma (Arsène et al., 2000; Richter et al., 2010). El factor  $\sigma^{32}$  dirige la transcripción de la ARN polimerasa, que normalmente es inestable de los promotores de choque térmico y, por lo tanto, da resultado a la inducción de proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés). Estas incluyen proteínas chaperonas y proteasas en su mayoría dependientes de ATP, lo cual favorece la homeostasis proteica en dichas condiciones de estrés. Las HSP se comportan principalmente como chaperonas moleculares que se unen y estabilizan a polipéptidos exógenos, los cuales se generan en la síntesis de proteínas o por desnaturalización por calor de proteínas existentes, modulando su plegamiento y ensamblaje adecuado. Las chaperonas moleculares incluyen principalmente a los sistemas DnaK (Hsp70) (DnaK, DnaJ y GrpE) y GroE (Hsp60) (GroEL y GroES) (Arsène et al., 2000).

Por otra parte, también se encuentran proteasas, cuya función es importante en la digestión y eliminación de polipéptidos dañados por calor y que no fueron rescatados por la actividad de las chaperonas. A su vez, estas chaperonas contribuyen a llevar a cabo la síntesis de ácidos nucleicos, división celular y motilidad en condiciones normales y de estrés (Arsène et al., 2000; Chung et al., 2006). Además de la actividad mediada por  $\sigma^{32}$ , el regulón  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ ) también es importante para la protección de la célula contra el daño por calor severo e induce a otras HSP esenciales para el crecimiento a mayores temperaturas y están involucrados en diversos procesos celulares, tales como la síntesis de la pared celular, la división celular, crecimiento celular y la replicación de ADN plasmídico (Chung et al., 2006; Roncarati y Scarlato, 2017).

Aunque las respuestas de *E.coli* a temperaturas elevadas se han investigado en gran medida, los estudios se han centrado principalmente a la HSR que sucede alrededor de 42 °C durante un choque

térmico. No obstante, en los últimos años se han investigado los mecanismos involucrados en la termotolerancia. La termotolerancia se describe como la capacidad de contener el estrés térmico y mantener la autopropagación a temperaturas superiores a la óptima (Guyot et al., 2010). Al comprender el mecanismo que desarrolla *E. coli* en respuesta al estrés térmico se ha podido explorar su naturaleza, demostrando que la tolerancia está relacionada con algunas proteínas que se expresan durante las etapas de choque térmico (VanBogelen et al., 1987).

A temperaturas mayores de 42°C, por ejemplo, a 43°C se ha demostrado que 384 genes están regulados durante la exposición al choque térmico (Gunasekera et al., 2008). Por otro lado Mordukhova y Pan (2014) demostraron que el crecimiento de *E. coli* a 44 °C se ve comprometido, ya que es la temperatura máxima para el plegamiento de la proteína de choque térmico *MetA* (homoserina- o-succiniltransferasa), mientras que sugiere que con la suplementación de metionina al medio, *E. coli* podría crecer hasta 45 °C. Van Derlinden y colaboradores (2007) determinaron que la temperatura máxima para el crecimiento de *E. coli* es 46 °C debido a la desestabilización de las proteínas, y el cual se podría mejorar con la implementación de un medio de cultivo apropiado, sugiriendo la utilización de un medio rico.

Murata y colaboradores (2011) investigaron el mecanismo molecular durante una temperatura alta crítica (CHT por sus siglas en inglés), que consistió en la exposición a 47°C y en donde se identificaron 71 genes denominados “genes termotolerantes”, los cuales tenían la función de regulación, homeostasis proteica, metabolismo de lípidos y transcripción. Más adelante Murata y colaboradores (2018) realizaron la actualización del estudio previo, donde incluyeron a 21 genes termotolerantes más, obteniendo un total de 72 genes, los cuales fueron clasificados en 8 grupos. La tabla de esta clasificación está incluida en la sección de anexos (**Apéndice 1**).

Si bien, el límite térmico superior de supervivencia de una bacteria (o límite superior del nicho térmico), se define como la temperatura máxima a la que las células sobrevivieron, pero no crecieron, mientras que el límite térmico superior del crecimiento celular se define como la temperatura máxima a la que las células aumentaron en número con el tiempo. Por lo tanto, estos parámetros dependerán del número de generaciones (Guyot et al., 2014). Se han realizados investigaciones donde se establece que el límite superior de supervivencia de *E. coli* es 45.6 °C, y la temperatura optima 37 °C (Mettler, 2005). Sin embargo, Rudolph y colaboradores (2010) obtuvieron una cepa capaz de crecer a 48.6°C después de la propagación y 600 generaciones donde se informó la sobreexpresión de la chaperona citoplasmática GroEL/GroES. Por otro lado, Ezemaduka y colaboradores (2014), expresaron heterológicamente una proteína del nematodo *Caenorhabditis elegans*, obteniendo una cepa de *Escherichia coli* capaz de crecer a 50 °C, siendo la temperatura máxima reportada a la fecha para el crecimiento de esta bacteria.

Sin embargo, en los estudios descritos en el párrafo anterior, excepto el de Rudolph y colaboradores (2010) y Ezemaduka y colaboradores (2014), no permitieron que las células sobrevivieran permanentemente a las temperaturas que se sometieron, sino que el enfoque está en caracterizar la expresión durante la exposición al choque térmico al que se someten. Comprender el mecanismo que desarrolla *E. coli* en respuesta a al estrés temperaturas críticas permite explorar la naturaleza de la relación del fenotipo termotolerante respecto al genotipo, estos estudios pueden ser complementados con los principios de evolución adaptativa en laboratorio y al mismo tiempo implementar su aplicación biotecnológica (Rodrigues y Rodrigues, 2018).

### **4.3. Evolución adaptativa en laboratorio térmica: termotolerancia**

Tanto en ambientes naturales, como en procesos biotecnológicos los microorganismos se enfrentan a cambios en las condiciones ambientales uno de ellos, la temperatura. Aunque sigue siendo un enigma como es que llevan a cabo los mecanismos para adquirir la termotolerancia, *E. coli* ha sido usado como modelo biológico para evaluar las respuestas evolutivas al estrés térmico (Riehle et al, 2001). Como se mencionó anteriormente, los experimentos de evolución adaptativa en laboratorio permiten obtener microorganismos con fenotipos deseados y a su vez, comprender a nivel biológico que llevó a esas nuevas características. ALE con enfoques de choques térmicos se ha enfocado particularmente al cambio transitorio o a temperaturas prolongadas, en vez de aumentar y mantener de forma constante la temperatura (Bennett y Lenski, 2007; Lenski, et al, 1991; Travisano & Lenski, 1996).

En estudios previos, se ha demostrado que durante la aclimatación de *E. coli* a temperaturas superiores a su límite térmico, se induce una disminución de crecimiento. Sin embargo, la exposición a cambios ambientales a corto plazo, los organismos pueden aclimatarse, que, a diferencia de la adaptación, la aclimatación no implica ninguna respuesta genética o fenotípica, es decir, los cambios son reversibles. Se ha propuesto que para evitar este fenómeno es importante mantener el estrés hasta que el proceso de aclimatación logre convertirse en un proceso de adaptación y los cambios en el fenotipo logren persistir. Esto puede lograrse bajo el calentamiento progresivo, o sea incrementando la temperatura una vez que se haya recuperado la tasa de crecimiento.

## **V. Justificación**

Entre los materiales de mayor potencial para lograr desplazar a los polímeros sintéticos, se encuentra el PLA, el cual se produce a partir de D y L - ácido láctico ópticamente puros, que a su vez pueden ser sintetizados por *E. coli* de manera eficiente y económica. Sin embargo, la producción de ácido D-Láctico a escala industrial mediante el uso de este organismo, aún se ve limitada debido a los retos que existen en los procesos que se llevan a cabo para aprovechar los materiales lignocelulósicos, como lo es la sacarificación y fermentación simultánea (SSF). Puesto que este proceso aún no está totalmente acoplado entre las celulasas y los microorganismos lactogénicos, ya que la fase de hidrólisis enzimática se desarrolla a temperaturas entre 45 °C y 50 °C, mientras que *E. coli* presenta una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. Por lo que es deseable contar con cepas de esta bacteria que sean capaces de realizar el proceso de SSF a las temperaturas entre 45 °C y 50 °C manteniendo su capacidad de fermentar eficientemente glucosa en ácido láctico.

## **VI. Hipótesis**

Mediante evolución adaptativa en laboratorio se obtendrán variantes de la cepa *E. coli* JU15\* capaces de crecer a temperaturas mayores de 43 °C, así como de metabolizar glucosa con altos rendimientos de conversión en D-lactato en medio mineral, pH controlado y condiciones sin aireación.

## **VII. Objetivos**

### **7.1. Objetivo general**

Obtener y caracterizar variantes de la cepa D-lactogénica de *Escherichia coli* JU15\*, con capacidad de crecer y producir D-lactato eficientemente a temperaturas mayores a 43 °C.

### **7.2. Objetivos específicos**

- Generar variantes de la cepa JU15\*, mediante el proceso de evolución adaptativa, capaces de crecer en temperaturas de 45 °C en medio mineral mínimo - glucosa, pH controlado y sin aireación.
- Seleccionar y evaluar el desempeño de las variantes obtenidas a temperatura elevada: crecimiento celular, velocidad de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido láctico, a temperatura de referencia (37 °C) y 45 °C. Comparar los resultados con la cepa progenitora JU15\*.
- Realizar una segunda etapa de evolución adaptativa a partir de la variante seleccionada a 45 °C, buscando obtener mutantes crezcan a temperaturas mayores a 45 °C, y de preferencia a 50 °C.
- Seleccionar y evaluar la segunda variante obtenida a temperatura elevada (> 45 °C): crecimiento celular, velocidad de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido láctico, a temperatura de referencia (37 °C) y 45 °C. Comparar los resultados con la cepa progenitora JU15\* y la primera variante seleccionada.

## VIII. Materiales y métodos

### 8.1. Microorganismos

**Tabla 2.** Microorganismos utilizados en este proyecto.

Cepa	Genotipo	Referencia
<b>JU15</b>	MG1655: $\Delta pflB$ , $\Delta frdA$ $\Delta adhA$ $\Delta xylFGH$ , $km^R$ $\Delta reg$ 27.3kpb $gatCS184L$	(Utrilla, 2010)
<b>JU15*</b>	JU15* km sensible	(Rios, 2019)
<b>ECL45</b>	JU15* evolucionada a diferentes temperaturas hasta 45 °C	Este trabajo
<b>ECL47</b>	ECL45 evolucionada hasta 47 °C	Este trabajo

En el presente trabajo se utilizó de referencia la cepa lactogénica de *E. coli* JU15\*, la cual fue modificada previamente por ingeniería de vías metabólicas, para una óptima producción de ácido D-Láctico. Esta cepa se ha descrito detalladamente en la sección de antecedentes.

### 8.2. Obtención de cepas termotolerantes mediante evolución adaptativa en laboratorio

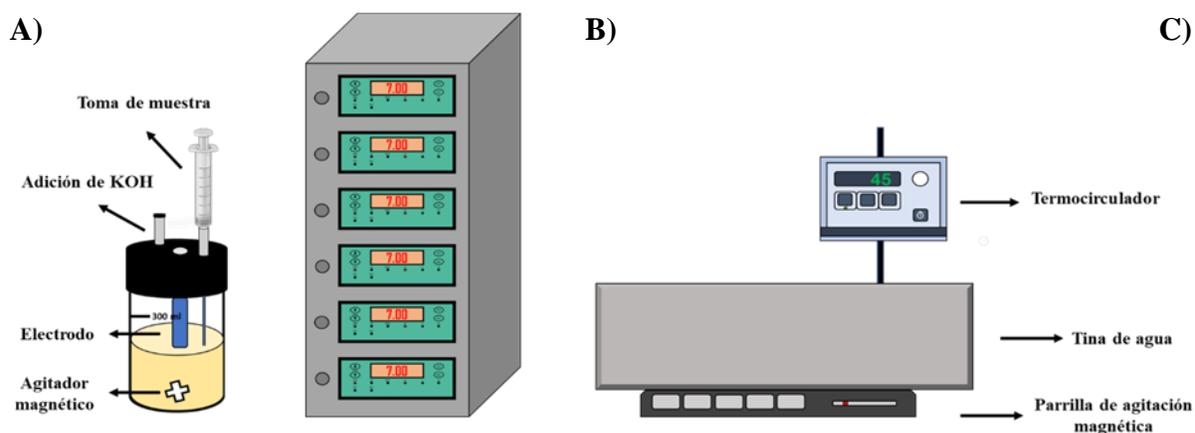
#### 8.2.1. Medio de cultivo y condiciones para la evolución adaptativa en laboratorio

##### 8.2.1.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue medio mineral AM1 (Martínez et al., 2007), compuesto por:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (2.63 g/L),  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (0.87 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.5 mM), solución de elementos traza (1.5 mL/L), KCl (2.0 mM) y betaína (1.0 mM).

### 8.2.1.2. Condiciones en minifermentadores

Los cultivos se realizaron en minifermentadores (fleaker) de 300 mL (**Figura 5A**), con un volumen de trabajo de 200 mL de medio mineral AM1, suplementado con glucosa (40 g/L) como única fuente de carbono, citrato de sodio (0.1 g/L) (y medio Luria-Bertani 1% a partir de de los experimentos de evolución por arriba de los 43°C). Las condiciones fueron: 150 rpm de agitación, sin aireación, pH 7.0, controlado por la adición automática de una solución de KOH 2N a través de una torre de control (**Figura 5B**). La temperatura se incrementó gradualmente en 2 °, 1 °, y 0.5 °C mediante un termo circulador (**Figura 5C**).

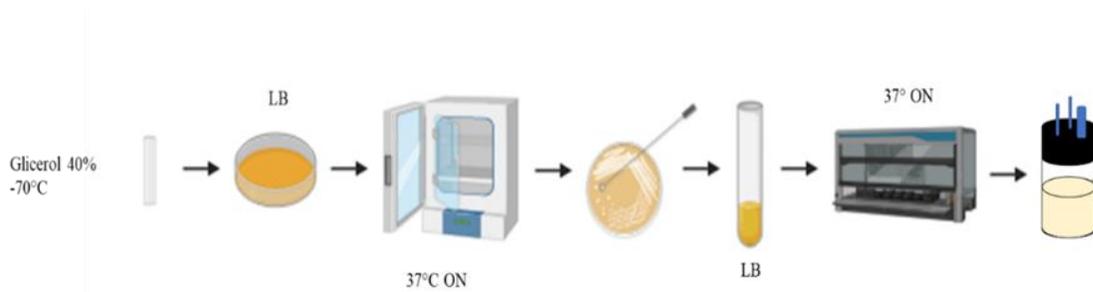


**Figura 5.** Equipo empleado durante ALE: **A)** Minifermentador de 300 mL adaptado para la adición de base, entrada de electrodo y toma de muestra; **B)** Torre de control de pH y **C)** Tina de agua y termocirculador para el control de temperatura (Sierra, 2011).

### 8.3. Recuperación de la cepa JU15\* e inicio de la evolución adaptativa

A partir de un vial de células congeladas en glicerol al 40% de la cepa JU15\* (Ríos Hernández 2019), se tomó una fracción y se sembró por cuadrantes en cajas Petri conteniendo medio Luria-

Bertani – agar, posteriormente fueron incubadas durante una noche a 37°C. Al mostrar crecimiento se tomó una colonia del cultivo y fue inoculada en 5 mL de LB contenido en un tubo de ensayo de 16x150. Una vez que el medio presentó turbidez, se inoculó en un minifermentador con medio mineral AM1 suplementado con glucosa (40g/L) y citrato de sodio (0.1 g/L) a de 37°C (**Figura 6**), dando inicio a la evolución adaptativa en laboratorio.

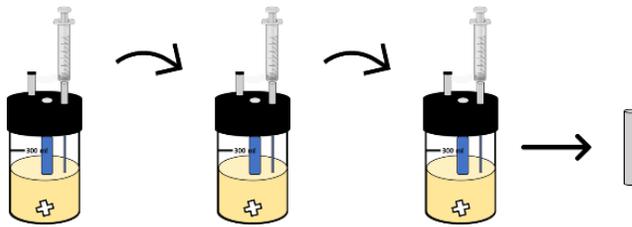


**Figura 6.** Tren de pasos para la recuperación de la cepa JU15\*

#### **8.4. Pases durante la evolución adaptativa en laboratorio y preparación**

Durante la evolución adaptativa en laboratorio los pases se realizaron cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial, se tomó una alícuota del medio actual, se centrifugó a 6000 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular a un fleaker con medio fresco AM1 (0.05 a 0.1 D. O.<sub>600nm</sub> ).

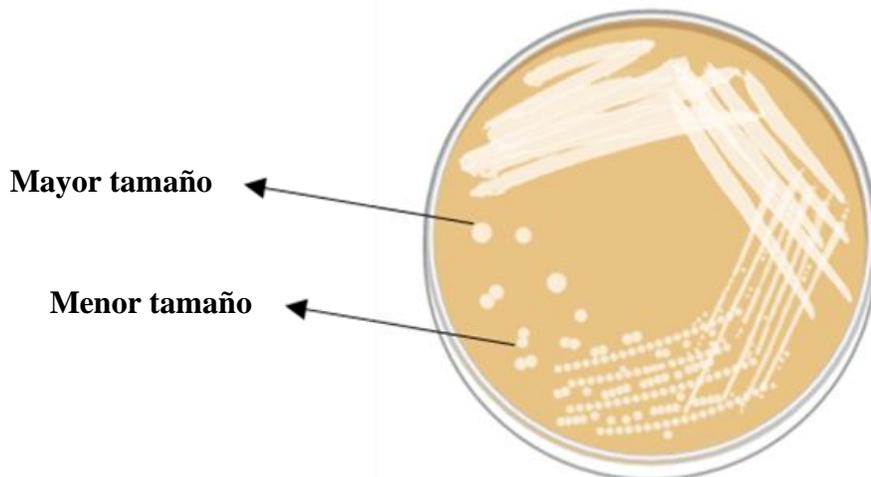
La temperatura se incrementó una vez que el cultivo alcanzara una velocidad de crecimiento fuera cercana a la de la cepa de partida (JU15\*). En cada incremento de temperatura se realizó el mismo procedimiento que en el pasaje, solo que, en este procedimiento se tomaron 0.8 mL de la muestra y se mezcló en crioviales (mediante agitación con vortex) con 0.8 mL de glicerol al 80% (**Figura 7**). Los crioviales fueron resguardados a -70°C para la selección y evaluación.



**Figura 7.** Tren de pasos para llevar a cabo las transferencias durante ALE y preparación de crioviales.

### 8.5. Selección y evaluación de las variantes termotolerantes

A partir del último glicerol de la temperatura a evaluar (37°C, 45°C), se tomó una fracción congelada y se estrió en cajas Petri con medio AM1 suplementado con de glucosa (2 g/L), citrato de sodio (0.06 g/L) y 0.06% de medio LB. La incubación fue de 24 y 48 horas, a una temperatura 37 °C en la evaluación a la misma temperatura, mientras que a 45 °C fue inferior a 2°C. Una vez que crecieron, se seleccionaron las colonias que presentarían una morfología de mayor tamaño en menor tiempo (**Figura 8**).



**Figura 8.** Determinación morfológica de las colonias a seleccionar.

#### 8.5.1. Preparación de cultivo para el preinóculo

Para la elaboración del preinóculo se inocularon las colonias seleccionadas en 5 mL de medio LB suplementado con glucosa (2 g/L) en tubos de ensayo de 16x150. La temperatura de incubación

37 °C para la evaluación a 37 °C y de 44 °C para la evaluación de 45 °C y a 300 rpm hasta mostrar saturación celular.

### **8.5.2. Preparación de cultivo para inóculo**

A partir del preinóculo que mostró mayor crecimiento en menor tiempo, se hizo la transferencia a un fleaker con 200 mL de medio mineral AM1 suplementado con glucosa (40 g/L), citrato de sodio (0.1 g/L) y medio LB (1%) a la temperatura a evaluar y con agitación a 150 rpm. El inóculo permaneció en incubación hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente, se centrifugó una fracción del volumen del inóculo a 6000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue desechado y el botón de células resuspendido en medio mineral AM1 fresco en el cual se llevaría a cabo el cultivo para la fermentación.

### **8.5.3. Preparación de cultivo para la fermentación**

Los cultivos para la producción de ácido D-láctico se iniciaron a una concentración celular cercana a 0.037 g/L (0.1 D. O.<sub>600nm</sub>) en medio mineral AM1 suplementado con glucosa (40 g/L), citrato de sodio (0.1 g/L) y medio LB (1%). El tiempo de las fermentaciones fueron de 24 a 30 h, bajo las condiciones antes utilizadas durante la evolución adaptativa en laboratorio, la única variante fue la temperatura de evaluación (37 °C y 45 °C). Se tomaron muestras cada 2 h las primeras 14 h y posteriormente a las 24 y 30 h. Al mismo tiempo que se tomó la muestra, se midió la D.O. y se tomó 1.5 mL del cultivo, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante de la muestra centrifugada fue congelado a -20 °C para su análisis.

## 8.6. Métodos analíticos

### 8.6.1. Cuantificación de la biomasa

La concentración celular de los cultivos se cuantificó como densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm usando un espectrofotómetro de marca Thermo Scientific (modelo Genesys 10S UV-VIS). Se realizó una conversión a peso seco, donde  $1 \text{ D. O.}_{600 \text{ nm}}$  fue equivalente a 0.37g DCW/L.

### 8.6.2. Cuantificación de la glucosa y ácido láctico

La cuantificación glucosa y ácido láctico, fue por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución y usando la columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad). Las condiciones de corrida fueron de 60 °C de temperatura y un flujo de 0.5 mL/min con fase móvil 5 mM de ácido sulfúrico. La detección de los compuestos fue de manera simultánea con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). La determinación se realizó mediante la comparación de las áreas bajo la curva de los analitos y los estándares, éstos últimos a diferentes concentraciones. Para el análisis y procesamiento de los cromatogramas se utilizó el software Empower 2. Los sobrenadantes, antes de ser analizados, fueron diluidos (1:5) en fase móvil y filtrados en membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### 8.6.3. Medición de los parámetros cinéticos y estequiométricos

- **Factor de dilución (Fd)**

Los valores obtenidos de biomasa, glucosa y ácido láctico se corrigieron por el volumen agregado de KOH para neutralizar el pH del medio ( $V_B$ ) y el volumen inicial de trabajo ( $V_i$ ) al tiempo ( $t_i$ ) en el que se tomó la muestra.

$$Fd_{ti} = \frac{v_i + v_b}{v_i}$$

Con el valor de Fd se corregir los datos de cada muestra:

Concentración de biomasa = Biomasa (g/L<sup>-1</sup>)<sub>ti</sub> \* Fd<sub>ti</sub>

Concentración de azúcar = Glucosa (g/L<sup>-1</sup>)<sub>ti</sub> \* Fd<sub>ti</sub>

Concentración de producto = Ácido láctico (g/L<sup>-1</sup>)<sub>ti</sub> \* Fd<sub>ti</sub>

- **Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**

Con base al crecimiento exponencial de la bacteria, se graficó el logaritmo natural de los datos de crecimiento contra el tiempo, se realizó una regresión lineal con los datos correspondientes a la fase exponencial (generalmente de las 0 a 14 h del cultivo), la pendiente de esta regresión corresponde a la velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = \frac{\text{Ln} \left( \frac{x_f}{x_i} \right)}{t - t_0}$$

- **Rendimientos**

Los rendimientos fueron calculados para el periodo correspondiente a la fase exponencial (generalmente de 0 a 14 h), y a nivel global a las 24 h para todo el proceso, de la siguiente manera:

$M_{MAX}$  = Biomasa máxima producida a las 24 h

$$Y_{p/s} = \frac{\text{g de ácido láctico generado}}{\text{g de glucosa consumida}}$$

$$Y_{x/s} = \frac{\text{g de biomasa producida}}{\text{g de glucosa consumida}}$$

$$Y_{p/x} = \frac{\text{g de ácido láctico generado}}{\text{g de biomasa máxima producida}}$$

- **Velocidades específicas**

Las velocidades específicas de consumo de sustrato y producción de ácido D-láctico fueron calculadas para el periodo exponencial de la siguiente manera:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_s^x}$$

$$q_p = Y_{X/P}^* \mu$$

- **Productividad volumétrica de lactato ( $Q_p$ )**

La productividad volumétrica de lactato fue calculada como el lactato neto producido en la fermentación, dividido por el tiempo total de la fermentación.

$$Q_p = \frac{\text{g/L de ácido láctico obtenido}}{t(h) \text{ total del cultivo}}$$

### **Cálculo del número de generaciones durante la evolución adaptativa**

En cada pase se determinó el número de generaciones ( $n$ ). Tomando en cuenta la densidad óptica final ( $N$ ) y la densidad con la que se comenzó el cultivo ( $N_i$ ) se calcularon de la siguiente manera (Lee et al., 2011)

$$n = \frac{\log\left(\frac{N}{N_i}\right)}{\log(2)}$$

## **IX. Resultados y discusión**

### **9.1. Evolución adaptativa en laboratorio en la cepa JU15\***

Debido a que no se sabía con certeza la temperatura máxima de crecimiento de la cepa JU15\*, pero sí que su temperatura óptima de crecimiento (37 °C), se sometió a un proceso de evolución adaptativa en laboratorio con el fin de que creciera y desarrollara sus funciones por encima de la temperatura límite reportada para cepas derivadas de *E. coli* K12.

En primer lugar, fue importante determinar la metodología a emplear durante la evolución adaptativa en laboratorio. Al no haber una estandarización de los experimentos de ALE, pero sí sugerencias de técnicas que nos permitan llevar a cabo la obtención de cepas termotolerantes, se optó por la adaptación en cultivo en lote seriados, en donde la fase exponencial jugaría el papel principal, ya que de acuerdo con diferentes autores la alteración fenotípica como las altas temperaturas, está vinculada a la tasa de crecimiento, por ello, las transferencias únicamente se realizaron durante la fase exponencial (Blaby et al., 2012; Dragosits y Mattanovich, 2013). Por lo tanto, la dinámica de ALE se llevó a cabo en minifermentadores con medio mineral AM1 suplementado con 40 g/L de glucosa y 0.1 g/L de citrato de sodio. Es importante considerar que la aptitud física de las células bajo un estrés tiende a reducirse, como resultado de un desequilibrio de cofactores, equivalentes redox o ajustes en la regulación a nivel de genes o proteínas (Portnoy et al. 2008). Esto podría evitarse con la suplementación de nutrientes requeridos, como se mencionó con anterioridad, Van Derlinden y colaboradores (2007) sugieren que la limitación de crecimiento por temperatura podría mejorar con la ayuda de un medio de cultivo que aporte los requerimientos necesarios para que el organismo crezca. Sin embargo, es importante considerar que, en procesos biotecnológicos, es importante evitar los altos requerimientos nutricionales para

evitar altos costos tanto de medios de cultivo, como al momento de purificar el producto de interés, en este caso ácido láctico. Finalmente, el medio a partir de 45 °C fue suplementado con 1% de LB.

## 9.2. Obtención de cepas termotolerantes

El período de evolución adaptativa fue dividido en dos etapas. La primera consistió en obtener variantes de la cepa JU15\* que fueran capaces de crecer hasta 45 °C y fermentar glucosa a ácido D-láctico, en condiciones de sin aireación, pH neutro y medio mineral mínimo. Una vez que se obtuvieron las variantes, se seleccionó y evaluó a la que se consideró mejor adaptada para continuar con la segunda etapa. La cepa obtenida fue nombrada ECL45. Durante la segunda fase la temperatura elevada comprometió el crecimiento celular, por lo que la temperatura máxima a la que creció fue 47 °C. De la misma manera fue seleccionada y evaluada la variante mejor adaptada, denominándola ECL47. Durante los pases se consideró: crecimiento celular, número de generaciones y estimación de la tasa de mutación que podría presentarse durante la evolución.

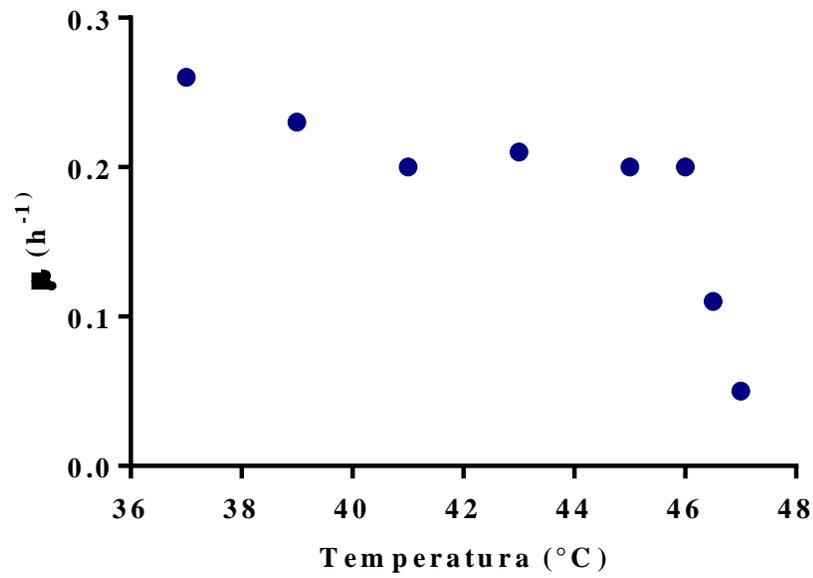
Como se mencionó anteriormente, la temperatura de inicio y de referencia fue 37 °C y la velocidad de crecimiento ( $\mu^{-1}$ ) de 0.26 h<sup>-1</sup>. A partir del primer pase, se incrementaron 2 °C, al crecer en 39 °C no parecía haber cambio en la velocidad de crecimiento, por lo tanto, en el pase siguiente se volvió a incrementar 2 °C. Al llegar a 41 °C seguía sin disminuir su desempeño, incrementando nuevamente 2 °C. En 43 °C la velocidad de crecimiento disminuyó a 0.11 h<sup>-1</sup>, después de 11 transferencias, la velocidad de crecimiento incrementó aproximadamente al doble (0.20 h<sup>-1</sup>) No obstante, al realizar el pase a 45 °C el cultivo no presentó crecimiento. Mordukhova & Pan (2014) reportaron que a 44 °C es la temperatura máxima para el plegamiento de la proteína de choque térmico *MetA* (homoserina- o-succiniltransferasa), la cual es primordial puesto que es la primer enzima de la biosíntesis de metionina, aminoácido primordial para dar inicio de la traducción (Ferla et al., 2014). Por otro Salgado (2018) durante sus tesis de maestría y por medio de un análisis

de microarreglos, analizó que hay genes que se ven sobre expresados y reprimidos a 43 °C y que son importantes para la biosíntesis de cofactores y aminoácidos. Con estos antecedentes y la recomendación de adición de suplementos al medio durante la evolución adaptativa; se suplementó el medio con metionina y casa aminoácidos (fuente nitrogenada con todos los aminoácidos excepto metionina y triptófano), ambos por separado. Se llevó a cabo una cinética de crecimiento con la intención de optar por el mejor suplemento al medio. Así mismo, el cultivo que presentó mejor crecimiento fue al que se adicionó casa aminoácidos, sugiriendo que no solo el empleo de metionina es esencial para el crecimiento en temperaturas mayores a 43 °C. La cinética de crecimiento se incluyó en la sección de anexos (**Apéndice 2**). Al presentar el crecimiento esperado, se continuó con la evolución adaptativa, para evitar la aclimatación (plasticidad fenotípica) y el rasgo fenotípico que esperábamos seleccionar. Los pases persistieron hasta considerar que la cepa estaba adaptada al nuevo ambiente. Los pases en 45 °C fueron 17 y la velocidad de crecimiento se mantenía en 0.2. Finalmente se resguardó en glicerol a -70 °C para ser realizar la selección.

La segunda etapa de evolución experimental continuó a partir de la cepa seleccionada a 45 °C (ECL45). A este punto se tenía determinado el suplemento adecuado para seguir con la evolución adaptativa y evitar limitaciones generadas por la temperatura. Por otra parte, las transferencias durante esta etapa fueron inicialmente de 1 °C. Al someter a ECL45 a 46 °C, tardó en crecer 48 h y la velocidad de crecimiento disminuyó 55%. Para recuperar la velocidad de crecimiento de 0.20 h<sup>-1</sup>, se realizaron 16 transferencias. Más adelante se realizó una transferencia a 47 °C, pero el cultivo no mostró crecimiento, por lo que se optó realizar el pase con un incremento de tan solo 0.5 °C. Aun mostrando crecimiento a 46.5 °C, la velocidad de crecimiento fue de 0.11 h<sup>-1</sup> después de 21 transferencias, al no haber cambio en la velocidad de crecimiento, se realizó un pase a 47 °C, no obstante, no se presentó crecimiento. Para evitar suplementar una vez más el medio y

basándonos en un reporte de Guyot y colaboradores (2014), donde sugieren que la aclimatación puede incrementar la termotolerancia, se propuso la estrategia de incrementar la temperatura de 46.5 °C a 47 °C durante unas horas y regresar de nuevo a 46.5°C. Al obtener las cepas que crecían a 47°C y mejorar su aptitud, obteniendo cepas que crecían a 47°C. Esto podría deberse a que, a diferencia a los demás países, la adaptación al nuevo entorno era de mayor reto, y por lo tanto de manera más lenta, lo que podría permitir un tiempo adicional para adquirir mutaciones beneficiosas. Después de 22 transferencias, se obtuvo la cepa ECL47 capaz de crecer a 47 °C con una velocidad de 0.5 h<sup>-1</sup>, lo cual indica que la aclimatación pudo superarse después de la propagación. La obtención de cepas termotolerantes a 47 °C se logró después de un total de 90 transferencias y 314 generaciones (**Tabla 3**), Se debe resaltar que en comparación a otros estudios reportados para temperaturas altas (Rudolph et al., 2010; Blaby et al., 2012), el medio utilizado durante este trabajo, fue un medio mínimo, además las condiciones fueron anaerobias, teniendo en cuenta un estrés extra que era la producción de ácido láctico por la cepa modificada genéticamente. Por ello, este proyecto podría reportarse con la cepa homoláctica de *Escherichia coli* con la temperatura más alta (47 °C).

Durante la evolución, es importante determinar los cambios en la aptitud física, la cual, se asocia principalmente a la tasa de crecimiento. No obstante, en términos biotecnológicos, existen otros parámetros que deben considerarse, como los rendimientos en la producción de algún metabolito (en este caso ácido láctico) o la supervivencia a ciertos factores (temperatura), los cuales podrían verse compensados por un cambio en la velocidad de crecimiento. Como podemos observar en la gráfica (**Figura 9**), a medida que la temperatura incremento la velocidad de crecimiento, fue disminuyendo.



**Figura 9.** Cambio en la velocidad de crecimiento durante la evolución adaptativa.

**Tabla 3.** Número de pases y generaciones de cada temperatura a evaluar a partir de la primera transferencia.

Temperatura (°C)	Número de pases	Número de generaciones
45	31	126
47	90	188
<b>Total</b>		<b>314</b>

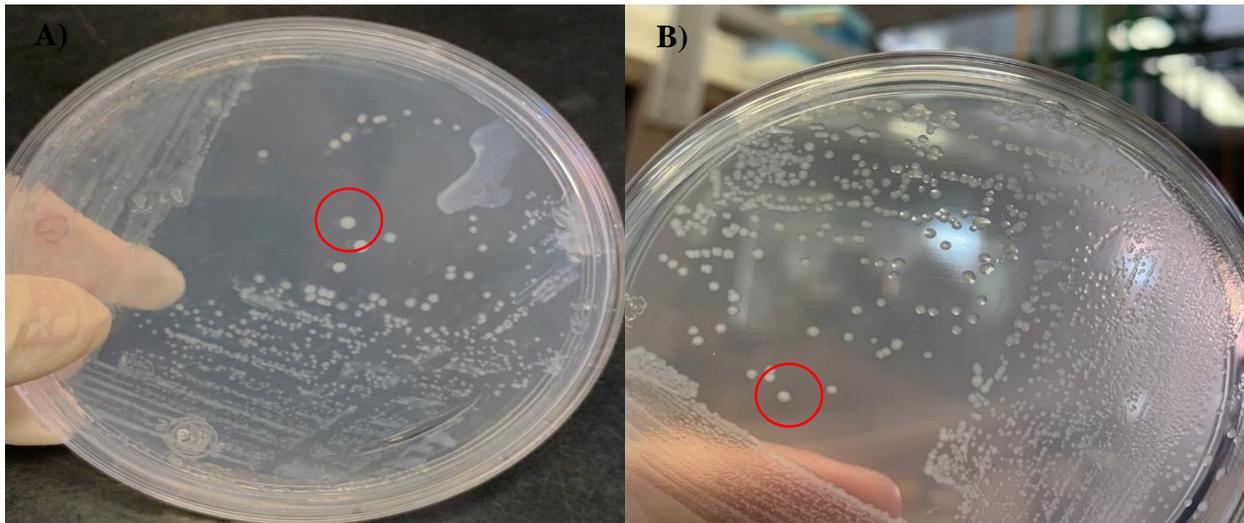
Como lo indica Barrick y Lenski (2013) el crecimiento por lotes generalmente conduce a una evolución adaptativa en donde se mantiene una alta diversidad genética a través de cada transferencia, ocasionando a menudo, un efecto de cuello de botella. Para disminuir la variación genética, y evitar las mutaciones acumuladas, se llevó a cabo una purga de variantes mediante el crecimiento de las células en placas de agar, para así conducir a mutaciones arbitrarias.

### **9.3. Selección de variantes termotolerantes**

El proceso de evolución de laboratorio presenta muchos factores que afectan los resultados de los experimentos de evolución. Factores como el tamaño de la población, la tasa de mutación y la frecuencia de mutaciones beneficiosas, determinan la estructura de la población durante la evolución, y pueden dar lugar a estructuras poblacionales complejas como resultado de la interferencia clonal, un fenómeno en el que los mutantes beneficiosos compiten dentro de una población (Winkler et al., 2013).

Una vez obtenidas las variantes se llevó a cabo una selección, permitiéndonos inferir en la variabilidad genética generada en poblaciones por ALE, ya que se ha demostrado que, aun viniendo del mismo antecesor, el estrés al que se ha sometido puede llevar a nuevos y diversos linajes. Esto se realizó mediante cultivo en placas, donde se prepararon 10 cajas por glicerol obtenido. El medio empleado fue AM1 suplementado con 2 g/L de glucosa, 0.015 g/L de citrato de sodio y 0.06% de LB. Las placas fueron incubadas por 48 h a 43 °C para crear una fase de adaptación. Anteriormente las cajas habían sido incubadas a 45 °C directamente, pero a esta temperatura no mostraron crecimiento. Al disminuir la temperatura de incubación a 43 °C los cultivos crecieron. Las bacterias al no tener las condiciones óptimas para su desarrollo es probable que entraran en una etapa de latencia y dejan de estarlo cuando encuentran condiciones menos estresantes para ellas, en este caso a 43 °C. Al presentar crecimiento a 43 °C, fueron seleccionadas

colonias que tuvieran mayor tamaño morfológico (**Figura 8**). Las seleccionadas fueron inoculadas en medio LB líquido en tubos de ensayo 16x150 suplementado con 2 g/L de glucosa a 44 °C durante un día. Los tubos que presentaron saturación celular fueron transferidos a minifermentadores en donde se realizó el último proceso de selección, llevando a evaluar al cultivo con mejor desempeño. A las variantes obtenidas a 47 °C se les realizó el mismo procedimiento de selección, solo que, en vez de crecerlas a 43 °C, se incubaron a 45 °C durante 48 h. Para finalizar el proceso de selección fueron llevados a dos minifermentadores diferentes, a la temperatura a la que se evaluarían, escogiendo al que tuvo mejor desempeño de crecimiento.



**Figura 10.** Selección de variantes de acuerdo con su tamaño morfológico, seleccionando a las de mayor tamaño. A) ECL45 B) ECL47.

#### **9.4.Evaluación de las cepas termotolerantes**

Las condiciones que se consideraron para la evaluación de las cepas fueron las mismas que se utilizaron durante la evolución adaptativa en laboratorio. Lo único que difirió fue la temperatura de evaluación (37°C y 45°C).

### 9.4.1. Evaluación de JU15\*, ECL45 y ECL47 a 37 °C

Tabla 4. Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15\*, ECL45 y ECL47.

Parámetro	Cepas		
	JU15*	ECL45	ECL47
Velocidad específica de crecimiento $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$0.23 \pm 0.01$	$0.22 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.01$
Biomasa máxima MAX ( $\text{g DCW L}^{-1}$ )	$0.82 \pm 0.05$	$0.87 \pm 0.02$	$0.86 \pm 0.05$
Rendimiento: $Y_{p/s}$ ( $\text{g glucosa /g D-láctico}$ )	$0.83 \pm 0.00$	$0.39 \pm 0.00$	$0.53 \pm 0.08$
Velocidad de consumo de glucosa $q_s$ ( $\text{g glucosa /g DCW} \cdot \text{h}$ )	$6.74 \pm 0.25$	$9.70 \pm 1.03$	$8.05 \pm 0.38$
Velocidad de formación de producto $q_p$ ( $\text{g D-láctico /g DCW} \cdot \text{h}$ )	$5.57 \pm 0.18$	$3.54 \pm 0.10$	$4.32 \pm 0.86$
Productividad volumétrica $Q_p$ ( $\text{g D-láctico /L} \cdot \text{h}$ ) 24h	$1.42 \pm 0.04$	$1.00 \pm 0.05$	$1.35 \pm 0.23$

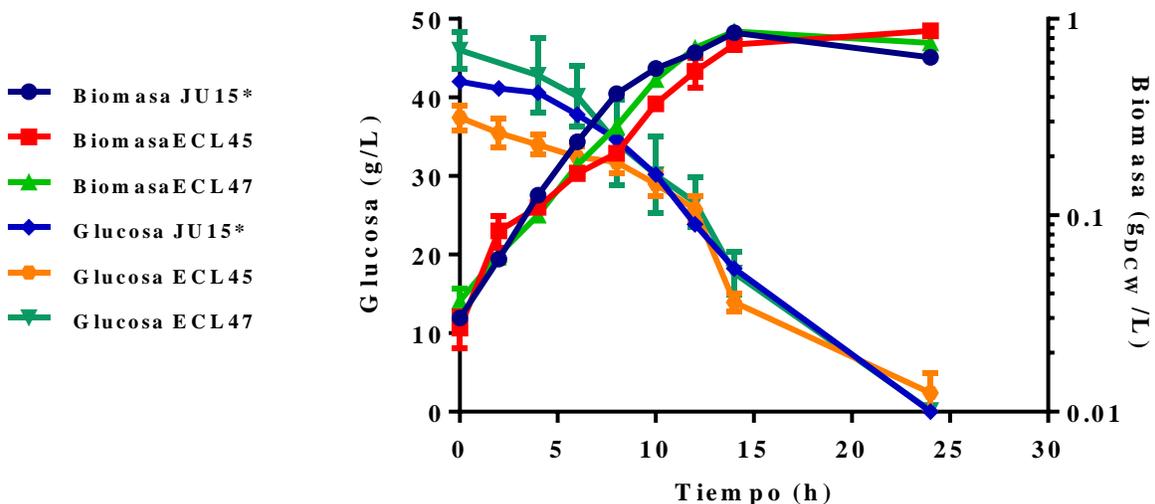
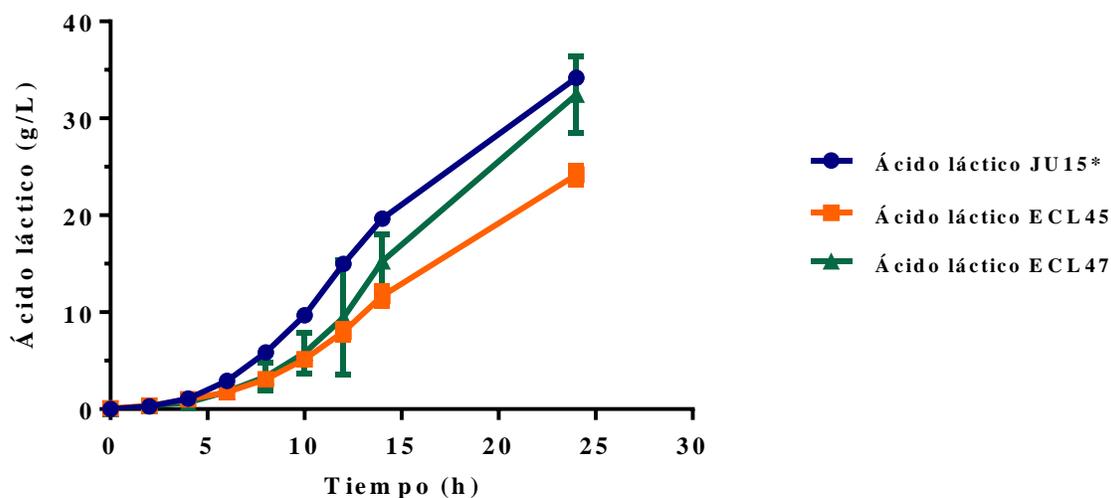
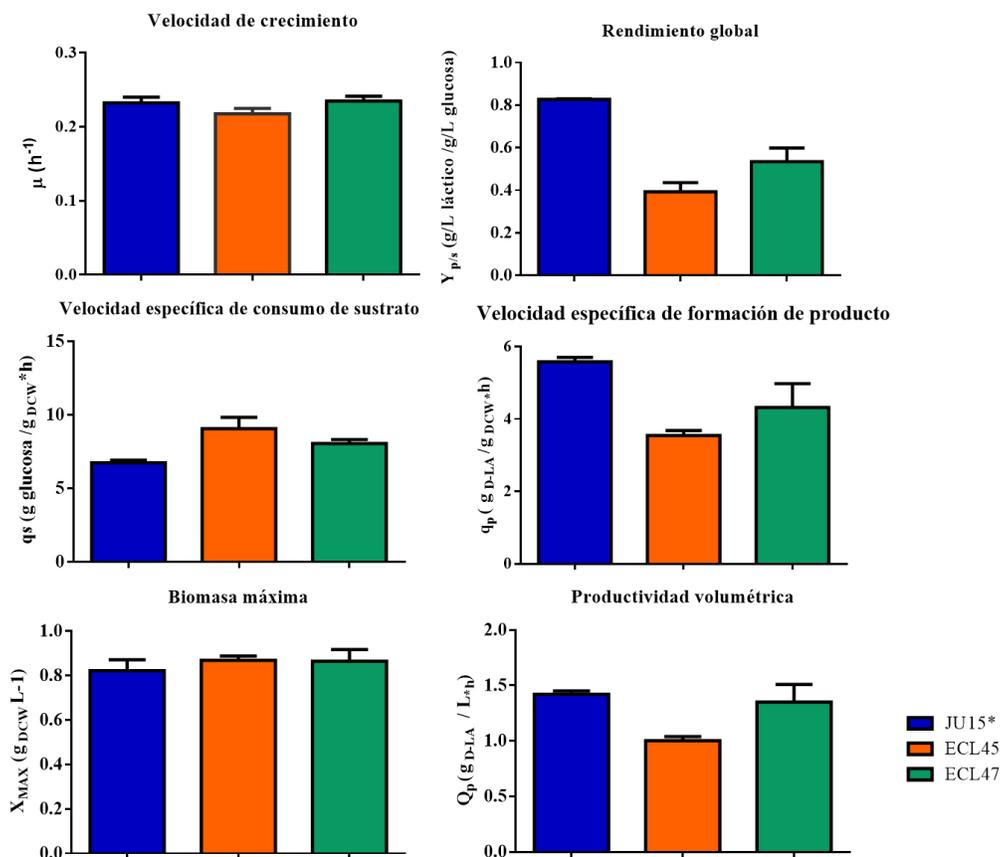


Figura 11. Cinética de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido D-láctico de las cepas JU15\*, ECL45 y ECL47 en medio mineral AM1 y 40 g/L de glucosa. Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.



**Figura 12.** Producción de ácido D-láctico a 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.



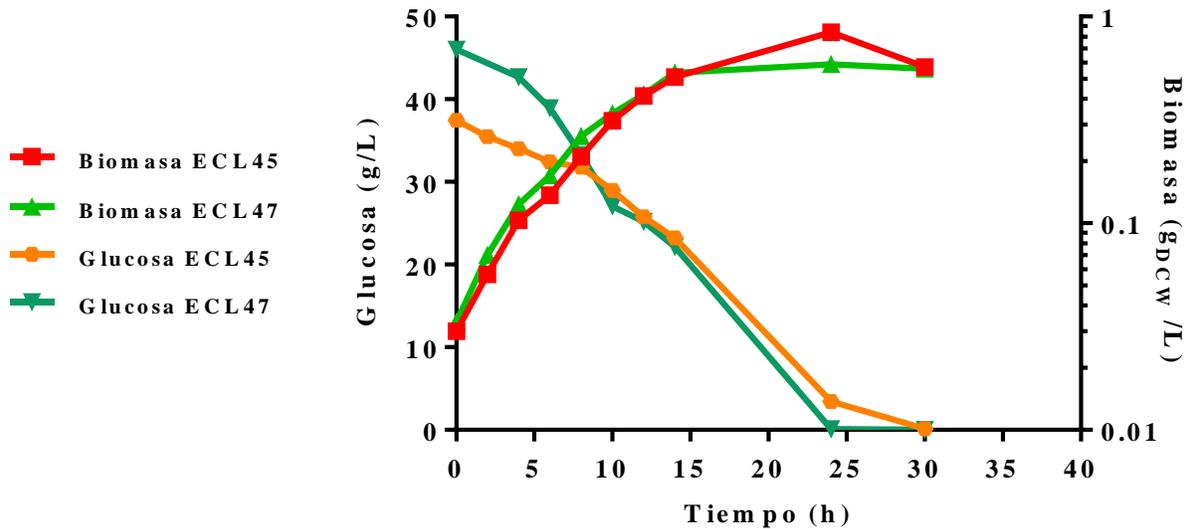
**Figura 13.** Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa JU15\*, ECL45 y ECL47 en medio AM1 con 40 g/L de glucosa.

Como resultado de la evolución adaptativa se obtuvieron las cepas ECL45 y ECL47, las cuales se evaluaron y compararon con la cepa progenitora a 37°C, considerada la temperatura óptima de crecimiento, para *E. coli*. Durante la primera etapa de evaluación, las variantes ECL45 y ECL47 mostraron una velocidad de crecimiento promedio de 0.22 h<sup>-1</sup> durante la fase exponencial, que, en comparación de la cepa progenitora JU15\*, tan solo disminuyó 0.5%. En cuanto al rendimiento, este tuvo un mayor cambio, ya que se redujo en ambas variantes, en la ECL45 66.2%, mientras que en la ECL47 41%. Así mismo, la velocidad de consumo de glucosa fue mayor en las cepas ECL45 y ECL47, por lo que hay un consumo constante de la fuente de carbono. Sin embargo, se puede observar que la velocidad de formación de ácido láctico sigue siendo menor. También se puede observar que los valores correspondientes a la biomasa máxima generada durante la fermentación, es similar en las dos variantes y la progenitora. Aun cuando los valores son fluctuantes en algunas horas, al final de la fermentación se logra una productividad volumétrica no tan variable. Esto podría atribuirse a que la temperatura óptima de crecimiento se haya desplazado a una mayor temperatura. Es probable que ambas cepas hayan disminuido o ampliado el rango de temperatura en el que crecen (nicho térmico) después de adaptarse a otro ambiente (Palsson & Palsson, 2015). Por lo tanto, su temperatura óptima podría oscilar en temperaturas mayores que 37°C.

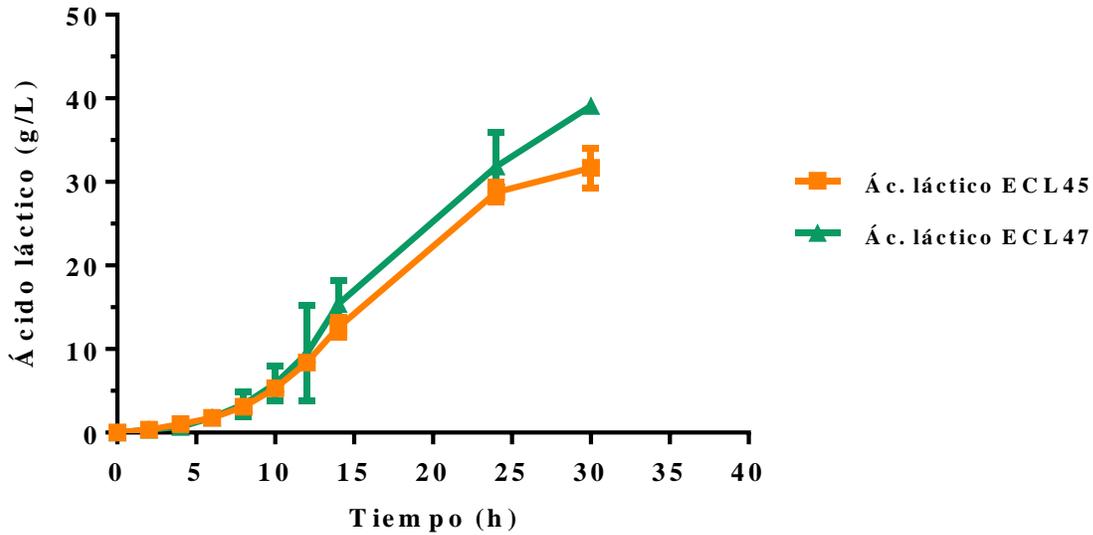
#### 9.4.2. Evaluación de JU15\*, ECL45 y ECL47 a 45 °C

**Tabla 5.** Resultados promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las cepas JU15\*, ECL45 y ECL47 a 45°C.

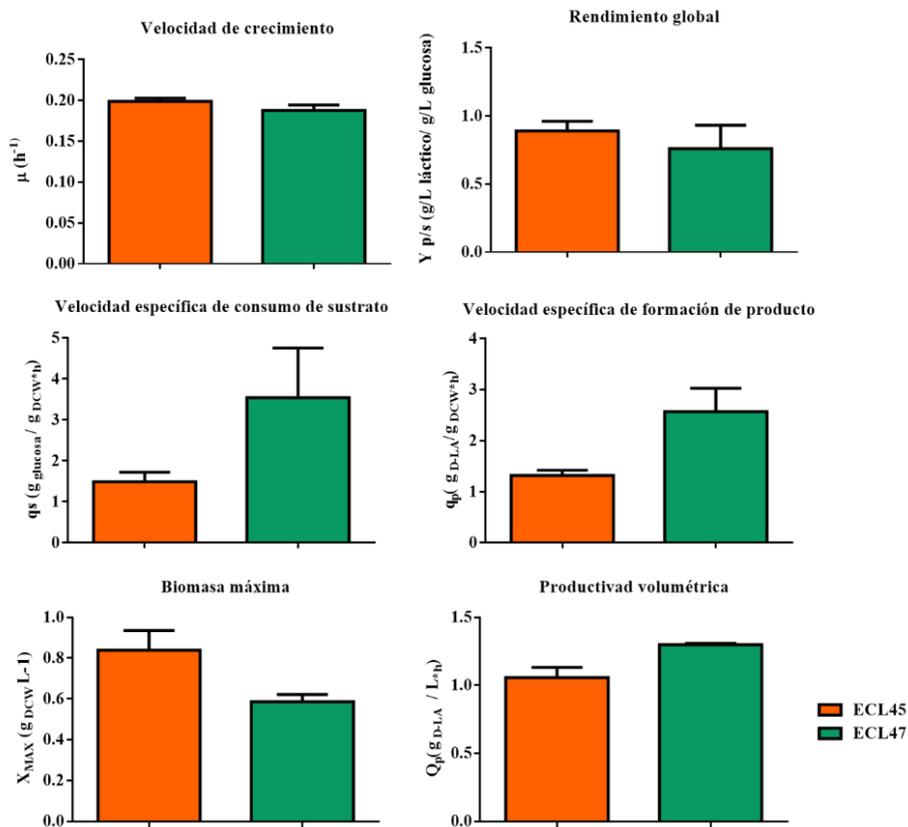
Parámetro	Cepas		
	JU15*	ECL45	ECL47
<b>Velocidad específica de crecimiento</b> $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	-	0.20 ± 0.00	0.19 ± 0.01
<b>Biomasa máxima</b> MAX (g DCW L <sup>-1</sup> )	-	0.84 ± 0.09	0.59 ± 0.03
<b>Rendimiento:</b> $Y_{p/s}$ (g glucosa /g D-láctico)	-	0.89 ± 0.07	0.76 ± 0.04
<b>Velocidad de consumo de glucosa</b> $q_s$ (g glucosa /g DCW*h)	-	1.49 ± 0.30	8.05 ± 0.38
<b>Velocidad de formación de producto</b> $q_p$ (g D-láctico /g DCW*h)	-	1.31 ± 0.14	2.57 ± 0.61
<b>Productividad volumétrica</b> $Q_p$ (g D-láctico /L*h) 24h	-	1.06 ± 0.01	1.30 ± 0.01



**Figura 14.** Producción de ácido D-láctico a 45 °C. Las barras de error representan la desviación estándar, resultado de 3 experimentos.



**Figura 15.** Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa JU15\*. ECL45 y ECL47 en medio AM1 con 40 g/L de glucosa.



**Figura 16.** Valores promedio de los parámetros cinéticos y estequiométricos de la cepa ECL45 y ECL47 en medio AM1 con 40 g/L de glucosa a 45 °C.

La evaluación a 45°C se realizó de la misma manera en las cepas ECL45 y ECL47, ya que al someter a la cepa JU15\* tan solo creció en el inoculo a 43°C, al pasar a minifermentador esta no presentó crecimiento. El cambio en comparación a la otra evaluación fue el tiempo en el que se llevó a cabo el experimento, ya que el tiempo fue de 30 h. Comparando el crecimiento de la cepa ECL45 y ECL47, podemos observar que la velocidad de crecimiento no difiere en gran cantidad, sino que la diferencia es mínima. Sin embargo, en cuestión de rendimiento podemos notar que la ECL47 tiene un mejor desempeño. Y que de igual manera tiene una mejor productividad. Ya que el consumo de glucosa lo lleva de manera más rápida la cepa ECL47 al igual que la producción de ácido láctico. Cabe resaltar que la cepa ECL47 lleva a cabo la conversión total de glucosa a ácido láctico. El mejor desempeño a 45°C fue con la cepa ECL47. En comparación con la temperatura ancestral (37 °C) y la nueva temperatura máxima de crecimiento, la velocidad de crecimiento tan solo disminuyó el 14%. Inicialmente, antes de que realizar el filtro de selección, se creía que era del 35%. Por lo tanto, la selección logró disminuir a la población menos apta para esta temperatura. Es importante resaltar que a pesar de la disminución de los parámetros cinéticos ya reportados para la cepa JU15, las cepas ECL45 y ECL47 aun teniendo el estrés por temperatura, tienen rendimientos mayores al 50% a 45°C.

## X. Conclusiones

- El empleo de la evolución adaptiva en laboratorio como estrategia complementaria de la ingeniería de vías metabólicas, permitió obtener variantes de la cepa *E. coli* JU15\* capaces de crecer a temperaturas mayores a 43 °C y con altos rendimientos de conversión de glucosa a D-lactato en medio mineral mínimo, pH controlado y sin aireación.
- Es importante considerar los requerimientos que surgen bajo la presión de selección a la que se ha sometido a los microorganismos, por lo que la suplementación de nutrientes (0.05 g/L de extracto de levadura y 0.1 g/L de tripona) al medio de cultivo permitió un mejor desempeño, medido como crecimiento celular y producción de ácido láctico.
- En la implementación del medio de cultivo se observó que no solo es necesaria la adición de metionina a temperaturas mayores a 43 °C, sino que existe la posible limitación de otros aminoácidos.
- Llevar a cabo filtros de selección en las variantes obtenidas permitió diferir en la posible variabilidad genética generada por la evolución adaptativa.
- La obtención de la cepa ECL45 requirió de 31 transferencias para crecer a 45 °C y 126 generaciones, mientras que la cepa ECL47 requirió más a partir de 45 °C, 59 transferencias más para crecer a 47°C. El total de pases durante la evolución fue de 90 pases y de 314 generaciones.
- La velocidad de crecimiento de las cepas ECL45 y ECL47 a 45 °C se redujo tan solo 14% en comparación a la cepa JU15\* a 37°C. Mientras que los rendimientos de conversión de glucosa a D-lactato con ambas cepas fueron mejores a 45 °C que a 37 °C.

## **XI. Perspectivas**

- Caracterizar la cepa ECL47 a 47°C.
- Complementar el proyecto con la secuenciación genómica de las cepas obtenidas (ECL45 y ECL47) y comparar los resultados con la cepa de referencia (JU15\*), con el fin de analizar las mutaciones surgidas durante el proceso de ALE y su efecto en el fenotipo de la cepa lactogénica.
- Implementar tecnologías moleculares, como microarreglos para comprender mejor la dinámica transcriptómica de las cepas obtenidas a temperaturas de 45 °C, y al mismo tiempo comparar el perfil transcriptómico con otras cepas termotolerantes.
- Someter a las cepas obtenidas en procesos de sacarificación y fermentación simultánea a temperaturas de 45°C o mayores.
- Evaluar a las cepas ECL45 y ECL47 a temperaturas mayores a 47 °C en medio de cultivo rico y comparar su desempeño en comparación al medio mínimo suplementado.

## XII. Referencias

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 156(4), 286–301. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2011.06.017>
- Aguilar, C., Escalante, A., Flores, N., Anda, R. De, Riveros-mckay, F., Gosset, G., ... Bolívar, F. (2012). *Genetic changes during a laboratory adaptive evolution process that allowed fast growth in glucose to an Escherichia coli strain lacking the major glucose transport system.*
- Almeida, J. R. M., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 82, pp. 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Andradý, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1977–1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>
- Anuradha, R., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (1999). Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochemistry*, 35(3–4), 367–375. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00080-1)
- Arsène, F., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00206-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00206-3)
- Avérous, L. (2008). Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. In *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* (pp. 433–450). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1>
- Balbas, P. (2002). *De la biología molecular a la biotecnología*. Editorial Trillas.
- Barrick, J. E., & Lenski, R. E. (2013, December 29). Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 14, pp. 827–839. <https://doi.org/10.1038/nrg3564>
- Bennett, A. F., & Lenski, R. E. (2007). An experimental test of evolutionary trade-offs during temperature adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(suppl 1), 8649–8654. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0702117104>
- Bennett, A. F., & Hughes, B. S. (2009). Microbial experimental evolution. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(1), R17–R25. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90562.2008>
- Blaby, I. K., Lyons, B. J., Wroclawska-Hughes, E., Phillips, G. C. F., Pyle, T. P., Chamberlin, S. G., de Crécy, E. (2012). Experimental Evolution of a Facultative Thermophile from a Mesophilic Ancestor. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 144–155. <https://doi.org/10.1128/AEM.05773-11>

- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Brockhaus, S., Petersen, M., & Kersten, W. (2016). A crossroads for bioplastics: exploring product developers' challenges to move beyond petroleum-based plastics. *Journal of Cleaner Production*, 127, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.003>
- Buckling, A., Craig MacLean, R., Brockhurst, M. A., & Colegrave, N. (2009). The Beagle in a bottle. *Nature*, Vol. 457, pp. 824–829. <https://doi.org/10.1038/nature07892>
- Caspeta, L., & Nielsen, J. (2015). Thermotolerant yeast strains adapted by laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses. *MBio*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-15>
- Chung, H. J., Bang, W., & Drake, M. A. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 5, pp. 52–64. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00002.x>
- Conrad, T. M., Lewis, N. E., & Palsson, B. Ø. (2011). Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 509. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.42>
- Cubas-Cano, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., & Tomás-Pejó, E. (2018). Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2), 290–303. <https://doi.org/10.1002/bbb.1852>
- Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution - principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, Vol. 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-64>
- Drumright, R. E., Gruber, P. R., & Henton, D. E. (2000). Polylactic acid technology. *Advanced Materials*, 12(23), 1841–1846. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200012\)12:23<1841::AID-ADMA1841>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200012)12:23<1841::AID-ADMA1841>3.0.CO;2-E)
- Eiteman, M. A., & Ramalingam, S. (2015b, May 1). Microbial production of lactic acid. *Biotechnology Letters*, Vol. 37, pp. 955–972. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1769-5>
- Elena, S., & Lenski, R. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet*, 4.
- Eş, I., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F. J., Saraiva, J. A., Sant'Ana, A. S., & Hashemi, S. M. B. (2018). Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International*, Vol. 107, pp. 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.001>
- Ezemaduka, A. N., Yu, J., Shi, X., Zhang, K., Yin, C. C., Fu, X., & Chang, Z. (2014). A small heat shock protein enables *Escherichia coli* to grow at a lethal temperature of 50°C conceivably by maintaining cell envelope integrity. *Journal of Bacteriology*, 196(11), 2004–2011. <https://doi.org/10.1128/JB.01473-14>

- Fatma, S., Hameed, A., Noman, M., Ahmed, T., Shahid, M., Tariq, M., Tabassum, R. (2018). Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. *Protein & Peptide Letters*, 25(2), 148–163. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180122144504>
- Ferla, M. P., Patrick Correspondence, W. M., & Patrick, W. M. (n.d.). *Bacterial methionine biosynthesis*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.077826-0>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Global Lactic Acid Market Size & Share Report, 2019-2025. (n.d.). Retrieved June 15, 2020, from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>
- Gonçalves de Moura, I., Vasconcelos de Sá, A., Lemos Machado Abreu, A. S., & Alves Machado, A. V. (2017). Bioplastics from agro-wastes for food packaging applications. *Food Packaging*, 223–263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804302-8.00007-8>
- Gunasekera, T., Gsonka, L., & Pally, O. (2008). Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. *J Bacteriol*, 190.
- Guyot, S., Pottier, L., Ferret, E., Gal, L., & Gervais, P. (2010). Physiological responses of *Escherichia coli* exposed to different heat-stress kinetics. *Archives of Microbiology*, 192(8), 651–661. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0597-1>
- Guyot, S., Pottier, L., Hartmann, A., Ragon, M., Hauck Tiburski, J., Molin, P., Gervais, P. (2014). Extremely rapid acclimation of *Escherichia coli* to high temperature over a few generations of a fed-batch culture during slow warming. *MicrobiologyOpen*, 3(1), 52–63. <https://doi.org/10.1002/mbo3.146>
- Hamad, K., Kaseem, M., Ayyoob, M., Joo, J., & Deri, F. (2018). Polylactic acid blends: The future of green, light and tough. *Progress in Polymer Science*, Vol. 85, pp. 83–127. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.001>
- Hassan, S. S., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2018). Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Vol. 262, pp. 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>
- Heidbreder, L. M., Bablok, I., Drews, S., & Menzel, C. (2019). Tackling the plastic problem: A review on perceptions, behaviors, and interventions. *Science of the Total Environment*, Vol. 668, pp. 1077–1093. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.437>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Vol. 100, pp. 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- John, R. P., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2007). Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 74, pp. 524–534. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>

- Juturu, V., & Wu, J. C. (2016). Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 967–977. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1066305>
- Karan, H., Funk, C., Grabert, M., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, Vol. 24, pp. 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.010>
- LaCroix, R. A., Palsson, B. O., & Feist, A. M. (2017b). A model for designing adaptive laboratory evolution experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.03115-16>
- LaCroix, R. A., Sandberg, T. E., O'Brien, E. J., Utrilla, J., Ebrahim, A., Guzman, G. I., ... Feist, A. M. (2015). Use of Adaptive Laboratory Evolution To Discover Key Mutations Enabling Rapid Growth of *Escherichia coli* K-12 MG1655 on Glucose Minimal Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02246-14>
- Lactic acid | HC3H5O3 - PubChem. (n.d.). Retrieved November 24, 2019, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-acid>
- Lee, D.-H., Feist, A. M., Barrett, C. L., & Palsson, B. Ø. (2011). Cumulative Number of Cell Divisions as a Meaningful Timescale for Adaptive Laboratory Evolution of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 6(10), e26172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026172>
- Lenski, R. E., Rose, M. R., Simpson, S. C., & Tadler, S. C. (1991). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2000 generations. *American Naturalist*, 138(6), 1315–1341. <https://doi.org/10.1086/285289>
- Lim, L.-T., Auras, R., & Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, 33(8), 820–852. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004>
- Luckachan, G. E., & Pillai, C. K. S. (2011). Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(3), 637–676. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0317-1>
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. ria M. (2015) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, Vol. 1, pp. 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
- Martínez Jiménez, A., & Gosset Lagarda, G. (2007). *Ingeniería metabólica de bacterias*. Biotecnología V14 CS3.indd-376
- Martinez, A., Grabar, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*, 29(3), 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9252-y>
- Martinez, Alfredo, Rodríguez-Alegría, M. E., Fernandes, M. C., Gosset, G., & Vargas-Tah, A. (2017). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Lactic Acid Production from Renewable Resources BT - *Engineering of Microorganisms for the Production of Chemicals and Biofuels from Renewable Resources* (G. Gosset, Ed.). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51729-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51729-2_5)

- Mettler, E. (2005). Temperature effect on bacterial growth rate : quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on / in food. *100*, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.015>
- Mordukhova, E. A., & Pan, J.-G. (2014). Stabilization of Homoserine-O-Succinyltransferase (MetA) Decreases the Frequency of Persisters in *Escherichia coli* under Stressful Conditions. *PLoS ONE*, *9*(10), e110504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110504>
- Murata, M., Fujimoto, H., Nishimura, K., Charoensuk, K., Nagamitsu, H., Raina, S., ... Yamada, M. (2011). Molecular Strategy for Survival at a Critical High Temperature in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *6*(6), e20063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020063>
- Murata, M., Ishii, A., Fujimoto, H., Nishimura, K., Kosaka, T., Mori, H., & Yamada, M. (2018). Update of thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in *Escherichia coli*. *PLOS ONE*, *13*(2), e0189487. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189487>
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A. (2004, August 15). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 7. <https://doi.org/10.2225/vol7-issue2-fulltext-7>
- Nofar, M., Sacligil, D., Carreau, P. J., Kamal, M. R., & Heuzey, M. C. (2019, March 15). Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 125, pp. 307–360. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002>
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(3), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2280-5>
- Orenco-Trejo, M., Utrilla, J., Fernández-Sandoval, M. T., Huerta-Beristain, G., Gosset, G., & Martinez, A. (2010). *Engineering the Escherichia coli Fermentative Metabolism BT - Biosystems Engineering II: Linking Cellular Networks and Bioprocesses* (C. Wittmann & R. Krull, Eds.). [https://doi.org/10.1007/10\\_2009\\_61](https://doi.org/10.1007/10_2009_61)
- Palsson, B. O., & Palsson, B. O. (2015). Adaptive Laboratory Evolution. In *Systems Biology* (pp. 422–437). <https://doi.org/10.1017/cbo9781139854610.031>
- Portnoy, V. A., Bezdán, D., & Zengler, K. (2011). Adaptive laboratory evolution-harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 22, pp. 590–594. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.007>
- Portnoy, V., Herrgard, M., & Palsson, B. (2008). Aerobic fermentation of d -glucose by an evolved cytochrome oxidase-deficient *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol*, *74*.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, Vol. 40, pp. 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>

- Riehle, M. M., Bennett, A. F., & Long, A. D. (2001). Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 525–530. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.525>
- Rios, H., T., A. (2019). Eliminación de transportadores para el consumo de xilosa y glucosa en una cepa lactogénica de *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM.
- Rodrigues, J. L., & Rodrigues, L. R. (2018). Potential Applications of the *Escherichia coli* Heat Shock Response in Synthetic Biology. *Trends in Biotechnology*, 36(2), 186–198. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.014>
- Roncarati, D., & Scarlato, V. (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output. *FEMS Microbiology Reviews*, 015, 549–574. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux015>
- Rudolph, B., Gebendorfer, K. M., Buchner, J., & Winter, J. (2010). Evolution of *Escherichia coli* for Growth at High Temperatures. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19029–19034. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.103374>
- Salgado, D., J., A. (2018). Efecto de la temperatura en la producción de etanol y en la expresión génica de las cepas *Escherichia coli* MS04 y MS04  $\Delta$ ptsG. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM
- Sandberg, T. E., Salazar, M. J., Weng, L. L., Palsson, B. O., & Feist, A. M. (2019). The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metabolic Engineering*, Vol. 56, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.08.004>
- Sierra, I., E. (2011). Determinación del criterio de escalamiento para la producción de lactatos con *Escherichia coli* recombinante. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM.
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. V. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1612–1626. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
- Thakur, S., Chaudhary, J., Sharma, B., Verma, A., Tamulevicius, S., & Thakur, V. K. (2018). Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, Vol. 13, pp. 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.04.013>
- Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>
- Travisano, M., & Lenski, R. (1996). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IV. Targets of selection and the specificity of adaptation. *Genetics*, 143.
- Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, Vol. 49, pp. 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>

- Utrilla, C., J. (2010). Ingeniería metabólica en *E. coli* para la conversión eficiente de xilosa a D-lactato. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología-UNAM.
- Van Derlinden, E., Bernaerts, K., & Van Impe, J. F. (2007). Dynamics of *Escherichia coli* at elevated temperatures: effect of temperature history and medium. *Journal of Applied Microbiology*, 0(0), 071011100832001-???. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03592.x>
- VanBogelen, R. A., Acton, M. A., & Neidhardt, F. C. (1987). Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, 1(6), 525–531. <https://doi.org/10.1101/gad.1.6.525>
- Venkatesh, K. V. (1997). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. *Bioresource Technology*, 62(3), 91–98. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00122-3)
- Vijayakumar, J., Aravindan, R., & Viruthagiri, T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(2), 245–264.
- Winkler, J., Reyes, L. H., & Kao, K. C. (2013). Adaptive laboratory evolution for strain engineering. *Methods in Molecular Biology*, 985, 211–222. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-299-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-299-5_11)
- Yura, T., Nagai, H., & Mori, H. (1993). Regulation of the Heat-Shock Response in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 47(1), 321–350. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.001541>
- Zhao, C., Shao, Q., & Chundawat, S. P. S. (2020). Recent advances on ammonia-based pretreatments of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Vol. 298, p. 122446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122446>

### XIII. Anexos

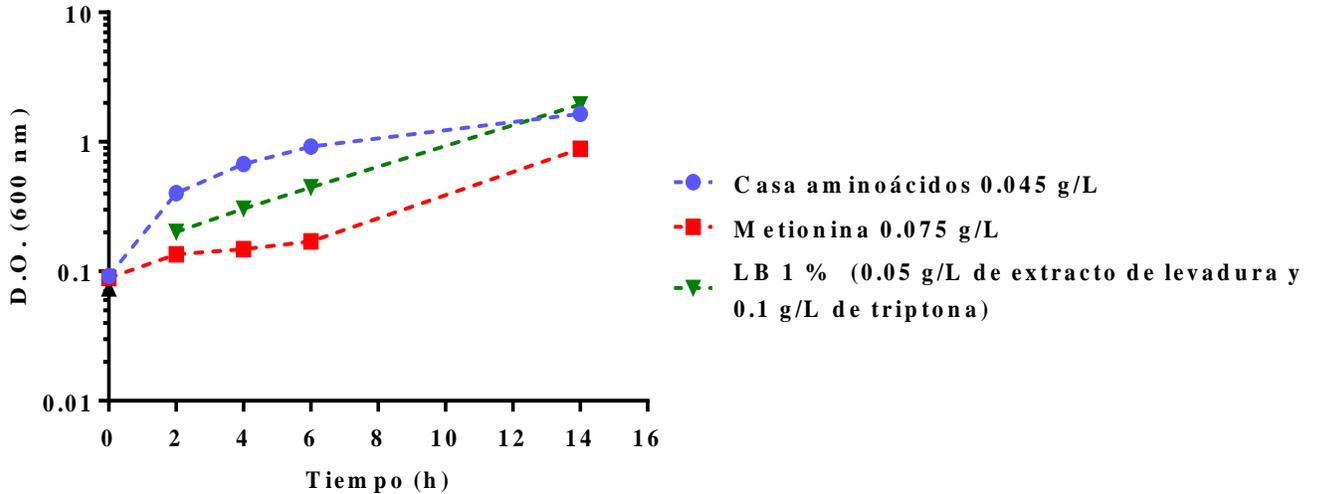
#### Apéndice 1. Genes termotolerantes reportados por Murata y colaboradores.

**Tabla 6.** Grupo de genes identificados en el estudio de Murata y colaboradores (2018).

Grupo	Función	Genes
<b>A</b>	Metabolismo energético	<i>dapF, trp, pdxH, aceE, aceF,</i> <i>lpd, lipA, ackA, rpe</i>
<b>B</b>	Estabilización de la membrana	<i>gmhB, lpcA, rfaC, rfaD, rfaF,</i> <i>rfaG, pal, toQ</i>
<b>C</b>	Reparación de ADN	<i>dnaQ, holC, priA, ruvA, ruvC</i>
<b>D</b>	Modificación de ARNt	<i>yccM</i>
<b>E</b>	Control de calidad de proteínas	<i>dnaJ, dnaK, degP, rse</i>
<b>F</b>	Control de traducción	<i>rpmJ, rpsF, dksA, smpB</i>
<b>G</b>	División celular y transportadores	<i>zntA, ybgH</i>

Murata y colaboradores en esta lista clasifican genes termotolerantes en *E. coli* cuando hay una temperatura alta crítica (47 °C).

## Apéndice 2. Cinética de crecimiento para determinar el mejor suplemento durante ALE

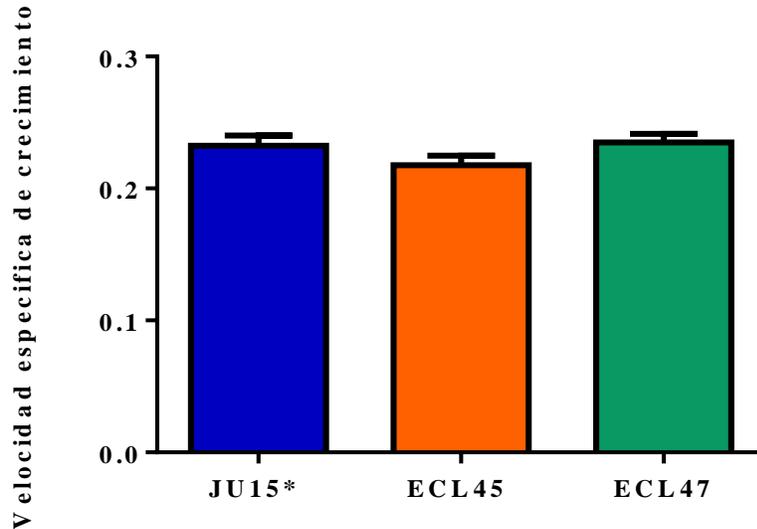


**Figura 17.** Comparación de crecimiento en medio AM1 suplementado con casa aminoácidos, metionina y medio LB.

La elección del medio como se explicó anteriormente se basó en antecedentes sobre los efectos de la temperatura. En primer lugar, se evaluó metionina y casa aminoácidos, optando por casa aminoácidos. Sin embargo, al hacer la selección, dejó de crecer, prefiriendo la implementación de LB al 1%, el cual en comparación de la casa aminoácidos, está conformado por todos los aminoácidos, minerales y vitaminas. Por lo que se podría pensar, que además de ser necesaria la metionina a temperaturas elevadas, también se ve afectada la biosíntesis de otros nutrientes.

### Apéndice 3. Análisis estadístico ANOVA de las variantes obtenidas por ALE

Comparación de JU15\*, ECL45 y ECL47 en 37° C

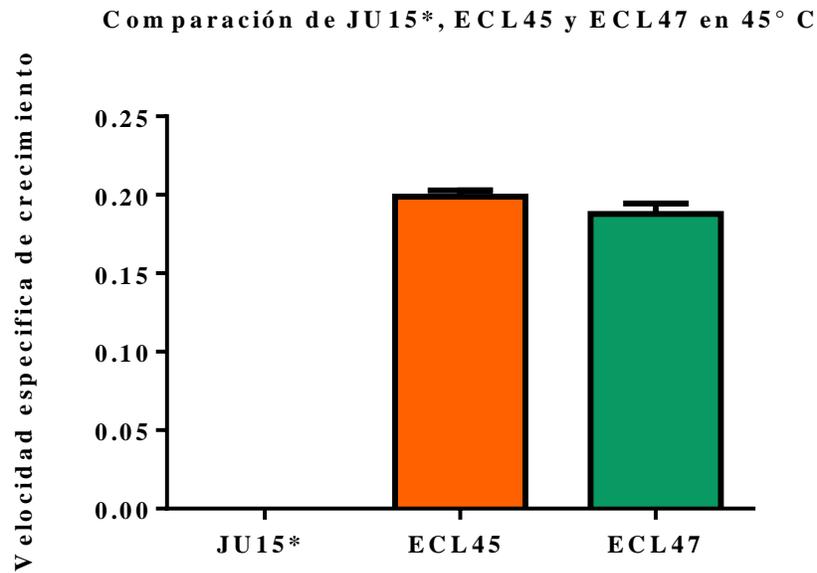


**Figura 18.** Comparación de la velocidad específica de crecimiento mediante análisis estadístico ANOVA de las cepas obtenidas por ALE (ECL45 yECL47) y la cepa ancestral (JU15\*) a 37° C.

**Tabla 7.**Análisis estadístico ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	F calculada	F de las tablas 0.05; 2;6	p-valor
Tratamientos	2	0.0005262	0.0002631	0.04215	5.002	0.0527
Residual	6	0.0003156	5.260e-005			
Total	8	0.0008419				

Al ser  $0.042 < 5.00$ , se acepta la hipótesis nula, por lo que no existe diferencia significativa sobre la velocidad de crecimiento entre la cepa parental y las variantes obtenidas por ALE a 37° C.



**Figura 19.** Comparación de la velocidad específica de crecimiento mediante análisis estadístico ANOVA de las cepas obtenidas por ALE (**ECL45** y **ECL47**) y la cepa ancestral (**JU15\***) a 45° C

**Tabla 8.** Análisis estadístico ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	Fc	Ft 0.05; 2;6	p-valor
Tratamientos	2	0.0005262	0.0002631	0.04215	5.002	0.0527
Residual	6	0.0003156	5.260e005	1830	1830	0.0001
Total	8	0.0008419				