



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS**

**MANIPULACIÓN DE LAS RUTAS FERMENTATIVAS DE
Escherichia coli PARA PRODUCCIÓN DE
METABOLITOS**

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

P R E S E N T A :

María del Consuelo Vázquez Limón

DIRECTOR DE TESIS: Joel Osuna Quintero



CUERNAVACA, MORELOS 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM en dos etapas:
La primera etapa en el laboratorio del Dr. Agustín López Munguía.
La segunda etapa en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón Mainero.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de la beca crédito 138498. Y a través de los proyectos: EDO. DE MORELOS – 2004-C02-048 y SAGARPA -2004-C01-224. Y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través del proyecto PAPIIT IN220908.

Con especial agradecimiento:

A los miembros del Comité Tutoral por su importante participación en el desarrollo de este proyecto:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Dr. Agustín López Munguía Canales
Dr. Joel Osuna Quintero

A los miembros del Jurado por su aportación a la revisión de la tesis:

Dra. Gloria Saab Rincón
Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich
Dr. Adelfo Escalante Lozada
Dr. Miguel Angel Cevallos

A. Dr. Humberto Flores por sus valiosas críticas al trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores y maestros Agustín, Alfredo y Joel por levantarme todas las veces que me caí, por sus enseñanzas y por preocuparse siempre por mi persona. Ha sido un gran placer conocerlos y trabajar con ustedes.

A todos los López por tantos años que pasamos trabajando y divirtiéndonos juntos, ayudándonos, compartiendo alegrías y momentos difíciles.

A los Moretos-Soberones por hacerme un espacio, por su ayuda y por su amabilidad (y también por guarros).

A toda la comunidad del IBT, porque pude encontrar apoyo incondicional en todos los laboratorios a los que acudí (que no fueron pocos) y siempre me brindaron ayuda y una sonrisa. Me siento orgullosa de formar parte de esta valiosa comunidad.

Llegué al instituto con la idea de que no tendría tiempo para socializar y sólo me dedicaría a “La Ciencia”, afortunadamente me equivoqué y me llevo de esta maravillosa etapa a muchos de los mejores amigos que he podido encontrar en mi camino. Gracias por su amistad (y por las parrandas), y ojalá no olvide mencionar a ninguna(o): Xo, Lolita, Vanesa, Mariana, Marcela, Martha, Fer, Gina, María, Sandra, Arlette, Alina, Alex, Azucena, Vero.

A toda mi numerosa y gran familia Vázquez, porque somos tan afortunados de contar unos con otros, porque nos queremos y nos apoyamos, gracias hermanitas y hermanitos. Mami, eres un gran ejemplo. Alejandras y Benjamines, gracias por tener siempre un lugar para nosotros. Leonardo, nos tocó andar juntos este camino, gracias por creer en mí.

A la otra gran familia con la que cuento: los Carpinteyro. Orla y Pepe, gracias por su apoyo y cariño (y por su hijo).

A mis cuates: Víctor, Pablo, Edgar, Juan, Ro y Liz, por todo lo que nos falta por recorrer.

Y para cerrar con broche de oro, agradezco a la vida por mi pequeña gran familia: Víctor y Rubén que son el centro de mi universo.

Víctor y Rubén:
Gracias por hacerme tan dichosa.
Esto va por ustedes.

“Sentémonos juntos y veremos qué pasa, disfruta el futuro,
que el pasado aguarda”

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN	1
2	SUMMARY	2
3	INTRODUCCIÓN:	3
3.1	Ingeniería de vías metabólicas	3
3.2	Materias primas.	4
3.3	Ingeniería de vías metabólicas para la producción de lactato y etanol	8
4	ANTECEDENTES	12
4.1	Rutas metabólicas de <i>E. coli</i>	12
4.1.1	<i>E. coli</i> no-fermentativa.	13
4.2	Ingeniería de vías metabólicas en <i>E. coli</i> para la producción de etanol... ..	15
4.3	Piruvato descarboxilasa	17
4.4	Producción de ácido láctico	18
4.5	Lactato deshidrogenasa.....	20
4.6	Evolución dirigida	22
4.6.1	Generación de diversidad	23
4.6.2	Selección y tamizaje de variantes.....	24
5	HIPOTESIS	26
6	Objetivo General:	26
7	Objetivos Particulares:	26
8	MATERIALES Y METODOS	27
8.1	Cepas y plásmidos.....	27
8.2	Técnicas genéticas:	28
8.3	Cultivos anaerobios	28
8.4	Construcción de los bancos <i>lctE</i>	29
8.5	Aleatorización de <i>lctE</i> mediante “error prone PCR”.	29
8.6	DNA shuffling o PCR sexual	29
8.7	SDS-PAGE	30
8.8	Western blot.....	30
8.9	Purificación de proteínas etiquetadas con 6-His.....	31

8.10	Determinación de actividades:	31
8.11	Otros procedimientos analíticos:.....	32
9	RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
9.1	INGENIERIA DE VIAS METABOLICAS.....	33
9.1.1	Desarrollo de la cepa <i>E. coli</i> VAL23.....	33
9.1.2	Construcción del plásmido para eliminar <i>ldhA</i>	35
9.1.3	Construcción del plásmido para eliminar <i>pflB</i>	36
9.1.4	Eliminación del gen <i>ldhA</i>	38
9.1.5	Eliminación del gen <i>pfl</i>	41
9.1.6	Perfil de metabolitos de las mutantes de <i>E. coli</i>	42
9.2	Construcción del plásmido pTrc-PET.....	44
9.3	Relación velocidad de regeneración de NAD ⁺ – velocidad de crecimiento.	45
9.4	Evolución dirigida de PDC.	49
9.5	Caracterización bioquímica de las variantes en PDC.	51
9.6	Obtención de vectores de baja expresión.....	54
9.6.1	Vector con un promotor débil V3.....	54
9.6.2	Vector pT4 con un sitio de unión a ribosoma débil.	56
9.7	Evaluación de <i>E. coli</i> VAL23 complementada con LDH.....	61
9.8	Evolución dirigida de LDH.....	63
9.9	Mutagénesis a saturación en la posición G38 de la LDH.....	65
10	CONCLUSIONES.....	67
11	PERSPECTIVAS.....	68
12	REFERENCIAS.....	69
13	ANEXO.	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Composición de la lignocelulosa.	6
Figura 2.	Estructura de la celulosa	6
Figura 3.	Precusores básicos de la formación de la molécula de lignina	7
Figura 4.	Cepas modificadas por ingeniería de vías metabólicas.	9
Figura 5.	Rutas fermentativas de <i>E. coli</i>	13
Figura 6.	Operón <i>pet</i>	15
Figura 7.	Ruta de formación de etanol por acción de PDC y ADH.	17
Figura 8.	Ruta de formación de lactato por acción de LDH.....	21
Figura 9.	Vector de reemplazo genético pKO3.....	33
Figura 10.	Esquema de construcción del plásmido “knockeador”.	34
Figura 11.	Ejemplo de la primera PCR donde se obtienen los fragmentos del inicio y fin del gen.....	35
Figura 12.	Plásmidos digeridos, aislados de las cepas transformadas con la ligación pKO3-ldh.....	36
Figura 13.	Plásmidos digeridos, aislados de las células transformadas con la ligación pKO3- pfl.....	37
Figura 14.	Protocolo de reemplazo genético.....	39
Figura 15.	Fragmentos de DNA obtenidos por PCR de colonia para el gen <i>ldh</i> de las cepas candidatas.	41
Figura 16.	Fragmentos de DNA obtenidos por PCR para el gen <i>pfl</i> de las cepas candidatas.	42
Figura 17.	Plásmido inducible por IPTG, pTrcPET.....	45
Figura 18.	<i>E. coli</i> VAL23-pTrcPET en LB, glucosa 2 g/l a diferentes concentraciones de IPTG.....	47
Figura 19.	Distribución del diámetro de colonia de <i>E. coli</i> VAL23-pTrcPET en medio sólido LB, glucosa 20 g/l, en anaerobiosis a diferentes concentraciones de IPTG.....	48
Figura 20.	Determinación de actividades PDC y velocidad de crecimiento de las variantes obtenidas del DNA shuffling.....	51

Figura 21.	A. SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. B. Western Blot con anticuerpo anti6-His.....	52
Figura 22.	Actividad PDC de las variantes normalizada por píxeles.	52
Figura 23.	Cinética de crecimiento en tubo sellado <i>E. coli</i> VAL23-V3, LB-Glc 20 g/l.	56
Figura 24.	Plásmido pT4Bla.	57
Figura 25.	Amplificación del fragmento FR-wk con el RBS modificado y el inicio de <i>pdg</i>	57
Figura 26.	Síntesis del fragemento que contiene a <i>pdg</i> con el RBS modificado, usando dos moldes, y dos iniciadores sintéticos.....	58
Figura 27.	Plásmido pT4PETwk.....	59
Figura 28.	Western blot del extracto celular de <i>E. coli</i> VAL23 expresando el plásmido pT4PDCwk.....	60
Figura 29.	Plásmido pTrc-lctE.	62
Figura 30.	Cultivos sólidos anaerobios LB, Na ₂ CO ₃ 4 g/l y glucosa 2 g/l sin inductor. <i>E. coli</i> VAL23 expresando:A. LDH WT, B. LDH G38	62
Figura 31.	Efecto de la sobreexpresión de LDH de <i>B. subtilis</i> en <i>E. coli</i> VAL23 transformada con pTrclctE.	63
Figura 32.	Selección anaerobia de variantes de LDH obtenidas por evolución dirigida en <i>E. coli</i> VAL23.	63
Figura 33.	Cultivos microaerobios de <i>E. coli</i> VAL23 pTrclctE (medio mineral, Glc 40 g/l) con las variantes en LDH 6T3, 2P y la parental.	64
Figura 34.	Relación entre la velocidad de crecimiento anaerobio y la actividad de variantes de LDH G38 contenidas en <i>E. coli</i> VAL23.	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cepas y plásmidos empleados.....	27
Tabla 2.	Concentraciones de metabolitos después de 12 h de cultivo de las cepas mutantes en <i>ldhA</i> medidos por HPLC.	40
Tabla 3.	Comparación de las concentraciones máximas de metabolitos en las cepas <i>E. coli</i> W3110 y VAL23.	43
Tabla 4.	Perfil de metabolitos de las cepas desarrolladas.....	44
Tabla 5.	Correlación entre la velocidad específica de crecimiento y la actividad PDC (18 h cultivo) en <i>E. coli</i> VAL23-pTrcPDC cultivada en LB, glucosa 20 g /l.....	48
Tabla 6.	Banco de PDC expresado en <i>E.coli</i> XL1-Blue sin presión de selección.	50
Tabla 7.	Variantes expresadas en <i>E. coli</i> VAL23 obtenidas por selección en anaerobiosis.	50
Tabla 8.	Actividad PDC expresada a partir de los promotores mutantes en la caja -35. (Cultivos aerobios, LB, Ap, IPTG 1 mM)	55
Tabla 9.	Comparación de actividades entre el plásmido pTrcPDC nativo y el plásmido V3, con la mutación en la caja -35 a diferentes concentraciones de IPTG (cultivos aerobios, LB-Ap).	55
Tabla 10.	Análisis del cultivo anaerobio <i>E. coli</i> VAL23-V3, LB-Glc 20 g/l	56

1 RESUMEN

En este trabajo planteamos que existe una relación directa entre la velocidad de crecimiento bacteriano y la velocidad enzimática de regeneración del NAD⁺. Proponemos que la velocidad de regeneración de NAD⁺, en cepas no fermentativas complementadas con una ruta alterna, depende a su vez, de la capacidad catalítica de la enzima limitante de dicha ruta.

Con el fin de demostrar lo anterior, construimos la cepa de *Escherichia coli* VAL23 carente de los genes *ldhA* y *pflB* (que codifican para D- lactato deshidrogenasa y piruvato formato liasa, respectivamente) y la complementamos con dos rutas fermentativas de importancia industrial. La ruta de producción de etanol, con los genes *pdhC* y *adhB* de *Zymomonas mobilis* que codifican para la piruvato descarboxilasa (PDC) y la alcohol deshidrogenasa (ADH), respectivamente. Y para la producción de L-lactato (precursor del plástico biodegradable, ácido poliláctico) con el gene *lctE* de *Bacillus subtilis* que codifica para L-LDH

Con la cepa *E. coli* VAL23 complementada con la ruta homoetanológica de *Zymomonas mobilis* se demostró que la velocidad de crecimiento en condiciones anaerobias es directamente proporcional al nivel de expresión de la enzima PDC, al ser ésta la primera enzima de la vía y el paso limitante. La relación entre la velocidad de crecimiento y la capacidad catalítica de la enzima limitante se demostró de manera contundente al complementar *E. coli* VAL23 con diferentes variantes de la L-LDH.

Dada esta relación entre actividad enzimática y velocidad de crecimiento, fue posible desarrollar una novedosa estrategia de selección basada en la velocidad de crecimiento para el mejoramiento de enzimas fermentativas por técnicas de evolución dirigida. Con este método se analizaron bancos de variantes en *pdhC* y *lctE*, usando como criterio de selección la velocidad de crecimiento. Los resultados indican que el método es eficiente para encontrar proteínas con propiedades mejoradas.

2 SUMMARY

In this work, we proposed that there is a direct relationship between specific growth rate and the enzymatic NAD⁺ regeneration rate. On a non-fermentative *Escherichia coli* strain, NAD⁺ regeneration rate should depend on the catalytic turnover of the pathway limiting enzyme.

To demonstrate our hypothesis we constructed an *Escherichia coli* strain which lacks *ldhA* and *pflB*, (encoding D-lactate dehydrogenase and pyruvate formate lyase, respectively). The non-fermentative strain (*E.coli* VAL23) was complemented with two fermentative pathways: ethanologenic pathway, i.e. *pdh* and *adhB* from *Zymomonas mobilis*; and L-lactic acid pathway, i.e. *lctE* from *Bacillus subtilis*.

By complementing the non-fermentative *E. coli* strain with the recombinant *Z. mobilis* ethanol pathway, we evaluated the effect of different levels of enzymatic activity on growth rate, demonstrating that there is a direct relationship between anaerobic growth rate and the total specific activity of pyruvate decarboxylase (PDC), which is the limiting enzyme of this specific fermentative NAD⁺ regenerating pathway. This growth rate – catalytic turnover relationship was conclusively demonstrated by complementing *E. coli* VAL23 with L-LDH variants with different catalytic parameters.

This relationship proved to be useful for establishing a novel selection strategy based on growth rate for improving fermentative enzymes through directed evolution. By means of this method, *lctE* and *pdh* gene libraries were analyzed, using growth rate as selection criterion. This method resulted useful to find improved variants.

3 INTRODUCCIÓN:

La fermentación –la aplicación de la biocatálisis más antigua y sofisticada– representa un mercado mundial muy competitivo. Muchos metabolitos de uso general, como combustibles y químicos a granel pueden ser producidos por fermentación partiendo de carbohidratos renovables. El incremento en los costos del petróleo ha creado la oportunidad para que estos productos químicos obtenidos por fermentación tengan un precio competitivo con los obtenidos del petróleo. Dos metabolitos de particular interés son el etanol – como combustible automotor- y ácidos orgánicos, como el láctico para la producción de plásticos biodegradables; que producidos por fermentación, ofrecen el potencial de reemplazar una porción significativa del petróleo consumido (y su consecuente disminución de la emisión de gases con efecto invernadero). A diferencia de los productos de alto valor agregado como nutracéuticos o compuestos de uso médico, el precio de venta de los químicos a granel depende en gran medida de los costos de la materia prima de los caldos de fermentación.

Por medio de la fermentación, las materias primas se transforman mediante una serie de reacciones químicas catalizadas por múltiples enzimas, todas dentro de una célula. A los agentes biológicos (ya sean células completas o preparados enzimáticos) que transforman la materia prima se les conoce de manera general como biocatalizadores.

La búsqueda de nuevos biocatalizadores que permitan desarrollar tecnologías alternativas para la producción de metabolitos de interés de manera sustentable y con costos competitivos es uno de los grandes retos de este siglo.

3.1 Ingeniería de vías metabólicas

Algunas de las ventajas que brindan los biocatalizadores para una serie de transformaciones son su alta selectividad y la posibilidad de utilizar recursos renovables como materia prima con un menor costo ambiental. Sin embargo, los microorganismos existentes rara vez cumplen con todos los requisitos para un proceso rentable, por lo que existe un gran interés a nivel académico, industrial y gubernamental para identificar o construir nuevos biocatalizadores con mejores criterios de desempeño así como para ampliar la gama de productos químicos obtenidos de fuentes renovables.

En las últimas décadas, se ha trabajado en los procesos biológicos para aumentar las productividades volumétricas y rendimientos; sin embargo, su competitividad no supera a la síntesis química para un vasto número de compuestos y materiales. Las limitaciones más comunes de los biocatalizadores son sus bajos rendimientos, bajas productividades o títulos, así como pobre tolerancia hacia condiciones extremas del proceso, tal como temperatura, pH y altas concentraciones de solutos.

Las técnicas de ingeniería genética permiten dar más flexibilidad a la optimización del proceso. Dichas técnicas pueden emplearse, por ejemplo, para ampliar el número de sustratos que un organismo puede utilizar, para alterar el perfil de productos secretados por la célula, o para incrementar el rendimiento y productividad de productos convencionales o novedosos.

Aunque la ingeniería genética ha sido parte fundamental en la construcción de cepas con propiedades mejoradas o únicas, el gran reto recae en generar incrementos mucho mayores en las rutas metabólicas de los microorganismos industriales, tales como las levaduras, los bacilos, *Streptomyces* y *Escherichia coli*. Dichas amplificaciones en los flujos metabólicos se requieren para alcanzar incrementos significativos en las productividades específicas de los sistemas biológicos que les permita competir con los procesos químicos convencionales (Stephanopoulos & Simpson 1997).

La ingeniería de vías metabólicas, que emplea tecnología del DNA recombinante, ofrece la posibilidad de manipular los procesos enzimáticos, los sistemas regulatorios y de transporte en la célula, con el propósito de elevar el rendimiento de un producto específico. La oportunidad de introducir genes heterólogos y elementos regulatorios distingue a la ingeniería de vías metabólicas de los procesos genéticos tradicionales de mejoramiento de cepas (Bailey 1991).

La falta de un microorganismo adecuado para la conversión industrial de biomasa vegetal en etanol o en lactato es uno de los principales factores que impiden el desarrollo exitoso de una industria basada en la utilización de lignocelulosa. Por lo que en las últimas dos décadas un blanco obvio en el campo de la ingeniería de vías metabólicas, ha sido la confección de tal microorganismo, combinando características favorables de diferentes organismos.

3.2 Materias primas.

Una gran variedad de fuentes pueden emplearse para proporcionar los

azúcares necesarios para la producción de etanol y lactato; principalmente cultivos alimentarios y biomasa lignocelulósica. Los cultivos alimentarios más usados son: caña de azúcar y remolacha que son ricos en sacarosa; así como maíz y otros cereales ricos en almidón.

La relevancia de ciertos cultivos alimentarios como materia prima se destaca por el hecho de que alrededor del 90% del etanol deriva de dichos cultivos (60% de caña de azúcar, y remolacha, y el restante de granos, principalmente maíz) (Berg 2000). El uso de estos cultivos alimentarios es tema de debate puesto que representa una competencia con los cultivos destinados a la alimentación humana, y de acuerdo a algunos estudios (Hill *et al.* 2006), tienen costos ambientales mayores que el empleo de combustibles fósiles. En contraste con los cultivos alimentarios, la utilización de lignocelulosa como sustrato para la fermentación, representa una mejor alternativa que, sin embargo, tiene una barrera debida a su compleja estructura, que es muy resistente a la degradación.

Existen abundantes fuentes de biomasa lignocelulósica, entre las que podemos mencionar: residuos agrícolas, desechos del procesamiento de alimentos, madera, desechos sólidos municipales y de la industria del papel; así como pastos y plantas leñosas de rápido crecimiento, que podrían servir como materia prima de bajo costo para la producción de etanol y lactato. Se ha estimado que la lignocelulosa representa el 50% de la biomasa vegetal del planeta (Claasen *et al.* 1999). Diversos autores han enfatizado las ventajas de usar lignocelulosa como materia prima, en particular para la producción de biocombustibles. A diferencia de los combustibles fósiles, los biocombustibles se producen con una materia prima (lignocelulosa) distribuida uniformemente en todo el planeta, lo que posibilita la producción doméstica y garantiza el suministro energético de cualquier región del mundo. Comparado con el cultivo de maíz o soya para la producción de etanol o biodiesel, la materia lignocelulósica requiere menor inversión energética; no se requiere de una tierra fértil para su cultivo; ni uso intensivo de fertilizantes y pesticidas. Por lo que se minimiza el conflicto de uso de tierras cultivables para la producción de alimentos. Por último, los biocombustibles producidos con lignocelulosa generan menor emisión neta de gases con efecto invernadero, reduciendo el impacto ambiental, y en general provocan un impacto socio-económico favorable (Hahn-Hägerdal *et al.* 2008).

La lignocelulosa contiene en promedio, 35 - 50% de celulosa, 20-35% hemicelulosa y 10 - 15% lignina (Figura 1).

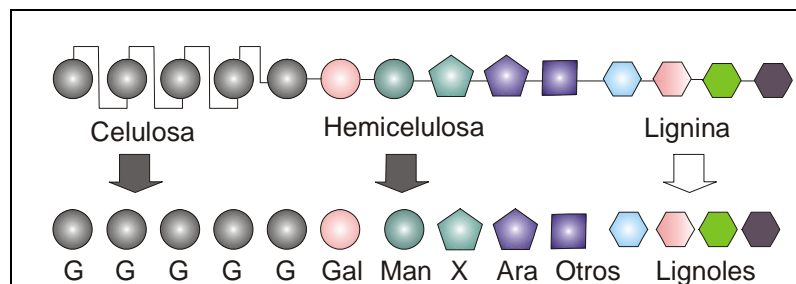


Figura 1. Composición de la lignocelulosa. (Tomado de Zaldivar *et al.* 2001). Las flechas representan hidrólisis (solo los monómeros indicados con flechas oscuras pueden fermentarse). G: glucosa, Gal: galactosa, Man: manosa, X: xilosa, Ara: arabinosa, Otros: ramnosa, fucosa, ácidos urónicos.

La celulosa es un polímero lineal compuesto por moléculas de D-glucosa anhidra unidas por enlaces glucosídicos $\beta(1,4)$. La unidad básica repetida es la celobiosa (Figura 2). Las moléculas de celulosa son cadenas, o microfibrillas, de hasta 14000 unidades de D-glucosa, que se agrupan en haces torsionados, a manera de lazos, sujetos por puentes de hidrógeno. La conformación secundaria y terciaria de la celulosa, así como su estrecha asociación con la lignina, hemicelulosa, almidón y elementos proteicos y minerales, hace que sea una molécula muy resistente a la hidrólisis. La celulosa puede ser hidrolizada químicamente con ácido diluido o concentrado, o bien, enzimáticamente.

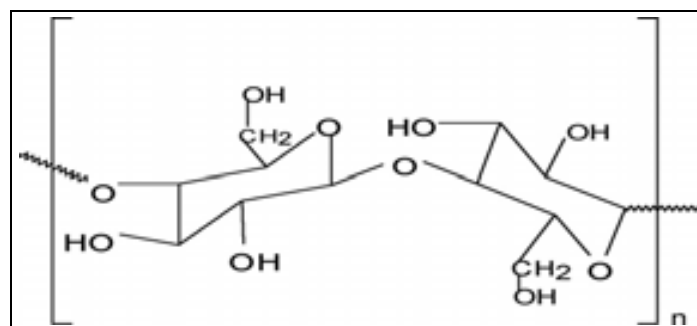


Figura 2. Estructura de la celulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero altamente ramificado que contiene residuos de azúcares tales como hexosas (D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-ramnosa, L-fucosa), pentosas (D-xilosa, L-arabinosa) y ácidos urónicos (D-glucoronato). La hemicelulosa se hidroliza más fácilmente que la celulosa. La composición de la hemicelulosa varía en cada organismo.

La lignina es el polímero aromático más abundante en la naturaleza, es una macromolécula de carácter fenólico, constituido por tres clases diferentes de alcoholes hidrocínamicos llamados lignoles (coniferílico, sinapílico y *p*-cumarílico; Figura 3). La polimerización se produce por peroxidasas y lacasas, que generan radicales fenoxilo y posteriormente metiluros quinónicos. Estos reaccionan entre sí dando lugar a unos seis tipos mayoritarios de enlaces en los dímeros. Distintas ligninas difieren en el contenido de cada uno de los lignoles, en la cantidad de enlaces diméricos y en la forma que las cadenas se enlazan entre sí.

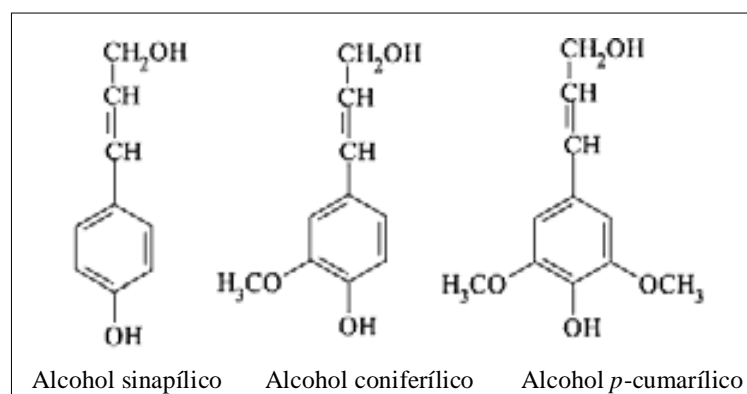


Figura 3. Precursores básicos de la formación de la molécula de lignina

Para que la lignocelulosa sea factible de fermentar, deben llevarse a cabo diferentes tratamientos que liberen los azúcares monoméricos para que puedan posteriormente ser transformados por los microorganismos. Los dos pasos principales son: 1) pretratamiento (por medios físicos y químicos) que libera hexosas y pentosas de la hemicelulosa y 2) tratamiento enzimático (o alternativamente, hidrólisis por métodos químicos) que generan glucosa a partir de la celulosa. No existe actualmente ningún microorganismo que pueda emplear los monómeros de la lignina para producir alcohol.

La materia lignocelulósica, en particular de madera y materiales de la agricultura, pueden contener entre 5 – 20% (o más) de las pentosas xilosa y arabinosa. La xilosa es por mucho, la pentosa más abundante, mientras que la arabinosa puede representar alrededor de 14-15% en rastrojo de maíz y salvado de trigo (Hahn-Hägerdal *et al.* 2008).

Los microorganismos más comúnmente usados en la industria para la producción de etanol o lactato (e.g. *Saccharomyces cerevisiae* o bacterias ácido-lácticas); no son adecuados para la fermentación de hidrolizados de hemicelulosa debido a su limitada o nula capacidad de fermentar las pentosas. Por lo tanto, se

han seguido diversas estrategias para obtener nuevos biocatalizadores que puedan fermentar eficientemente las mezclas de azúcares derivadas de la hidrólisis de la lignocelulosa.

3.3 Ingeniería de vías metabólicas para la producción de lactato y etanol

La producción de etanol o de lactato basada en lignocelulosa no es una tecnología simple: una vez que la materia prima se trata para liberar los azúcares fermentables, se lleva a cabo una fermentación de azúcares mixtos en presencia de compuestos inhibitorios como ácidos orgánicos de bajo peso molecular, derivados de furanos, así como de compuestos fenólicos e inorgánicos que se liberan durante el pretratamiento e hidrólisis de la materia prima. Algunos investigadores han citado las características requeridas para un microorganismo adecuado para la industria, en particular para la producción de etanol, pero que aplican también para la producción de lactato a partir de hidrolizados de lignocelulosa; tales características son: 1) altos rendimientos 2) alta tolerancia al metabolito de interés y a los inhibidores, 3) crecimiento robusto y requerimientos nutricionales simples y 4) condiciones de pH y temperatura compatibles con el proceso de sacarificación (Dien *et al.* 2003). Mientras que ninguna cepa cumple todos los requerimientos citados, se han logrado grandes avances en el desarrollo de microorganismos prometedores para la industria.

Al ser la xilosa la pentosa más abundante en la lignocelulosa, varios grupos han dirigido su trabajo hacia capacitar a distintos microorganismos para fermentar xilosa eficientemente. Entre los microorganismos que fermentan naturalmente xilosa se encuentran bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

Para la producción de etanol los acercamientos más exitosos hasta ahora son: 1) aislamiento de levaduras que fermentan xilosa, que desafortunadamente tienen bajas productividades; 2) ingeniería de vías metabólicas de microorganismos que fermentan pentosas como *Escherichia coli* y otras bacterias Gram negativas; y 3) ingeniería de vías metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* para la utilización de pentosas (Figura 4).

Las bacterias más prometedoras para la explotación industrial son *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Zymomonas mobilis*. Mientras que *Z. mobilis*, que no posee la capacidad de metabolizar pentosas, se ha manipulado para metabolizar la

arabinosa y la xilosa (Mohagheghi *et al.* 2002); *E. coli* (Ingram *et al.* 1987) y *K. oxytoca* (Burchhardt & Ingram 1992), que fermentan naturalmente un amplio espectro de azúcares se han habilitado para producir etanol al introducir los genes etanologénicos de *Z. mobilis*. Una vez capacitados estos microorganismos para producir etanol a partir de mezclas de azúcares, el siguiente reto consiste en mejorar el rendimiento de las cepas modificadas.

En el caso de levaduras, las primeras cepas de *S. cerevisiae* desarrolladas para metabolizar pentosas se generaron al introducir los genes de *Pichia stipitis* que codifican las enzimas que metabolizan xilosa (Kötter & Ciriacy 1993). Más tarde, se construyeron cepas de *S. cerevisiae* con genes de *Thermus thermophilus* (Walfridsson *et al.* 1996) y *Piromyces sp.* (Kuyper *et al.* 2003) que codifican para xilosa isomerasa. Con *S. cerevisiae* se han tenido que aplicar diversas estrategias de ingeniería de vías metabólicas para incrementar los flujos de utilización de pentosas y para evitar el uso de componentes complejos en el medio (Hahn-Hägerdal *et al.* 2008). La coproducción de xilitol, bajas velocidades de producción de etanol, requerimiento de oxígeno y fuentes de carbono co-metabolizables son aún aspectos a resolver con las cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Jeffries & Jin 2004).

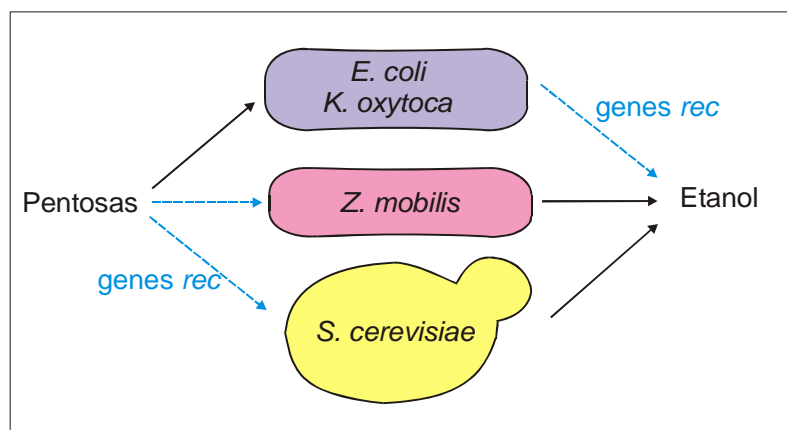


Figura 4. Cepas modificadas por ingeniería de vías metabólicas (tomado de Hahn-Hägerdal *et al.* 2006) Líneas punteadas: genes recombinantes.

De manera similar, aún cuando muchos microorganismos producen ácido láctico, para la producción industrial de lactato se emplean comúnmente bacterias ácido-lácticas como especies de *Lactobacillus* debido a su alta tolerancia a pHs bajos y susceptibilidad de ser modificada genéticamente para la producción selectiva de los isómeros ópticamente puros D(-) o L(+). Sin embargo las bacterias

ácido lácticas tienen características inconvenientes, tales como requerimiento de nutrientes complejos, lo cual eleva los costos de producción en un 30%, que además complica la recuperación del ácido, aunado a su baja o nula capacidad para fermentar pentosas. Algunos hongos productores de ácido láctico como *Rhizopus oryzae* pueden utilizar pentosas pero tienen muy bajas productividades. La producción de mezclas racémicas de D y L lactato también es frecuente en las bacterias ácido-lácticas. Se han estado explorando otros microorganismos, los cuales incluyen *Rhizopus*, *Bacillus*, *E. coli*, *Saccharomyces*, y *Kluyveromyces*. Cepas modificadas de *E. coli* han probado ser excelentes plataformas para convertir mezclas de hexosas y pentosas en isómeros de ácido láctico ópticamente puros (Dien *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2003b, Zhou *et al.* 2003a).

La tecnología basada en el uso de lignocelulosa para la producción de etanol y lactato se encuentra aún a nivel laboratorio y es difícil la comparación de las cepas desarrolladas hasta ahora, debido a las diferencias reportadas en los trabajos de investigación con respecto a las condiciones de la fermentación, el tipo de materia prima y las condiciones de tratamiento e hidrólisis de la misma (Hahn-Hägerdal *et al.* 2008). Sin embargo las cepas etanológicas y homolácticas de *E. coli* presentan varias ventajas y representan hasta ahora una de las mejores opciones para el desarrollo de esta tecnología.

Las ventajas de *E. coli* son: 1) capacidad de metabolizar naturalmente pentosas y ácidos urónicos; 2) no requiere factores de crecimiento complejos; 3) facilidad de cultivo; 4) amplio conocimiento de sus rutas metabólicas y disponibilidad de técnicas para su manipulación genética; 5) previo uso industrial en la producción de proteínas recombinantes, de hecho *E. coli* es uno de los hospederos más utilizados para la biosíntesis de productos recombinantes; 6) en general, ha resultado menos complejo introducir las vías de formación de lactato o etanol en *E. coli*, que capacitar a *S. cerevisiae* o *Z. mobilis* para metabolizar pentosas, en parte porque implica la introducción de menos genes heterólogos y por otro lado porque se tiene mayor conocimiento de la fisiología *E. coli*; 7) por último, es importante señalar que trabajar con *E. coli* genera la posibilidad de integrar dos procesos muy similares para producir tanto etanol como lactato en una bio-refinería

Las principales desventajas de *E. coli* frente al uso de levaduras y otras bacterias son: 1) no es un microorganismo reconocido generalmente como seguro (no GRAS); 2) requiere cultivo aséptico; 3) las condiciones de pH y temperatura de

cultivo no son compatibles con las de celulasas, por lo que no sería posible un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF).

Aún cuando se ha avanzado en la obtención de etanol y lactato por fermentación, quedan muchos retos para obtener una tecnología limpia que permita producirlos de manera sustentable y sin aumento en la emisión de gases con efecto invernadero. En particular, el etanol puede convertirse en una opción interesante a medida que la humanidad se acerque al fin de otras fuentes de energía como el petróleo o el gas natural.

4 ANTECEDENTES

4.1 *Rutas metabólicas de E. coli.*

E. coli es un organismo anaerobio facultativo que puede operar bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, su metabolismo energético en cada condición diverge en el destino que toma el piruvato obtenido durante la glucólisis (Clark 1989). Posee diferentes rutas catabólicas que la capacitan para conservar energía eficientemente bajo un amplio rango de condiciones redox.

En presencia de oxígeno u otros aceptores de electrones (como nitrato, fumarato o dimetil-sulfóxido), la reoxidación de NAD⁺, ocurre en la cadena respiratoria. En cambio, en ausencia de aceptores de electrones, la síntesis de ATP solamente ocurre a nivel de fosforilación del sustrato. Bajo tales condiciones *E. coli*, fermenta a la glucosa, y excreta productos de lo que se conoce como fermentación de ácidos mixtos.

La permanencia de la síntesis de ATP vía la glucólisis es el requerimiento básico para el crecimiento de la célula en dichas condiciones, por lo que el objetivo clave de la fermentación es el reciclamiento de NADH a través de la conversión del piruvato en productos específicos tales como etanol, acetato, lactato, succinato y formato (o CO₂ y H₂) (Clark 1989). La velocidad relativa de formación de estos productos está gobernada por la necesidad de alcanzar una condición redox neutra (Alexeeva *et al.* 2000).

Las dos principales rutas en *E. coli* para la formación de productos de fermentación terminales son: la conversión directa de piruvato en D-lactato, la cual ocurre mediante una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH), y el rompimiento del piruvato en acetil coenzima A y formato por acción de la piruvato formato liasa (PFL) con la consecuente conversión de acetil coenzima A a cantidades aproximadamente iguales de etanol y acetato (Figura 5; Böck & Sawers 1996).

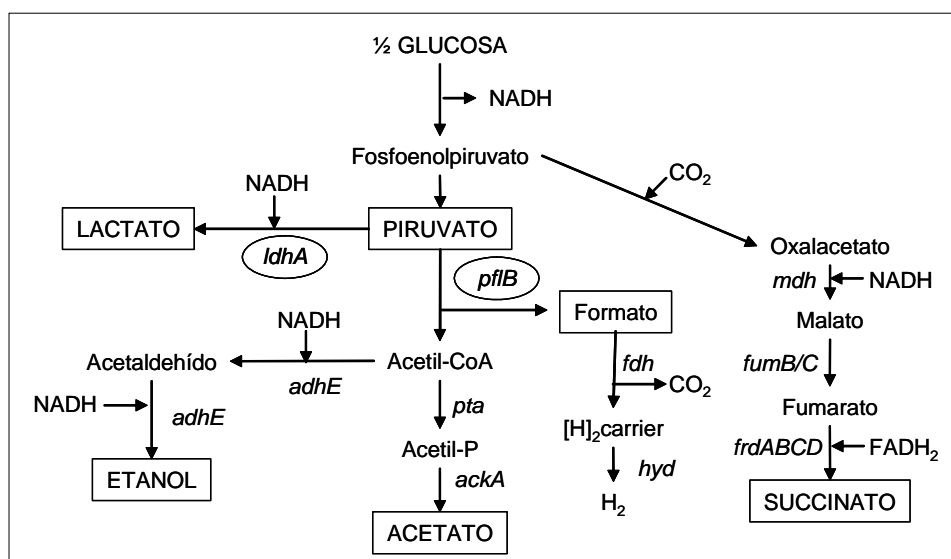


Figura 5. Rutas fermentativas de *E. coli*. Las enzimas codificadas por los genes indicados son: acetato-cinasa (*ackA*), alcohol deshidrogenasa (*adhE*), formato deshidrogenasa (*fdh*) fumarato reductasa (*frdABCD*), fumarasa A y B (*fumA/B*), lactato deshidrogenasa (*ldhA*), malato deshidrogenasa (*mdh*), piruvato formato liasa (*pflB*), fosfotransacetilasa (*pta*).

4.1.1 *E. coli* no-fermentativa.

El grupo de David Clark (Southern Illinois University) aisló una cepa de *E. coli* deficiente en las enzimas LDH y PFL (Bunch *et al.* 1997, Mat-Jan *et al.* 1989). Esta cepa es incapaz de crecer en medios carentes de oxígeno, puesto que no puede regenerar el NAD^+ mediante la reducción de piruvato a lactato u otros productos de fermentación. Este tipo de cepas se denominan “no fermentativas” por su incapacidad de crecer en ausencia de oxígeno.

Las cepas no fermentativas han sido aplicadas con éxito para estudios que tienen como objetivo disminuir los efectos negativos que provocan las condiciones oscilantes de oxígeno disuelto en tanques agitados a gran escala (Lara *et al.* 2006). Lara y colaboradores reportaron una triple mutante (*E. coli* VAL24) con *ldhA* y *pflB* eliminadas y *poxB* inactivada (que codifica la piruvato oxidasa) para demostrar que aunque *E. coli* responde rápidamente a las fluctuaciones de TOD (tensión de oxígeno disuelto) desviando sus flujos metabólicos hacia las vías fermentativas, tales rutas pueden ser eliminadas puesto que no son necesarias para la sobrevivencia de la bacteria durante los cortos tiempos de anaerobiosis que se presentan en los cultivos a gran escala. Este acercamiento abre nuevas posibilidades para diseñar cepas modificadas en sus vías metabólicas, con menor

sensibilidad hacia los gradientes de TOD y mejor desempeño bajo las condiciones típicas de los cultivos a gran escala.

Al complementar cepas deficientes en LDH y PFL con una vía de regeneración de NAD^+ , recuperan la capacidad de crecer en anaerobiosis. Por estas características, estas cepas no-fermentativas han tenido una obvia utilidad para localizar actividades de LDH en bancos genómicos, seleccionando por complementación del crecimiento anaerobio. Así se ha aislado a: D-LDH de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Bernard *et al.* 1991); D-LDH de *E. coli* (Bunch *et al.* 1997); L y D - LDH de *Pediococcus acidilactici* (Garmyn *et al.* 1995a, Garmyn *et al.* 1995b); L-LDH de *Thermotoga maritima* (Ostendorp *et al.* 1993); L-LDH de *Streptococcus bovis* (Wyckoff *et al.* 1997), L-LDH de *Rhizopus oryzae* (Skory 2000), entre otras.

Estas cepas no fermentativas también han sido de especial utilidad para producir metabolitos de interés sin la formación de otros ácidos orgánicos que representan subproductos indeseables. Se ha obtenido 1-2 propanediol (Altaras & Cameron 2000) y succinato al complementar con la enzima málica (Hong & Lee 2000, Stols & Donnelly 1997), o con la enzima piruvato carboxilasa (Vemuri *et al.* 2002).

El grupo de Bothast (National Center for Agricultural Utilization Research, USDA) ha complementado cepas no fermentativas para producir eficientemente lactato (Dien *et al.* 2001, Dien *et al.* 2002) y etanol, (Dien *et al.* 1998, Hespell *et al.* 1996). Las cepas no-fermentativas confieren además estabilidad en condiciones anaerobias a los genes heterólogos que codifican a las enzimas fermentativas, ya que son seleccionados positivamente, puesto que la pérdida de estos genes impide que el crecimiento continúe (Hespell *et al.* 1996).

En los trabajos citados anteriormente se comprobó que la recuperación del equilibrio redox, también recupera el crecimiento anaerobio. Con estas cepas no fermentativas complementadas, se logró una producción eficiente de metabolitos, e incluso en algunos reportes se puede relacionar una mayor expresión de la enzima recombinante que regenera NADH, con un incremento en la velocidad de consumo de glucosa (Stols & Donnelly 1997). Sin embargo en ninguno de estos trabajos se identificó una relación directa entre la regeneración del cofactor por la enzima recombinante y la velocidad del crecimiento bacteriano. Esta última propiedad es importante para el desarrollo de un eficiente método de selección.

4.2 Ingeniería de vías metabólicas en *E. coli* para la producción de etanol.

La construcción de cepas para producir selectivamente etanol (Ingram *et al.* 1987) fue una de las primeras aplicaciones exitosas de la ingeniería de vías metabólicas. Como se menciona arriba, *E. coli* posee una ruta de formación de etanol diferente a la ruta homoetanológica característica de las levaduras y *Z. mobilis* que convierten eficientemente piruvato en etanol por acción de PDC y ADH.

En 1987 el grupo de L.O. Ingram de la Universidad de Florida reportó la transformación de *E. coli* con un plásmido que expresa los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis* con lo que consiguieron dirigir el flujo de carbono preferencialmente hacia etanol. Además, los genes *pdc* y *adhB* se co-expresaron bajo el control de un promotor *lac*, y nombraron a la construcción el “operón *pet*” (de producción de etanol; Figura 6).

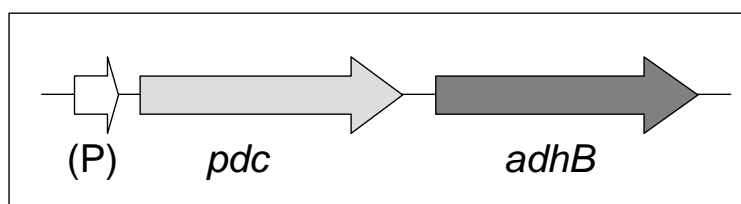


Figura 6. Operón *pet*

Las primeras cepas recombinantes de *E. coli* para la producción de etanol, dependían de la expresión en plásmido de los genes *adh* y *pdc*, lo que puede resultar en una inestabilidad genética inapropiada para su uso en fermentaciones industriales. Por lo tanto, para estabilizar las cepas Ingram y colegas integraron los genes en el cromosoma de la cepa ATCC11303 (*E. coli* B, que es una cepa prototrófica) (Ohta *et al.* 1991). El operón *pet* junto con el gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) se insertó interrumpiendo el gen de la piruvato formato liasa (*pflB*) en un intento por eliminar una enzima que compite por el piruvato. La estrategia que se siguió para incrementar la expresión de *adh* y *pdc* fue seleccionar en medios con concentraciones elevadas de cloranfenicol, y finalmente, se seleccionaron cepas hiper-resistentes e hiper-productoras de etanol. Además, se eliminó la producción de succinato al eliminar el gen terminal de la ruta, fumarato reductasa (*frd*). La cepa final (*E. coli* KO11) fue capaz de convertir glucosa y xilosa en etanol en medios ricos con rendimientos arriba del

100% teórico. El etanol extra se obtuvo de otros carbohidratos presentes en el medio que no fueron tomados en cuenta para el balance final.

La cepa *E. coli* KO11 se ha evaluado para la fermentación de hidrolizados de hemicelulosa de diversas fuentes. Esta cepa fermenta glucosa, xilosa y arabinosa con buenos rendimientos y productividades (Hahn-Hägerdal *et al.* 1994). Además tolera concentraciones relativamente altas de inhibidores presentes en hidrolizados. Este es uno de los pocos microorganismos que fermentan eficientemente arabinosa en etanol (Dien *et al.* 1998). Sin embargo, se ha reportado que KO11 es fenotípicamente inestable cuando se cultiva repetidamente en lote o en continuo, en ausencia de antibiótico (Lawford & Rousseau 1995, Lawford & Rousseau 1996).

Hespell y colaboradores construyeron cepas productoras de etanol usando como cepa parental a mutantes de *E. coli* no fermentativas (*pflB*⁻ *ldhA*⁻) transformándolas con plásmidos que contienen el operón *pet* (Dien *et al.* 1998, Hespell *et al.* 1996). Las cepas obtenidas produjeron selectivamente etanol a partir de arabinosa, glucosa o xilosa, además, las construcciones son muy estables en ausencia de antibióticos. Estas cepas se han usado para fermentar hidrolizados de materiales lignocelulósicos con buenos rendimientos y altas productividades puesto que los tiempos de fermentación son de 36-60 h (Dien *et al.* 1999, Dien *et al.* 2000).

Más adelante, se construyeron variantes de estas cepas sin represión por glucosa puesto que tienen una mutación en el sistema de la fosfotransferasa (*ptsG*⁻) (Nichols *et al.* 2001). Estas cepas tienen la capacidad de utilizar simultáneamente arabinosa, glucosa y xilosa. Sin embargo, las cepas *ptsG*⁻ también inactivan el transporte activo de glucosa de *E. coli*; como resultado, crecen más lento y son más sensibles que las cepas FBR a inhibidores presentes en los hidrolizados (Dien *et al.* 2003).

La cepa *E. coli* KO11, es hasta ahora, una de las mejores construcciones para la producción de etanol, ha sido constantemente estudiada por el grupo de Ingram para mejorar las condiciones de crecimiento y permitir que tolere concentraciones altas de inhibidores (Martinez *et al.* 1999, Underwood *et al.* 2002a, Underwood *et al.* 2002b).

Aún cuando se ha avanzado en la obtención de nuevas cepas de *E. coli* para producir etanol por fermentación aún quedan muchos retos para obtener una tecnología limpia que permita producirlo de manera sustentable y sin aumento en

la emisión de gases con efecto invernadero.

4.3 Piruvato descarboxilasa

La PDC es la enzima clave en todas las vías homo-fermentativas de producción de etanol (Neale *et al.* 1987b). Cataliza la descarboxilación no oxidativa del piruvato que produce acetaldehído usando pirofosfato de tiamina y magnesio como cofactores (Figura 7). Esta reacción ocurre en el C2 del anillo tiazolio del cofactor pirofosfato de tiamina. El acetaldehído es posteriormente reducido a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Las enzimas ADH se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Reid & Fewson 1994). Mientras que PDC es común solamente en plantas, levaduras y hongos, no se encuentra en animales y es rara en procariones. PDC solo se ha encontrado en 4 bacterias: *Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*, *Acetobacter pasteurianus* y *Zymobacter palmae* (Chandra Raj *et al.* 2002).

La PDC también cataliza una reacción de condensación aldólica en la cual el intermediario “acetaldehído activo” unido a la enzima se condensa con un segundo aldehído. A esta reacción se le llama actividad carboligasa. Cuando se condensa con acetaldehído se forma acetoína; y con benzaldehído se forma (R) fenil acetil carbinol que es un importante intermediario para la síntesis de L-efedrina. Dada la importancia de estos productos, varios grupos han intentado optimizar la reacción carboligasa por mutagénesis sitio dirigida. (Chang *et al.* 1999a, Chang *et al.* 2000, Goetz *et al.* 2001, Huang *et al.* 2001, Killenberg-Jabs *et al.* 1997, Pohl 1997, Wu *et al.* 2000).

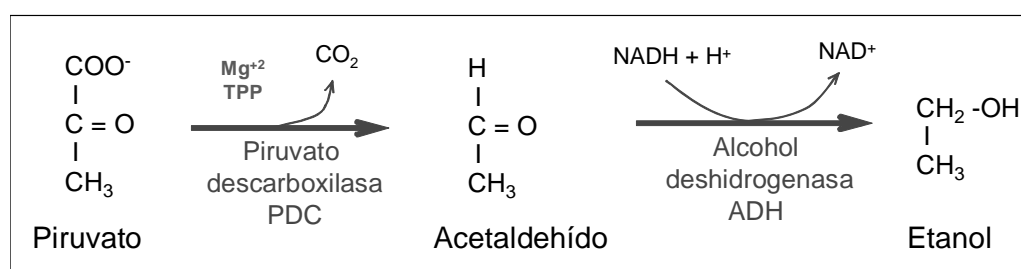


Figura 7. Ruta de formación de etanol por acción de PDC y ADH.

Tres laboratorios independientes purificaron la PDC de *Z. mobilis*, generaron anticuerpos, clonaron y secuenciaron el gene *pdh* que codifica para esta enzima

(Brau & Sahm 1986, Conway *et al.* 1987, Neale *et al.* 1987a).

La PDC de *Z. mobilis* tiene una actividad específica descarboxilasa de 100 U/mg_{prot} y un Km 0.4 mM (Chandra Raj *et al.* 2001). Sus propiedades catalíticas son mejores que las encontradas en las PDC de levadura (Vmax 40 –60 U/ mg_{prot} y Km 2.2 mM, (Konig *et al.* 1990)) y de eucariontes (Pohl 1997). Otra bacteria, *Zymobacter palmae*, también posee una PDC con mejores propiedades catalíticas que las enzimas de levaduras y eucariontes, e incluso es ligeramente mejor que la PDC de *Z. mobilis* con una Vmax de 130 U/mg_{prot} y un Km de 0.24 mM (Chandra Raj *et al.* 2002).

La PDC de *Z. mobilis* es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas consiste de 568 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 60 kDa (Bringer-Meyer & Sahm 1988, Neale *et al.* 1987b). A pH óptimo (6.0), cada subunidad une un juego de cofactores (pirofosfato de tiamina, e iones de Mg²⁺), que a pesar de ser una unión muy fuerte no es covalente. Los cofactores estabilizan la estructura cuaternaria en un amplio rango de pH. Solamente las PDC de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Zymomonas mobilis* se han caracterizado a detalle y se cuenta con la estructura cristalográfica de ambas (Arjunan *et al.* 1996, Dobritsch *et al.* 1998). Varios residuos importantes para la catálisis han sido identificados a través de diversos trabajos de mutagénesis sitio-dirigida (Candy & Duggleby 1998, Wu *et al.* 2000).

4.4 Producción de ácido láctico

El ácido láctico es un importante producto final de la fermentación bacteriana de glucosa y otros carbohidratos, el nombre del ácido es derivado del latín *lac*, *lactis* que significa leche puesto que cuando la leche se agria naturalmente, la lactosa usada por las bacterias es convertida principalmente en lactato. El ácido láctico es un compuesto químico versátil ampliamente usado: 1) como acidulante, saborizante y conservador en las industrias farmacéutica, de alimentos, peletera y textil, 2) para la producción de químicos base y 3) para la producción del polímero biodegradable ácido poliláctico (PLA). El ácido láctico existe en dos formas enantioméricas D(-) y L(+). Ambas formas isoméricas pueden ser polimerizadas obteniendo polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición. De las 80 000 toneladas de ácido láctico producidas por año en todo el mundo, cerca del 90% es producido por fermentación bacteriana y el resto se produce sintéticamente mediante la hidrólisis de lactonitrilo (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal

2000).

La pureza enantiomérica es importante para los diferentes usos industriales, y es el isómero L(+) el que tiene mayor demanda. La producción por fermentación ofrece la ventaja de que al seleccionar el microorganismo adecuado que produzca uno de los isómeros, se obtienen isómeros ópticamente puros mientras que por métodos químicos se generan mezclas racémicas. Además, por métodos biológicos se pueden emplear recursos renovables como sustratos, tal como el almidón o la celulosa (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal 2000).

Los mayores problemas asociados con la producción de ácido láctico por fermentación han sido los requerimientos nutricionales complejos de las bacterias ácido-lácticas que incrementan en un 35% el costo de producción y la inhibición por producto (Singh *et al.* 2006).

Muchas especies forman lactato, y son frecuentes las fermentaciones mixtas. *E. coli* forma de 1 a 0.8 mol de lactato a partir de 1 mol de glucosa.

Los principales géneros de bacterias que forman lactato son colectivamente llamadas bacterias ácido-lácticas y comprenden los géneros a) *Streptococcus* y *Pediococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*, todas ellas convierten al menos un 85% de la glucosa consumida en lactato (homofermentativas) y b) el género *Leuconostoc* y las restantes especies de *Lactobacillus*, las cuales forman tan solo 1 mol de lactato por cada mol de glucosa usada; y el resto puede ser CO₂, acetato o etanol (bacterias heterofermentativas).

La producción de ácido láctico tomó relevancia con el descubrimiento del ácido poliláctico (PLA), desde entonces la demanda ha ido aumentando rápidamente. Se espera que el polímero biodegradable, producido a partir de materias renovables, vaya reemplazando a varios polímeros derivados del petróleo en diversas aplicaciones (Singh *et al.* 2006).

El PLA es un plástico versátil, biodegradable y no tóxico para el cuerpo humano, ni para el ambiente. Se ha utilizado en materiales biomédicos para la regeneración de tejidos; en matrices para sistemas de dosificación de medicamentos, y como alternativa de materiales poliméricos de aplicación comercial, reduciendo el impacto al ambiente. Las propiedades físicas y de biodegradabilidad del PLA dependen de la proporción de los enantiómeros L(+) y D(-); además de las condiciones de polimerización. Por lo tanto, para controlar estas características se requiere emplear isómeros L(+) y D(-) ópticamente puros.

La mayor proporción en los plásticos corresponde al isómero L(+), por lo que existe mayor demanda de éste (Zhou *et al.* 2003a).

Aún cuando se han logrado avances en la capacitación de bacterias ácido lácticas para la utilización de pentosas, su productividad es muy baja (Dien *et al.* 2001). Con cepas de *E. coli* modificadas por ingeniería de vías metabólicas, se ha avanzado rápidamente para la producción del metabolito a partir de diversas fuentes de carbono.

Dien y colaboradores reportaron la producción de L(+) lactato al transformar una cepa de *E. coli* no fermentativa con el gen que codifica la L(+)-LDH de *Streptococcus bovis* (Dien 2001). Usando las cepas FMJ39 y NZN111 del grupo de Clark; obtuvieron rendimientos cercanos al 60 % del teórico máximo, usando glucosa o xilosa como fuente de carbono. Reportan además otra cepa no fermentativa construida a partir de *E. coli* B que crece a mayor velocidad y por lo tanto lograron obtener mayores productividades (Dien *et al.* 2001).

Posteriormente el mismo grupo logró aumentar la eficiencia de transformación de mezclas de glucosa y xilosa al modificar las mismas cepas no fermentativas, eliminando además *ptsG* (Dien *et al.* 2002).

Algunas otras cepas de *E. coli* modificadas en diversas rutas (de formación de acetato y otros metabolitos, e.g. *ack*, *pta*, *adh*) se han empleado con éxito, al redirigir el flujo de carbono hacia la formación de lactato. (Chang *et al.* 1999b, Zhou *et al.* 2003b, Zhou *et al.* 2003a)

4.5 Lactato deshidrogenasa

Las bacterias homofermentativas usan la ruta Embden-Meyerhof y en el paso final, convierten el piruvato en lactato y regeneran NAD^+ a partir del NADH que se forma en los pasos previos (Figura 8). En las bacterias heterofermentativas, aún cuando se forman otros metabolitos, la conversión de piruvato a lactato es también el mayor paso para la regeneración de NAD^+ . Todas las bacterias ácido-lácticas tienen por lo tanto una gran cantidad de lactato deshidrogenasa ligada a NAD (nLDH). Estas enzimas son citoplasmáticas. El piruvato se convierte en L(+) o D(-) lactato por diferentes enzimas (EC. 1.1.1.27 y EC. 1.1.1.28, respectivamente).

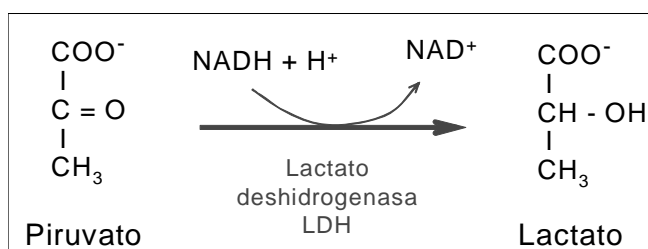


Figura 8. Ruta de formación de lactato por acción de LDH.

Otras bacterias diferentes a las bacterias ácido-lácticas también cuentan con nLDH's aunque son de menor importancia para la sobrevivencia de estas especies que no están restringidas al uso de carbohidratos para el crecimiento y obtención de energía, e.g. enterobacterias, estafilococos y el género *Bacillus*. (Garvie 1980).

Otro tipo de LDH, que no usa NAD/NADH como cofactor, se encuentra en una variedad de bacterias. Tales enzimas se conocen como NAD-independientes (iLDH's) y tienen diferentes funciones en cada especie. Convierten lactato en piruvato y existe poca evidencia de que la reacción inversa ocurra *in vivo* o *in vitro*.

Las n-LDH's deben verse como enzimas clave en la producción de energía para el amplio e importante grupo de bacterias ácido-lácticas. Un análisis de las características y función de las nLDH's en muchas especies diferentes contribuirá al entendimiento del efecto que las bacterias tienen en su ambiente y en los otros organismos con quienes cohabitan (Garvie 1980).

Los estudios de estas enzimas son escasos y generalmente los datos solo han sido reportados por un laboratorio. *E. coli* posee una enzima soluble ligada a NAD/NADH que convierte el piruvato a D(-) lactato, esta enzima LDH se activa alostéricamente por piruvato y está bien caracterizada (Tarmy & Kaplan 1968). Por otro lado, *Bacillus subtilis* posee una enzima que es específica para la formación de L(+) lactato, también dependiente de NAD (Yoshida 1965), que a diferencia de la LDH de *E. coli* no se activa por sustrato, y dentro de la clasificación de las L(+) LDH's, pertenece al grupo que se activa por 1,6-FDP (1-6, fructosa difosfato).

La L(+)LDH de *B. subtilis* (codificada por *lctE*) es un homotetrámero de 140 kDa, comparte un 65% de identidad con la L(+)LDH de *B. stearothermophilus*, esta última se ha estudiado ampliamente y se cuenta con su estructura cristalográfica (Schar *et al.* 1982).

4.6 Evolución dirigida

La evolución dirigida se refiere a la manipulación *in vitro* del gen con el fin de obtener una versión mejorada de la proteína codificada, imitando el proceso de evolución natural. Las técnicas de evolución dirigida representan el método más versátil para ajustar las propiedades de las proteínas a las necesidades de las aplicaciones industriales, así como para elucidar relaciones estructura-función. Inspirado por un experimento de Spiegelman y colaboradores (Mills *et al.* 1967) quienes introdujeron el concepto de “evolución en tubo de ensayo”, hemos visto en los últimos años el florecimiento de la evolución dirigida de proteínas. Los casos exitosos que se reportan incluyen al campo de las biotransformaciones para síntesis química, biosensores, biorremediación, vacunas, proteínas terapéuticas, estudios de estructura-función y muchos otros (Wong *et al.* 2006). La reciente popularidad de los enfoques de evolución dirigida se debe a dos razones principales: 1) muchos de los intentos por mejorar enzimas mediante diseño racional han fallado debido al aún limitado entendimiento que se tiene de la relación estructura-función de las proteínas; 2) el desarrollo reciente de las técnicas de biología molecular ha incrementado en gran medida la versatilidad y éxito de los experimentos de evolución dirigida.

El proceso consiste típicamente de tres pasos básicos desarrollados en forma iterativa: a) generación de diversidad genética mediante mutagénesis *in vitro* (aunque también se puede partir de la biodiversidad natural); b) selección o tamizaje de la proteína; y c) amplificación o reproducción de las ganadoras. Si se añade un paso combinatorio extra, el proceso de evolución puede avanzar más rápidamente. Mediante la recombinación de dos o más secuencias parentales, se pueden acumular mutaciones benéficas, así como eliminar mutaciones deletéreas.

Cada paso de las técnicas de evolución dirigida enfrenta retos particulares: a) el reto de la diversidad: como crear diversidad sin sesgo y cómo explorar el mayor número de las variantes generadas; b) el reto de la recombinación: como barajar secuencias de DNA con identidades debajo del 60% y c) el reto de la selección: el sistema de tamizaje o selección representa el corazón de cada experimento de evolución dirigida; un método valioso es aquel que permite un alto rendimiento a bajo costo, que es confiable y reproducible. Eliminar mutantes inactivas incrementa la probabilidad de éxito, por lo que esquemas de selección son preferibles que aquellos no selectivos.

4.6.1 Generación de diversidad

Los métodos para generar mutaciones aleatorias en los genes pueden dividirse en 3 categorías, dependiendo del método empleado para generar las substituciones en los nucleótidos. La categoría 1 se refiere a los métodos basados en enzimas como las técnicas de mutagénesis *in vitro* con DNA polimerasas y enzimas que modifican al DNA (ligasas, enzimas de restricción o nucleasas). Un ejemplo de esta categoría es la PCR propensa a errores (error-prone PCR). La categoría 2 comprende los métodos químico-sintéticos, como la generación mutaciones por medio de síntesis basada en oligonucleótidos; y los métodos que emplean análogos de nucleótidos o compuestos que modifican al DNA. La categoría 3 incluye métodos que involucran el uso de células completas, como los métodos de mutagénesis aleatoria *in vivo*, el uso de cepas mutadoras o proteínas mutadoras para generar mutaciones en el organismo hospedero (Wong *et al.* 2006).

4.6.1.1 PCR sexual

El DNA shuffling o también llamado PCR sexual inventado en 1994 por W. P. Stemmer dio origen a una nueva etapa de la evolución dirigida (Stemmer 1994). El PCR sexual introduce el mecanismo de recombinación de alelos que permite la fijación y combinación de mutaciones benéficas, así como la segregación de las deletéreas. El fundamento del PCR sexual se puede describir de la siguiente forma. Una población de genes con mutaciones puntuales (o bien de un solo gen al que se le introducen las mutaciones durante el proceso) se fragmenta al azar digiriendo con DNAsal. Posteriormente se aíslan los fragmentos de 100 a 300 pares de bases y se someten a una reacción de PCR sin iniciadores que consiste en las tres etapas de una reacción común de PCR. El primer paso es la desnaturalización del DNA por un incremento de temperatura, el segundo paso es la hibridación a baja temperatura de los fragmentos de cadena sencilla que participan como templado e iniciadores a la vez. Finalmente se incrementa la temperatura para activar la DNA polimerasa que extiende los extremos 5' del DNA utilizando la otra hebra de DNA como templado, permitiendo la recombinación de alelos y la introducción de nuevas mutaciones preferentemente al inicio de la extensión. Los extremos 3' permanecen sin cambios. Estos tres pasos se repiten de manera iterativa.. El tamaño promedio de los fragmentos de DNA se incrementa cada ciclo hasta obtener fragmentos del tamaño original que se amplifican en una nueva reacción de PCR agregando oligonucleótidos específicos

a los extremos. Los genes obtenidos habrán adquirido nuevas mutaciones además de haberse recombinado las mutaciones de los genes parentales. Durante el proceso de reensamblaje se puede controlar la tasa de mutagénesis, dependiendo del tamaño de los fragmentos en la reacción sin iniciadores; así como de la fidelidad de la DNA polimerasa utilizada (Stemmer 1994).

4.6.2 Selección y tamizaje de variantes.

Una vez generada la diversidad, el cúmulo de genes obtenidos se expresa en un organismo hospedero y se examina cada uno en busca de la función deseada. La identificación de la enzima con las propiedades deseadas puede alcanzarse mediante estrategias de selección o tamizaje. La selección parte de un sistema adecuado en el cual la presencia de la actividad catalítica proporciona una ventaja de crecimiento al microorganismo que la posee. Cuando no es posible la selección (lo cual ocurre en la mayoría de los casos) los microorganismos individuales presentes en la librería deben separarse físicamente para el análisis individual de la catálisis, lo que constituye el laborioso proceso de tamizaje.

Existe una gran variedad de métodos de tamizaje que van desde sencillas reacciones colorimétricas acopladas a la actividad enzimática buscada, formación de halo por degradación de componentes del medio de cultivo en placa; hasta la inmunodetección y la unión específica a moléculas inmovilizadas. Con un buen método selección usualmente se pueden analizar 10^8 variantes, mientras que los métodos de tamizaje a menudo abarcan no más de 10^4 variantes, aún con el uso de robots.

Los métodos de selección para enzimas dependientes de NAD(P)H, tales como las enzimas fermentativas LDH y ADH; hasta ahora sólo se pueden realizar mediante tamizaje. La medición del consumo de NAD(P)H mediante la detección directa de la absorbancia a 340 nm, es ideal para determinar las cinéticas de enzimas purificadas, sin embargo no es adecuado para el análisis directo en colonia. Una opción es la detección fluorimétrica del producto generado después del tratamiento alcalino del NAD(P)⁺ (Tsotsou *et al.* 2002) o al acoplar la reacción de óxido – reducción del NAD(P)H con otra reacción cuyo producto sea detectable por color, como aquellos acoplados a sales de tetrazolio (ElHawrani *et al.* 1996). Algunos esquemas involucran el tamizaje de alto rendimiento (high throughput screening), que es posible de automatizar con el uso de robots, pero sigue siendo un proceso muy laborioso con limitaciones en el tamaño de la población de

variantes que pueden analizarse.

En la reacción de descarboxilación de la PDC tanto el sustrato piruvato como el producto acetaldehído son muy parecidos químicamente, por lo que hasta la fecha no se ha podido encontrar un método de detección específico para alguno de ellos. La única forma que existe para el análisis de variantes de PDC es acoplar la reacción de ADH para la transformación de acetaldehído en etanol. De esta manera se detecta la aparición de NADH. Breuer y colaboradores (Breuer *et al.* 2002) reportaron un método de tamizaje de alto rendimiento para la reacción alterna de la PDC (carboligasa), que convierte al piruvato en (R) fenilacetilcarbinol, acoplando la reacción con la reducción de una sal de tetrazolio.

En el presente trabajo se introduce por primera vez una estrategia de selección basada en la velocidad de crecimiento de la bacteria que a su vez depende de los niveles de expresión o de propiedades catalíticas de una enzima fermentativa que puede aplicarse a cualquier ruta fermentativa que regenere NAD^+ , que hasta ahora solo eran posibles de seleccionar mediante tamizaje.

5 HIPOTESIS

La velocidad de crecimiento en *Escherichia coli* es directamente proporcional a la velocidad de regeneración del NAD⁺ en anaerobiosis, y puede ser usada como criterio de selección de variantes fermentativas mejoradas.

6 Objetivo General:

Desarrollar un sistema de selección para el mejoramiento de enzimas fermentativas mediante el uso de una cepa de *Escherichia coli* carente de *ldhA* y *pflB*.

7 Objetivos Particulares:

1. Obtener una cepa de *Escherichia coli* carente de *ldhA* y *pflB*.
2. Establecer las condiciones del sistema de selección con la PDC de *Zymomonas mobilis* como enzima modelo.
3. Aplicar el método de selección para mejorar la actividad de PDC utilizando evolución dirigida.
4. Retar el método de selección con la L-LDH de *Bacillus subtilis* como enzima modelo.
5. Aplicar el método de selección para mejorar la solubilidad de la L-LDH de *Bacillus subtilis* sobreexpresada en *Escherichia coli*.

8 MATERIALES Y METODOS

8.1 Cepas y plásmidos.

Las características de las cepas y plásmidos usados se resumen en la Tabla 1

Tabla 1. Cepas y plásmidos empleados

	Características relevantes	Referencia
Cepas		
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> (Nal ^R), <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ⁻ F'[traD36 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15, Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene
<i>E. coli</i> W3110	F ⁻ λ ⁻ INV(<i>rrnD-rrnE</i>)1	(Jensen 1993)
<i>E. coli</i> VAL23	<i>E. coli</i> W3110 <i>ldhA</i> - <i>pflB</i> -	Este trabajo
<i>E. coli</i> WVldh-	<i>E. coli</i> W3110 <i>ldhA</i> -	Este trabajo
<i>E. coli</i> WVpfl-	<i>E. coli</i> W3110 <i>pflB</i> -	Este trabajo
Plásmidos		
pLOI510	Derivado de pUC19 que contiene <i>pdC</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> , resistencia a cloranfenicol y ampicilina	(Ohta <i>et al.</i> 1991)
pUCldh	Derivado de pUC19 con <i>lctE</i> de <i>B. subtilis</i>	(Romero <i>et al.</i> 2007)
pTrc99A	Derivado de pKK233-2 con el promotor <i>trc</i> clonado antes del sitio múltiple de clonación y terminador <i>rrnB</i>	Pharmacia Biotech
pKO3	Origen de replicación M3ori y <i>RepA</i> (sensible a temperatura), <i>SacB</i> , y resistencia a cloranfenicol	Figura 9 (Link <i>et al.</i> 1997)
pT4Bla	Promotor de TEM-1 β lactamasa, resistencia a kanamicina, origen de replicación ColE1	Figura 24 (Osuna <i>et al.</i> 2002)
Derivados de pTrc99A		
pTrcPET	Contiene <i>pdC</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i>	Este trabajo (Figura 17)
pTrcPDC	Contiene <i>pdC</i> de <i>Z. mobilis</i>	Este trabajo
pTrcADH	Contiene <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i>	Este trabajo
pTrclctE	Contiene <i>lctE</i> de <i>B. subtilis</i>	Este trabajo
V3	Mutación en la caja -35 del promotor <i>trc</i>	Este trabajo
Derivados de pKO3		
pKO3ldh	Contiene una versión truncada de <i>ldhA</i> de <i>E. coli</i>	Este trabajo
pKO3pfl	Contiene una versión truncada de <i>pflB</i> de <i>E. coli</i>	Este trabajo
Derivados de pT4Bla		
pT4PDCwk	Contiene <i>pdC</i> de <i>Z. mobilis</i> con un RBS débil	Este trabajo
pT4PETwk	Contiene <i>pdC</i> con un RBS débil y <i>adhB</i> con su propio RBS	Este trabajo (Figura 27)

Las cepas se cultivaron en medio rico LB o medio mineral M9 (Sambrook & Russell 2001) suplementando según se indica con: glucosa (Glc); sacarosa (sac); Na₂CO₃; isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), y adicionando según requerimientos con antibióticos: ampicilina (Ap) 0.2 mg/ml; cloranfenicol (Cm) 20 mg/ml; kanamicina (Km) 25 mg/l,

8.2 Técnicas genéticas:

Las transformaciones, construcciones de plásmidos, digestiones de DNA, ligaciones, PCR, electroforesis en gel de agarosa, etc. se realizaron según los procedimientos estándar (Sambrook & Russell 2001).

8.3 Cultivos anaerobios

Para los cultivos anaerobios líquidos, se usaron tubos con rosca de 13 x 100 mm con tapones horadados con sello de hule. Al medio se le eliminó el oxígeno mediante el siguiente procedimiento:

Se prepara en un matraz el medio de cultivo con un exceso de agua del 10% del volumen final, se pone a ebullición manteniendo una corriente de nitrógeno hasta que se evapore el exceso de agua y se deja enfriar sin retirar la corriente de nitrógeno. Una vez frío el medio se transfieren 5 ml del medio a cada tubo; al que previamente se le intercambié el aire por nitrógeno. Los tubos llenos y sellados se esterilizan en autoclave.

Para inocular los tubos, se les pasa una corriente de nitrógeno y se agregan los nutrientes y antibióticos, según se requiera, se agrega el inóculo y se retira la corriente de nitrógeno.

La densidad óptica para estos cultivos se midió directamente del tubo en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch and Lomb).

Los cultivos sólidos anaeróbicos se realizaron en jarras anaeróbicas (Becton Dickinson) con una atmósfera de H₂-CO₂ generada con el kit Gas-Pak® (Becton – Dickinson).

Los cultivos microaerobios se realizaron en fleakers con medio mínimo M9 suplementado con glucosa, ampicilina e IPTG según cada caso.

8.4 Construcción de los bancos *lctE*.

La mutagénesis a saturación en la posición 38 de LDH G38 se realizó por una técnica de mutagénesis basada en PCR (Merino *et al.* 1992) con los siguientes oligonucleótidos: Tail99Nco 5'-AGCCGTGGATCGTGGGCGCCGACATCATAAC-GGTTCTGGC, BsNNG/C 5'-GCTTTTTCTTTATTTAC**S**NNAATGACCACAAGCT-CATCTGTG, (**S**: G ó C; **N**: G, A, T ó C) este primer fragmento se usó como iniciador (megaprimer) junto con los oligonucleótidos Tail20 5'-GGAATAGCCGTGGATCGTGG y EldhBm (descrito arriba) para sintetizar el gene completo *lctE* mutagenizado.

8.5 Aleatorización de *lctE* mediante “error prone PCR”.

Se obtuvo un banco de variantes de *lctE* mediante la técnica de PCR propensa a errores (error-prone PCR) usando el kit comercial GeneMorphII Random Mutagenesis (Stratagene), los oligonucleótidos empleados fueron Tail99Nco (descrito arriba) y Tail-99Hind 5'- AGCCGTGGATCGTGGGGACCACCGCGCT-ACTGCCGCCAGG.

8.6 DNA shuffling o PCR sexual

Se siguió el método reportado por Stemmer (Stemmer 1994) que se describe a continuación.

Preparación del molde. Se amplificó por PCR la secuencia parental con los oligonucleótidos: BpdcNco: 5'-GGAGTAAGCCATGGGTTATACTGTCGGTACC, y EpdcBm: 5'-CGCGCGGATCCCTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGGAGC-TTGTTAAC. Este DNA de doble cadena se purificó para eliminar los iniciadores y se cuantificó.

Digestión con DNAsal. De 2 a 3 μ g del DNA purificado se digirieron en 50 μ l (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 1mM pH 7.4) con DNAsal libre de RNAsa (Roche), a temperatura ambiente, durante 30 min. Para obtener fragmentos de 100 a 300 pb.

Purificación de los fragmentos. El DNA de entre 100 a 300 pb se purificó cortando el barrido de un gel de agarosa.

PCR sin iniciadores. Con el DNA fragmentado y purificado (20 y 30 μ l) se realizó una amplificación por PCR sin iniciadores, con las siguientes condiciones de reacción: 1 ciclo (94°C - 1 min), 10 ciclos (94°C - 1 min, 35°C - 1 min y 72°C - 1

min), 30 ciclos (94°C - 1 min, 50°C - 1 min y 72°C - 1 min) y 1 ciclo (72°C - 5 min).

PCR con iniciadores. Usando directamente el producto de la PCR sin iniciadores como molde, y probando diferentes concentraciones de éste, se realizó una segunda PCR, esta vez usando como iniciadores los oligonucleótidos Bpdc-Nco y EpdcBm, para amplificar un fragmento del tamaño original del gen, es decir, 1.7 kb.

Ligación en el vector. Una vez amplificado el producto de 1.7 kb, se purifica de gel, partiendo de alrededor de 6 reacciones de 100 µl para tener suficiente DNA para clonar en el vector. Este producto se digirió con *Nco*I y *Bam*HI y se purificó por columna. El producto digerido y purificado se ligó al vector pTrcADH previamente digerido y purificado; usando 6000 U de T4 DNA ligasa (New England Biolabs), con una relación molar de 1 a 4 de vector con respecto a inserto. La reacción de ligación se llevó a cabo durante 24 horas a 16°C.

Transformación. Con la reacción de ligación purificada se transformaron células de *E. coli* XL1blue, (por electroporación). Las células se recuperaron durante 1 h a 37°C, en 1 ml de medio SOC (Sambrook & Russell 2001). Para determinar el tamaño del banco, 1 µl de este caldo se sembró en LB-Ap. Con el resto del cultivo se inocularon 10 ml de LB-Ap y se incubó a 30°C durante 10 horas, pasado este tiempo se recuperó el paquete celular del cual se purificó plásmido. Este DNA purificado contiene al banco generado.

8.7 SDS-PAGE

Los extractos celulares de las cepas obtenidas del banco de mutantes se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante siguiendo el método de Laemmli usando SDS al 0.1%. La concentración de acrilamida para los geles de separación y concentración fue de 12% y 3% respectivamente. Las bandas de proteína se revelaron usando una solución de azul de Coomassie.

8.8 Western blot

La detección de las proteínas etiquetadas con poli-histidina se realizó por Western blot siguiendo el procedimiento habitual (Towbin *et al.* 1979) que a continuación se describe brevemente. Las bandas de proteína de los geles de poliacrilamida se transfieren electroforéticamente a una membrana de

nitrocelulosa (a 70 mA⁻ por 1h). La membrana se trata con albúmina sérica bovina (BSA) al 3%, se lava y se incuba con el anticuerpo de ratón Anti-6His C-term (Invitrogen ®), posteriormente se lava y se incuba con un anticuerpo secundario antiratón acoplado a la fosfatasa alcalina (Anti-mouse Alk-phosphatase, Sigma ®), y finalmente se agrega NBT (nitroblue-tetrazolium) para revelar las proteínas marcadas con la etiqueta 6-His.

8.9 Purificación de proteínas etiquetadas con 6-His.

Las proteínas PDC y LDH etiquetadas se purificaron por cromatografía de afinidad usando columnas de níquel (Ni-NTA spin column, Qiagen) en condiciones nativas. Para esto, se sonicó el paquete celular de 20 ml de un cultivo crecido toda la noche en LB adicionado con IPTG 0.05 mM. El paquete se resuspendió en buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) y se sonicó 6 veces por 10 seg con 5 seg de descanso. El paquete lisado se centrifugó a 10,000 x g por 30 min a 4°C.

Se equilibró la columna con 0.6 ml de buffer de lisis y se centrifugó a 700 x g por 2 min. Posteriormente se cargaron en la columna 0.6 ml del paquete lisado y se centrifugó igual que en el paso anterior. Una vez cargada la proteína en la columna, se lavó dos veces haciendo pasar 0.6 ml de buffer de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0) y centrifugando a 700 x g por 2 min. Finalmente se eluyó la proteína con 0.2 ml de buffer de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8.0).

Para purificaciones de mayor volumen (semipreparativas) se usó la misma técnica, pero en vez de columnas "Ni-NTA spin" se empleó resina Ni-NTA también de Qiagen.

8.10 Determinación de actividades:

La determinación de actividad PDC en células se realizó midiendo espectrofotométricamente la desaparición de NADH en una reacción acoplada a ADH mediante una adaptación del método reportado por Hoppner y Doelle (Hoppner & Doelle 1983). El paquete celular se ajusta a 4 DO en amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH 6.5 y se sonica (3 ciclos 10 s por 2 min de descanso), al extracto obtenido se le agregan los cofactores (Mg²⁺ 1 mM y pirofosfato de tiamina 1 mM). La actividad de los extractos se ensaya en celdas de 1 cm, ajustando a un

volumen final de 1 ml con amortiguador de MES 0.05 M – MgCl₂ 0.005 M, pH 6.5, y adicionando NADH 0.15 mM, ADH 10 U, pirofosfato de tiamina 0.1 mM y piruvato 0.1 mM (concentraciones finales). Después de agitar por inversión la mezcla de reacción, se monitorea la absorbancia a 340 nm por 3 minutos (espectrofotómetro DU650 Beckman). Como control se realiza el mismo ensayo sin adicionar ADH.

Para medir actividad ADH, se le agrega al extracto: ácido L-ascórbico 10 mM, Mg²⁺ 2mM y sulfato ferroso de amonio 0.5 mM. La medición se realiza en 1 ml de amortiguador de Tris-HCl 30 mM pH 8.5 usando etanol 0.85 M y NAD⁺ 1 mM como sustratos. Se monitorea la absorbancia a 340 nm por 3 min.

La actividad lactato deshidrogenasa de extractos crudos y proteínas purificadas se midió con amortiguador de Na₂HPO₄ 0.1 M pH 6.5, usando piruvato 10 mM y NADH 0.15 mM como sustratos a 35°C; midiendo espectrofotométricamente la oxidación de NADH a 340 nm.

8.11 Otros procedimientos analíticos:

Los productos de fermentación se analizaron por cromatografía en un equipo de HPLC (Waters) y un detector IR (Waters IR410). Se empleó una columna Aminex HPX-87H (BioRad), usando como fase móvil H₂SO₄ 5mM a un flujo de 0.8 ml/min a 60°C.

La glucosa se midió en un analizador bioquímico YSI y el etanol se analizó por cromatografía de gases (Agilent) usando n-butanol como estándar interno.

9 RESULTADOS Y DISCUSION

9.1 INGENIERIA DE VIAS METABOLICAS

9.1.1 Desarrollo de la cepa *E. coli* VAL23

Una cepa adecuada para evaluar la relación entre la actividad enzimática regeneradora de NAD⁺ y la velocidad de crecimiento bacteriano, es aquella en la que solo la actividad de interés representa la única vía posible de regeneración del NAD⁺. Para esto se decidió construir una cepa no fermentativa partiendo de *E. coli* W3110, que es una cepa usada para la expresión de genes heterólogos. A diferencia de las cepas reportadas (Bunch *et al.* 1997, Mat-Jan *et al.* 1989) se decidió eliminar los genes en lugar de interrumpirlos, puesto que al analizar bancos de mutantes bajo presión de selección se requiere que la cepa sea estable, evitando el riesgo de recuperación de genes interrumpidos.

Partiendo del genoma de *E. coli* W3110, los genes *ldhA* y *pflB* se reemplazaron por un fragmento que contiene una versión truncada de cada gen, usando el vector de reemplazo genético pKO3 que se muestra en la Figura 9 (Link *et al.* 1997).

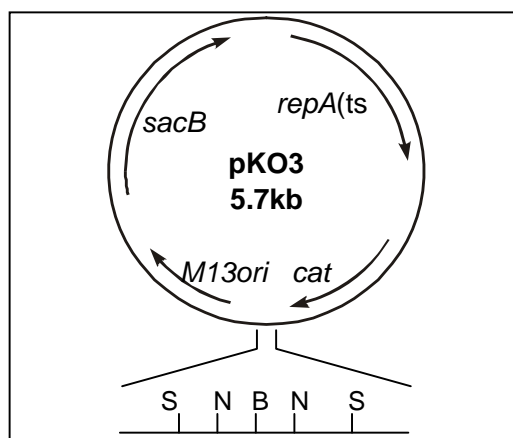


Figura 9. Vector de reemplazo genético pKO3. La región de clonación se muestra ampliada, los sitios de restricción son: B, *Bam*HI; N, *Not*I; S, *Sal*I y Sm, *Sma*I. *sacB*: gen de levansacarasa y *cat*: gen de cloranfenicol acetil-transferasa; *repA*: origen de replicación sensible a temperatura; *M13ori*, origen de replicación del fago M13 (adaptado de Link *et al.* 1997)

El plásmido pKO3 tiene los siguientes atributos: a) un origen de replicación *repA(Ts)* que es inactivo a 42 – 44°C; b) el gen *cat* (que codifica a la cloranfenicol acetil transferasa) de resistencia a cloranfenicol; c) el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* que codifica para la levansacarasa que cataliza la formación de un polímero de

fructosa a partir de sacarosa.

Las secuencias de *ldhA* (990 pb) y *pf1B* (2280 pb) se obtuvieron del genoma de *E. coli* K12 reportado en la página electrónica “Colibri” del Instituto Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri>).

La estrategia, reportada por Link y colaboradores, denominada “crossover PCR” (0) consiste en diseñar dos pares de oligonucleótidos para amplificar, en la primera reacción, dos fragmentos de las zonas adyacentes al gene que se quiere eliminar, estos productos poseen una zona homóloga a partir de la cual se alinean para formar, mediante la segunda reacción (crossover PCR), un fragmento sintético homólogo al genoma, de aprox. 2000 pb, que carece del gene de interés. Los oligonucleótidos de los extremos contienen además, un sitio de restricción para su posterior inserción al plásmido pKO3.

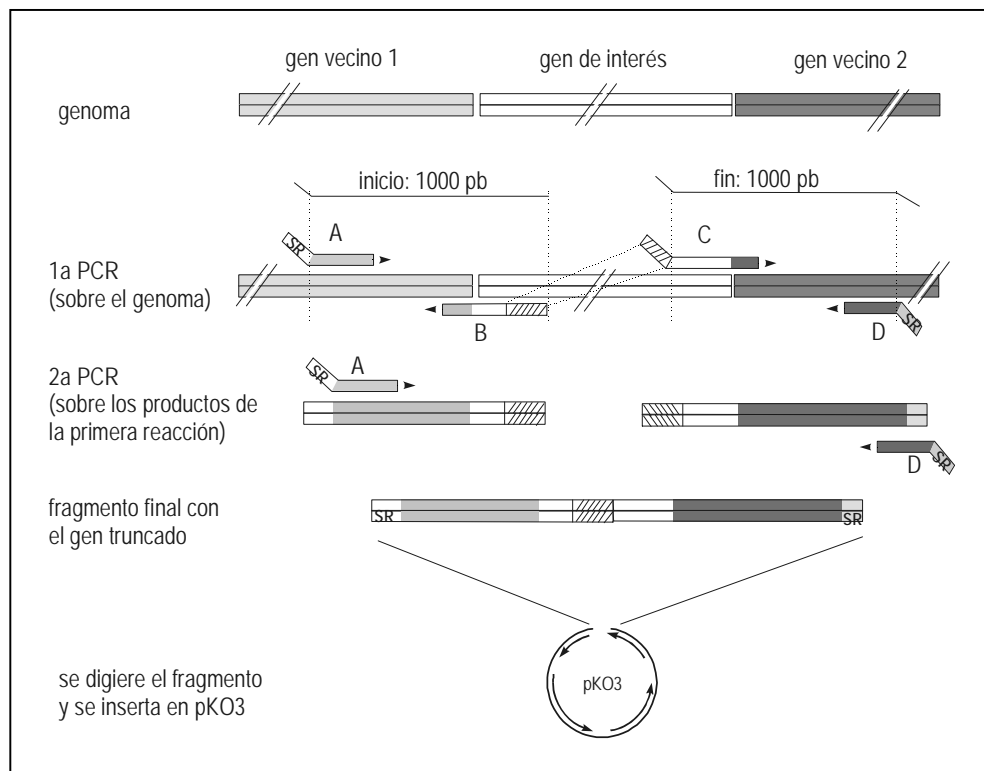


Figura 10. Esquema de construcción del plásmido “knockeador”. Los oligonucleótidos A y D, contienen un sitio de restricción (SR) y los oligonucleótidos B y C son complementarios en alrededor de 20 nucleótidos (zona marcada con líneas inclinadas) o bien, esa zona corresponde a un sitio de restricción con el que posteriormente se ligan ambos fragmentos. Adaptado de Link *et al.* 1997

9.1.2 Construcción del plásmido para eliminar *ldhA*.

El gen *ldhA* tiene un tamaño de 990 pb, y está flanqueado por los genes *hslJ* y *ydbH*. Los oligonucleótidos correspondientes al A y D de la 0, poseen los sitios de restricción *NotI* y *Bam*HI, respectivamente. Además los oligonucleótidos B y C contienen una región homóloga de 26 pb. Se obtuvo el fragmento del gen truncado y se insertó en el vector pKO3. El sitio *Bam*HI de pKO3 se encuentra entre dos sitios *NotI*, por lo que se añadió el sitio *Bam*HI en el de *Sma*I, mediante un adaptador.

En la primera PCR se sintetizaron dos fragmentos: ini-*ldh* de 1042 pb y fin-*ldh* de 752 pb (Figura 11) con los siguientes oligonucleótidos (los sitios de restricción se indican en negrita):

A. Inildh4: 5'- AAGGAAAAA**GCGGCCG**CGTCGCAGTAGCATGCCAC -3'

846 pb antes del inicio de *ldhA* (en *ydbH*), sitio: *NotI*.

B. Inildh3: 5'-CAGGGGAGCGGCAAGATTAACCA**GTGAATTCCGGACCGCTTC**-GCAGCCATTGGCAG -3'

142 pb después del inicio del gen, la zona subrayada es homóloga entre B y C.

C. Finildh2: 5'- ACTGGTTTAATCTTGCCGCTCCCCTG - 3'

10 pb antes del codón de paro.

D. FinildhBam: 5'- GCC**GGATCC**GCCGCGCACGTAGCGCCAGG -3'

718 pb después del fin en *ydbJ*; sitio *Bam*HI.

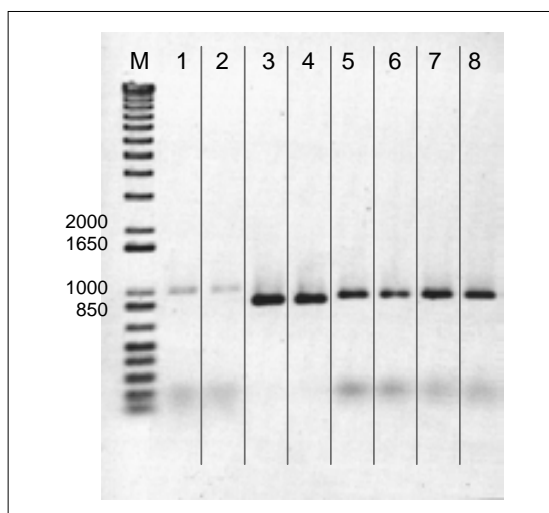


Figura 11. Ejemplo de la primera PCR donde se obtienen los fragmentos del inicio y fin del gen. Carriles: M, marcador; 1 y 2, ini-*ldh*; 3 y 4, fin-*ldh*; 5 y 6 ini- pfl; 7 y 8, fin-pfl.

Una vez que se obtuvo el fragmento truncado, se ligó en el plásmido pKO3. La construcción resultante se utilizó para transformar a *E. coli* XL1 Blue, y se seleccionó en LB-Cm. Posteriormente, se aisló plásmido de 4 clonas elegidas al azar. En la Figura 12 se muestra el plásmido digerido (*Bam*HI-*Not*I), observándose que tres (la 1, 3 y 4) de las cuatro colonias contienen el vector pKO3 (5.7 kb) y el fragmento truncado de *ldhA*, de aproximadamente 1.8 kb.

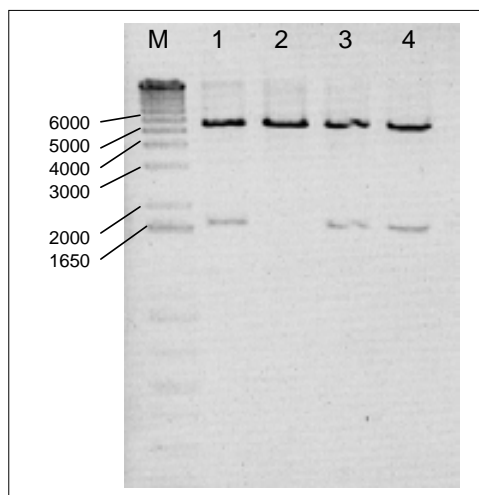


Figura 12. Plásmidos digeridos, aislados de las cepas transformadas con la ligación pKO3-*ldhA*. Los carriles 1 al 4: corresponden a los plásmidos de las cepas 1 a la 4, respectivamente.

9.1.3 Construcción del plásmido para eliminar *pflB*.

El gen *pflB*, de 2283 pb, está flanqueado por los genes *pflA* y *focA*, en estas regiones se diseñaron oligonucleótidos siguiendo una estrategia similar a la utilizada con *ldhA*. Los oligonucleótidos A y D contienen los sitios de restricción *Sal*I y *Not*I respectivamente. Los oligonucleótidos B y C contienen un sitio de restricción para que una vez sintetizados los dos fragmentos, se puedan unir mediante una reacción de ligación. En este caso no se usó la técnica “crossover PCR” porque se obtuvieron eficiencias muy bajas en la segunda PCR; por lo que en vez de incluir una zona complementaria entre los oligonucleótidos B y C, se añadió un sitio de restricción para unir los productos por ligación.

Los fragmentos ini-*pfl* de 869 pb y fin-*pfl* de 885 pb (Figura 11) se obtuvieron en la primera PCR con los siguientes oligonucleótidos (los sitios de restricción se indican en **negrita**):

A. in

*pfl*2: 5' – CCGCGGCCGCTATGGCCAAGAC**GTCGAC**GGCCGAAGAGGCG-GGTGTCTATAAAG – 3'

859 pb antes inicio *pfl*, sitio *SalI*

B. inpfl1: 5' – CCCAAGCTTGCTCGGACATGTAACACCTACCTTC – 3'

10 pb después inicio *pflB*, sitio *HindIII* para ligar

C. finpfl2: 5' – CCCAAGCTTCTCAATCTATGTAATTAGATTTGACTG – 3'

14 pb antes del fin de *pflB*, sitio *HindIII* para ligar

D. finpfl1: 5' – AAGGAAAAAGCGGCCGCGGTGGTTAACACCGTCGAGT-TTG – 3'

866 pb después del fin de *pflB*, sitio *NotI*

El fragmento completo se obtuvo a muy baja concentración debido a la baja eficiencia en la reacción de ligación de los fragmentos individuales, sin embargo se logró reamplificar por PCR. Este fragmento se digirió y se ligó en el vector pKO3 digerido *SalI-NotI*.

Con el producto de la ligación anterior, se transformó a *E. coli* XL1Blue, al igual que con *ldhA*, se seleccionaron las células en LB-Cm. En esta ocasión se eligieron 7 colonias a las cuales se les purificó plásmido. En la 0 se muestran los plásmidos digeridos (*NotI-SalI*); como puede observarse, las cepas 1, 2, 3, 4 y 5 contienen el fragmento de aproximadamente 1.9 kb, correspondiente al fragmento truncado de *pflB* y la otra banda corresponde al vector (5.7 kb).

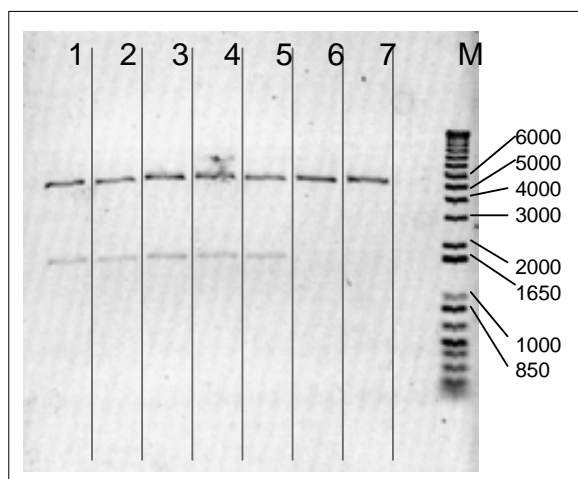


Figura 13. Plásmidos digeridos, aislados de las células transformadas con la ligación pKO3- *pfl*. Los carriles del 1 al 7 corresponden al número de la cepa de donde se purificó el plásmido.

9.1.4 Eliminación del gen *ldhA*.

La eliminación del gene *ldhA* se realizó siguiendo la estrategia reportada por Link *et al.* (Figura 14) que se describe a continuación:

A) Se transformó con el vector pKO3-*ldh* a la cepa *E. coli* W3110 (que es una cepa adecuada para la expresión de genes heterólogos).

B) Las células transformadas se cultivaron en cajas pre-incubadas con medio LB, Cm 20 mg/ml, a 42 °C; en este paso se favorece la integración del plásmido (al recombinarse la región homóloga del cromosoma y plásmido) que no puede replicarse a esa temperatura. Un evento de integración permite la replicación del plásmido a partir del origen cromosomal, por lo que la célula puede crecer en Cm.

C) Las colonias que crecieron se cultivaron en cajas con LB, sacarosa 15% a 30 °C, para la eliminación del plásmido mediante una segunda recombinación (doble recombinación); este paso se favorece porque la levansacarasa contenida en pKO3 sintetiza un polímero a partir de la sacarosa de alto peso molecular que puede lisar a la célula; por lo que las células que crecen son aquellas que escinden el plásmido de su cromosoma.

D) Se eligieron 50 colonias del paso anterior que se cultivaron por réplica en LB, Cm 20 mg/ml y en LB, sacarosa 5%, de donde se distinguieron las cepas sensibles a cloranfenicol y resistentes a sacarosa.

E) Para verificar la eliminación de *ldhA*, 16 de las 50 cepas se cultivaron en medio LB - glucosa 2%; después de 12 h de incubación estática a 30°C en tubos sellados, el caldo de fermentación se analizó por HPLC para detectar lactato y otros productos de fermentación; en la Tabla 2 se resume la cuantificación de las señales para cada cultivo.

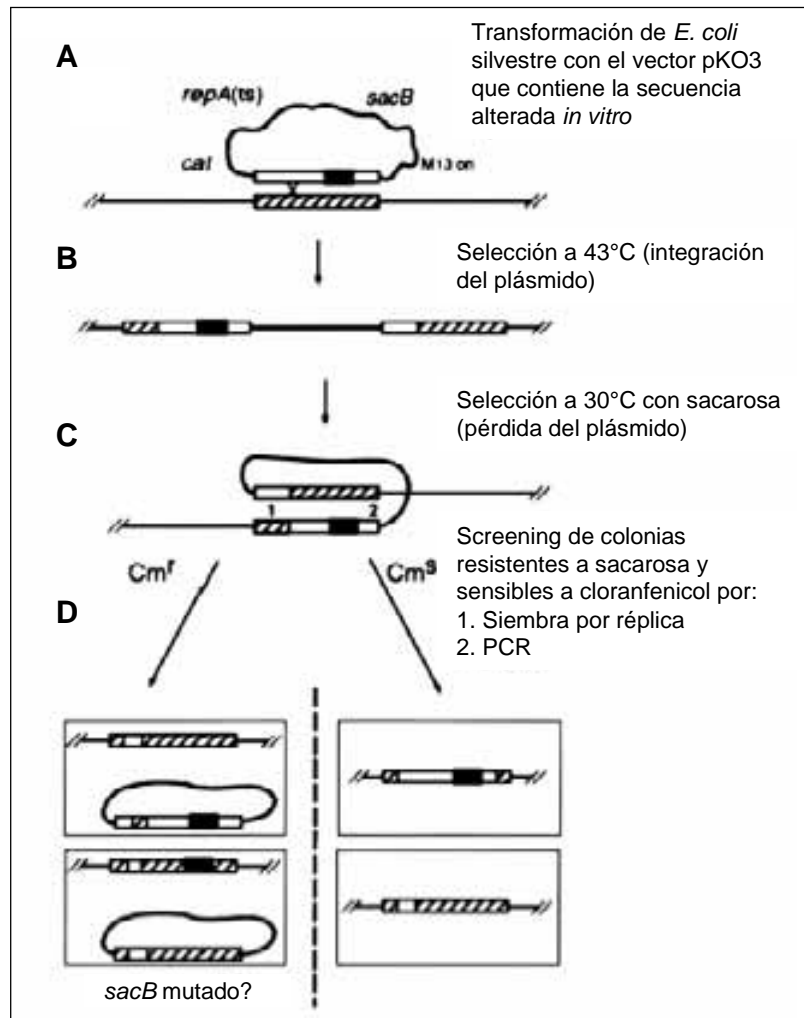


Figura 14. Protocolo de reemplazo genético.

La línea delgada ondulada representa la secuencia del vector de reemplazo. La línea delgada recta representa el cromosoma de *E. coli*. Los rectángulos representan las secuencias homólogas clonadas en el vector (blanco) y localizada en el cromosoma de *E. coli* (rayado). El rectángulo negro dentro de la secuencia homóloga del vector representa cualquier tipo de alteración en la secuencia. “*sacB* mutado?” en el panel izquierdo indica la pérdida de la función del gen *SacB* por mecanismos desconocidos. Tomado de Link *et al.* 1997.

Tabla 2. Concentraciones de metabolitos después de 12 h de cultivo de las cepas mutantes en *ldhA* medidos por HPLC.

Muestra	Glucosa residual (g/l)	Lactato (g/l)
Control (LB-glu)	20.80	0.080
W3110	11.71	1.405
c01	11.46	0.273
c03	12.19	1.557
c06	12.42	1.693
c13	12.45	1.934
c17	13.10	1.985
c18	12.09	1.947
c23	12.24	0.149
c24	13.25	0.146
c28	12.48	1.661
c30	11.97	1.715
c31	12.76	1.654
c32	12.46	1.321
c44	12.16	1.604
c49	11.84	1.596
c50	13.31	2.086
c52	13.03	1.938

Como se puede observar en la Tabla 2, tres de las cepas analizadas muestran disminuída la producción de lactato. En estas cepas se observa una concentración residual de lactato puesto que aún cuando la conversión directa de piruvato en D-lactato en *E. coli* bajo condiciones anaerobias solo puede realizarse a través de la enzima D-LDH (Tarmy & Kaplan 1968); existe al menos otra ruta independiente la cual convierte al metilgloxal en D-lactato mediante el sistema de la glioalasa (Inoue & Kimura 1995). Esta ruta tiene un papel importante en la detoxificación de la célula, sin embargo no regenera NAD⁺.

La comprobación de la eliminación del gen, se hizo mediante PCR de colonia, con los oligonucleótidos *ldhB* (5'-GGGGAGCGGCAAGATTAACCACT-3') e *Inldh4* (anteriormente descrito). El fragmento esperado, que contiene la versión truncada de *ldhA*, tiene un tamaño de aproximadamente 1 kb. Cabe señalar que con los mismos oligonucleótidos se obtendría un

fragmento de 2 kb correspondiente al gen completo, que bajo las condiciones de PCR empleadas no se amplificó. Es por esto que con la cepa silvestre W3110 (que se muestra en el carril 5 de la Figura 15) no se obtuvo producto de PCR. De la Figura 15, se observa también que con las cepas 23 y 24 se obtuvo el fragmento esperado. De estas cepas, se eligió a la cepa 23, que se nombró WVldh⁻. Partiendo de esta cepa WVldh⁻ se prepararon células electrocompetentes para eliminar a continuación el gen *pfl*.

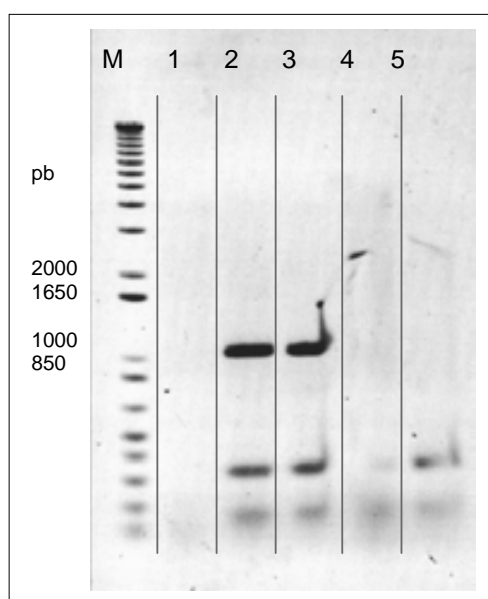


Figura 15. Fragmentos de DNA obtenidos por PCR de colonia para el gen *ldh* de las cepas candidatas. Carriles: 1, cepa 01; 2, cepa 23; 3, cepa 24; 4, cepa 06; 5, W3110.

9.1.5 Eliminación del gen *pfl*.

Con el plásmido pKO3-*pfl* se transformó la cepa 23 (WVldh⁻) y se siguió exactamente el mismo procedimiento anterior. Para seleccionar las dobles mutantes, se cultivó por réplica en condiciones aerobias y anaerobias. Se eligieron aquellas colonias que prácticamente no crecieron en anaerobiosis. El fenotipo de las dobles mutantes creciendo en medio sólido bajo condiciones anaerobias es de colonias muy pequeñas a tiempos prolongados (Donnelly *et al.* 1998); cuando se compara el crecimiento de la cepa parental con la doble mutante a tiempos de cultivo cortos (24 h) el crecimiento de la última es prácticamente nulo. La eliminación del gen se verificó por PCR en colonia con los oligonucleótidos: *finpfl1* (descrito arriba) y *pflpdc* 5'-CCGCCGACCACAAA-GTGAC-3'. El fragmento del gen truncado es de aproximadamente 1.4 kb, mientras que del gen completo se

obtendría un fragmento de 3.6 kb, que no se amplifica bajo estas condiciones. Se analizaron 5 cepas, de las cuales, como se muestra en la Figura 16, solamente las cepas 23 y 37 produjeron el fragmento esperado. Estas cepas se designaron como VAL23 y VAL37. En el carril 1 de la Figura 16 se muestra la amplificación del fragmento truncado de *ldhA* (análogo a la Figura 15) para comprobar que la cepa utilizada para esta segunda modificación no contiene al gen *ldhA*.

También se obtuvo una cepa carente de *pflB* al aplicar el método de reemplazo genético en la cepa silvestre W3110 con el plásmido pKO3-pfl, la cepa resultante, WVpfl⁻, se seleccionó por su pobre crecimiento en medio mínimo M9 – glucosa en condiciones anaerobias.

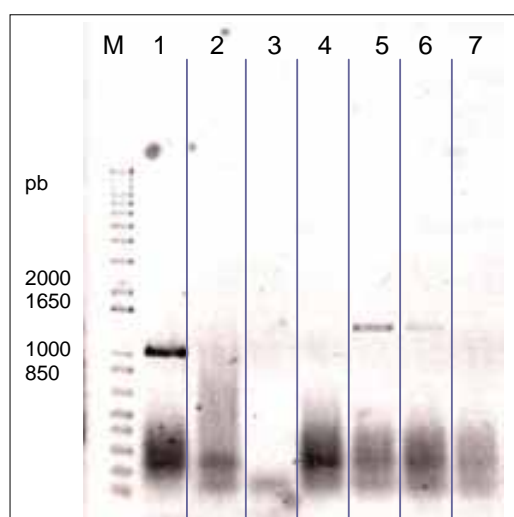


Figura 16. Fragmentos de DNA obtenidos por PCR para *pfl* de las cepas candidatas. Carril 1, *ldh* trunco de la cepa inicial (0.9 kb) oligos: *ldhB* y *inildh4*; carriles 2 al 7: cepa 5; cepa 14; cepa 20; cepa 23; cepa 37; y W3110. oligos: *finpfl1* y *pflpdc* (1.4 kb)

9.1.6 Perfil de metabolitos de las mutantes de *E. coli*.

Se realizaron cultivos con las mutantes sencillas WVldh⁻, WV136pfl⁻; la doble mutante VAL23; así como con la cepa parental W3110 para comparar la relación de productos de fermentación y comprobar las mutaciones. Estos experimentos se realizaron en medio mínimo (M9) para facilitar la cuantificación de los ácidos orgánicos por HPLC. La Tabla 4 muestra los metabolitos evaluados al final de la fermentación cuando aún quedaba glucosa en el medio. Las cepas W3110 y VAL23 se caracterizaron en un trabajo previo (Lara *et al.* 2006) bajo condiciones tanto aeróbicas, a una tensión de oxígeno disuelto (TOD) constante de 10%; así

como bajo condiciones anaeróbicas transitorias (de TOD oscilante). Los datos de ese trabajo, se resumen en la Tabla 3. Del trabajo citado, se sabe que la síntesis de ácidos orgánicos y etanol se encuentra ligada al crecimiento y sólo cuando se agota la glucosa, algunos de los ácidos, como el acético y láctico se pueden asimilar como fuente de carbono (Lara *et al.* 2006). Por lo tanto, los datos de la Tabla 4 corresponden a los valores máximos obtenidos durante la fermentación. Cada cepa presenta un perfil de producción de ácidos orgánicos diferente y acorde con su fondo genético. La cepa WVpfl⁻ aumenta considerablemente la producción de ácido láctico, mientras que el ácido fórmico se mantiene en cero; al contrario de la cepa WV23, la cual produce muy poco lactato (ver 9.1.4), mientras que la concentración de ácido acético y fórmico se elevan. Se ha reportado que dobles mutantes (*pfl*, *ldh*⁻) en condiciones anaerobias, crecen a muy bajas densidades (Donnelly *et al.* 1998). El perfil de metabolitos de VAL23 y la cepa parental W3110 se analizó al transformar las cepas con un plásmido que expresa la ruta etanológica (pTrcPET, que se describe adelante). Nuestras determinaciones indican que en LB, Ap, Glc 2 g/l; VAL23-pTrc99A tiene un μ de 0.07 h⁻¹ mientras que VAL23-pTrcPET de 0.23 h⁻¹. Creciendo en M9, Glc 5 g/l las cepas sin plásmido: W3110 y WVpfl⁻ tienen un valor de μ de 0.32 y 0.15 h⁻¹, respectivamente; mientras que VAL23 no aumenta de densidad óptica en 24 h. Como se puede observar, con la cepa VAL23 transformada con el plásmido etanológico, el flujo de carbono está dirigido preferencialmente hacia la síntesis de etanol, se disminuye la formación de subproductos como los ácidos láctico y acético, y se elimina la producción de ácido fórmico.

Tabla 3. Comparación de las concentraciones máximas de metabolitos en las cepas *E. coli* W3110 y VAL23. Tomado de Lara *et al.* 2006.

Cepa ^a	Condiciones de cultivo ^b	Concentración máxima de metabolitos (g/l)				
		Acetato	Formato	Lactato	Succinato	Etanol
W3110	Aerobia	0.674	0.343	0.0096	0.053	0.184
W3110	Anaerobia transitoria	1.358	0.739	0.516	0.111	0.323
VAL23	Aerobia	0.554	0.000	0.000	0.073	0.000
VAL23	Anaerobia transitoria	1.201	0.000	0.000	0.117	0.213

^a Estas cepas se encuentran transformadas con el plásmido pV21 que codifica para la GFP (proteína verde fosforescente)

^b Cultivos en medio mínimo, Glc 5 g/l; los cultivos aerobios se realizaron a una TOD constante de 10%, mientras que los anaerobios transitorios se realizaron a una TOD oscilante.

Tabla 4. Perfil de metabolitos de las cepas desarrolladas.

Cepa	Concentración máxima de metabolitos (g/l) ^a				
	Succinato	Lactato	Formato	Acetato	Etanol
W3110/pTrc99A	0.21 ± 0.020	0.34 ± 0.023	1.01 ± 0.170	0.39 ± 0.064	0.33 ± 0.062
WVpfl/pTrc99A	0.08 ± 0.022	1.90 ± 0.389	0.00 ± 0.000	0.01 ± 0.003	0.15 ± 0.018
WVldh/pTrc99A	0.19 ± 0.031	0.07 ± 0.016	1.28 ± 0.105	0.48 ± 0.030	0.43 ± 0.084
W3110/pTrcPET	0.24 ± 0.018	0.13 ± 0.001	0.92 ± 0.301	0.32 ± 0.099	0.57 ± 0.183
VAL23/pTrcPET	0.17 ± 0.005	0.02 ± 0.002	0.00 ± 0.000	0.02 ± 0.002	0.92 ± 0.003

^a Cultivos anaerobios en tubos sellados, medio mínimo M9, Glc 5 g/l, bajo atmósfera de N₂ a 37°C.

9.2 Construcción del plásmido pTrc-PET

Como se menciona en los antecedentes, las cepas no fermentativas de *E. coli* se han empleado exitosamente para la producción de etanol y ácidos orgánicos. En este trabajo se busca desarrollar de un método de selección basado en la velocidad de crecimiento.

Para este fin, se construyó un plásmido inducible que contiene al operón *pet*, con el objetivo de modular los niveles de expresión de la enzima PDC (que es la enzima clave en la ruta de formación de etanol) y evaluar el efecto que esto tiene en la velocidad de crecimiento. De esta manera, la variación en los niveles de expresión de PDC imitaría los resultados de un experimento de mejoramiento en las propiedades catalíticas por técnicas de ingeniería de proteínas.

Al plásmido pTrc99A se le insertaron los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis* bajo el promotor *trc*. Los genes *pdc* y *adhB* se obtuvieron por PCR partiendo del plásmido pLOI510 (Ohta *et al.* 1991). Los oligonucleótidos se diseñaron para incluir sitios de restricción apropiados y una etiqueta de polihistidina en el extremo C-terminal de la cadena codificante. Un sitio interno *NcoI* en *pdc* se eliminó usando el kit “quick-change site-directed mutagenesis” (Stratagene). Los oligonucleótidos usados para la amplificación de *pdc* BpdcNco: 5'-GGAGTAAGCCATGGGTTATACTGTTCGGTACC, y EpdcBm: 5'-CGCGCGGATCCCTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGGAGCTTGTTAAC; para *adhB*, BadhBm: 5'-GCCGCGGATCCCTAGTATGTAGGGTGGAGGTTATAG y EadhHd: 5'-CCCAAGCTTCTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAAAGCGCTCAGGAA.

En un primer paso, se incluyó el gene *adhB* (plásmido pTrcADH) y

posteriormente se insertó el gene *pdC* para completar el operón.

En resumen, el plásmido pTrcPET (Figura 17) contiene bajo el promotor *trc* los genes: a) *pdC* con 6 codones de histidina y 2 codones de paro y b) *adhB* con su propio sitio de unión a ribosoma y una etiqueta de 6 histidinas y 2 codones de paro. De manera análoga se integró al vector solamente el gen *pdC*, que se nombró pTrcPDC.

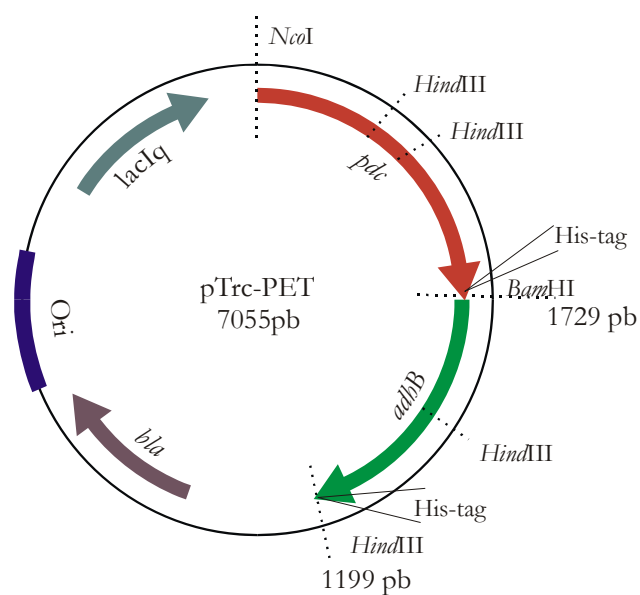


Figura 17. Plásmido inducible por IPTG, pTrcPET (no a escala).

9.3 Relación velocidad de regeneración de NAD^+ – velocidad de crecimiento.

La cepa *E. coli* VAL23-pTrcPET se cultivó en LB líquido (glucosa 2 g/l) bajo condiciones anaerobias a diferentes concentraciones de inductor (IPTG). Conforme el nivel de inducción fue incrementado, se obtuvieron mayores velocidades de crecimiento (Figura 18 A y B), así como mayores actividades PDC (Figura 18 B). Esta observación confirma la hipótesis de que la velocidad de crecimiento es proporcional a la velocidad a la cual el NAD^+ es regenerado, velocidad que a su vez, es controlada por el paso limitante de esta vía, i.e. la actividad PDC.

Ingram y Conway (Ingram & Conway 1988) encontraron anteriormente que el nivel de expresión de las enzimas etanológicas expresadas de plásmido en

cepas silvestres de *E. coli*, correlaciona con la densidad celular final, sin embargo atribuyeron dicha correlación al reemplazo de productos de fermentación ácidos por etanol que es un producto menos tóxico para la célula. Nosotros encontramos que el incremento en la velocidad de crecimiento a mayores actividades PDC, también es proporcional a la velocidad de consumo de glucosa resultante de un mayor flujo de carbono hacia la producción de etanol, y por lo tanto hacia el reciclaje del NAD^+ (Figura 18 C). Este efecto de mayor velocidad de consumo de glucosa al incrementar la actividad de una ruta fermentativa ya se ha observado anteriormente en una cepa no-fermentativa complementada con la enzima málica que reestablece el crecimiento anaerobio al convertir piruvato en malato que posteriormente se convierte en succinato (Stols & Donnelly 1997).

Aún cuando los niveles tanto de PDC como de ADH se modularon con la adición de IPTG, se tienen indicios de que PDC es la actividad limitante en la vía heteróloga de formación de etanol, (Martinez *et al.* 1999). Esto se confirmó al usar el vector pTrcPDC (que no expresa la actividad ADHII). La actividad PDC por sí sola, fue capaz de reestablecer el crecimiento anaerobio de VAL23 (Tabla 5), debido a la presencia de la actividad ADHE nativa que cataliza la conversión de acetaldehído a etanol, reciclando el NAD^+ . Los datos indican que a bajas actividades de PDC, la actividad ADH no representa un cuello de botella para la conversión de piruvato en etanol, puesto que la velocidad de crecimiento aumentó con la concentración de inductor adicionado (Tabla 5). Es claro entonces, que dentro de cierto rango de actividad de PDC, existe una relación directa entre la actividad PDC y la velocidad específica de crecimiento, mostrando un efecto de saturación a mayores niveles de expresión (Figura 18C).

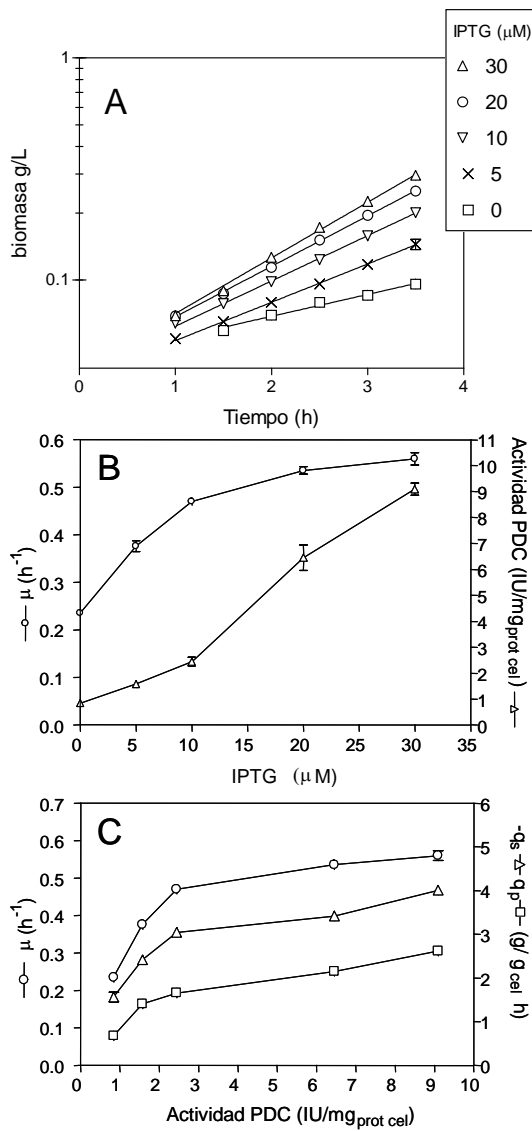


Figura 18. *E. coli* VAL23-pTrcPET en LB, glucosa 2 g/l a diferentes concentraciones de IPTG. **A.** Fase exponencial de las cinéticas de crecimiento anaerobio. **B.** Velocidad específica de crecimiento y actividad PDC. **C.** Efecto de la actividad de PDC en las tasas específicas de: crecimiento (μ), consumo de glucosa ($-q_s$) y formación de etanol (q_p).

Tabla 5. Correlación entre la velocidad específica de crecimiento y la actividad PDC en *E. coli* VAL23-pTrcPDC cultivada en LB, glucosa 20 g/l (18 h cultivo).

[IPTG] mM	PDC (IU/mg prot)	μ (h ⁻¹)
0.00	0.6	0.10
0.01	1.8	0.40
0.03	7.2	0.44

Con estos resultados se comprueba la relación directa que existe entre la actividad PDC y la velocidad de crecimiento. Así que la cepa VAL23 puede ser empleada en la selección de las variantes más activas de PDC obtenidas por evolución dirigida, al cultivarlas en medio líquido anaerobio. También es posible detectar colonias de rápido crecimiento en un método de tamizaje mediante la observación directa del tamaño de colonia en cultivos sólidos anaerobios. En la Figura 19 se observa cómo el tamaño de colonia (directamente relacionado con la velocidad de crecimiento) aumenta conforme se incrementa la concentración de inductor.

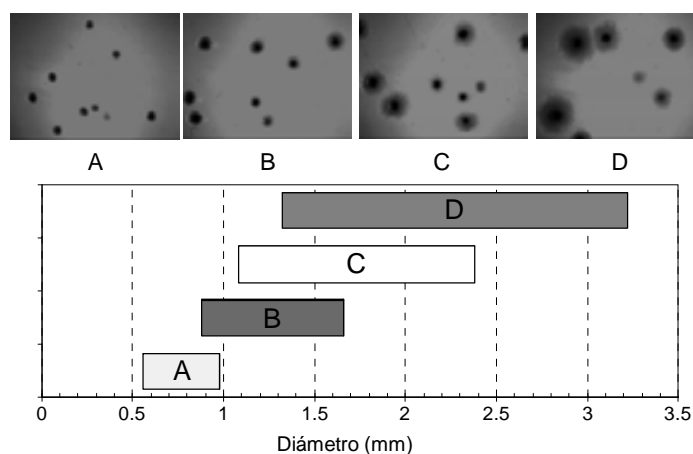


Figura 19. Distribución del diámetro de colonia de *E. coli* VAL23-pTrcPET en medio sólido LB, glucosa 20 g/l, en anaerobiosis a diferentes concentraciones de IPTG, 48h en jarra anaerobia. Concentración de IPTG (μ M): **A**, 0; **B**, 10; **C**, 20 y **D**, 30. Abajo: diámetros de colonia medidos para cada condición.

9.4 Evolución dirigida de PDC.

Siguiendo el método de “DNA shuffling” reportado por Stemmer (Stemmer 1994), se logró reamplificar un fragmento de 1.7 kb correspondiente al tamaño de *pdC*. Este producto se ligó en el vector pTrc-ADH para generar un banco de mutantes con el que se transformó a *E. coli* XL1Blue, el tamaño del banco obtenido se estimó en 1×10^6 variantes. El proceso de reconstrucción del gen completo a partir de los fragmentos de DNA introduce una tasa de mutaciones puntuales de 0.7% (Stemmer 1994). De este banco crecido en LB-Ap sin presión de selección se escogieron 7 colonias al azar para secuenciar y calcular la tasa de mutagénesis. Se secuenciaron alrededor de 8000 pb, encontrándose por lo menos una mutación en cada clona, y en total se encontraron 11 mutaciones por lo que el valor de la tasa de mutagénesis es de 1.4 mutaciones por kilobase. También se puede observar que todas las mutaciones fueron transiciones (Ts) y que ninguna se repite (Tabla 6).

Con el DNA que contiene al banco de mutantes, se transformó a la cepa *E. coli* VAL23. Al sembrar diluciones apropiadas de la transformación en medio sólido LB-Ap bajo condiciones aeróbicas, se obtuvieron en total aproximadamente 2×10^6 transformantes. Simultáneamente se sembró en cajas con LB, Glc 2%, Ap, sin inductor, en condiciones anaerobias. De estas cajas crecieron aproximadamente 300 colonias. Esta diferencia del número de colonias de 4 órdenes de magnitud indica que muchas colonias no sobrevivieron en anaerobiosis, probablemente porque llevaban alguna mutación deletérea para la función de la PDC.

Las clonas que crecieron bajo presión de selección tuvieron diferentes tamaños de colonia lo que podría relacionarse con la actividad enzimática, sin embargo, el tamaño de las colonias en caja también está afectado por otros factores, e.g. la disponibilidad de nutrientes en determinada zona, dado que todas las colonias vecinas están compitiendo por los nutrientes. Por lo tanto, se escogieron 9 clonas al azar de diferentes tamaños, que se cultivaron en tubos sellados con 5 ml de LB – Glc 2%, de los que se purificó plásmido para comprobar la presencia del inserto por patrón de digestión.

De las candidatas obtenidas de la selección en *E. coli* VAL23 en anaerobiosis, se obtuvo la secuencia nucleotídica de 6 variantes: G12, M2, M3, C3, C4 y C42, en este caso, se secuenció un total de 9900 pb, y se encontraron 10 mutaciones, ocho del tipo transición (Ts) y 2 de tipo transversión (Tv). Es importante señalar, que como se observa en la Tabla 7, todas las variantes tienen al menos una

mutación y que ninguna se repite, con excepción de las variantes C4 y C42, puesto que C42 es una variante espontánea de C4 que mostró un crecimiento más robusto. Las clonas que contienen a cada una de las seis variantes se caracterizaron bioquímicamente, y como se muestra más adelante, todas tienen PDC funcional, lo que nos indica que el método de selección, efectivamente discrimina las mutaciones deletéreas.

Tabla 6. Banco de PDC expresado en *E.coli* XL1-Blue sin presión de selección.

Clona	Mutación ^a	Posición nt ^b	Posición aa ^c	Tipo de mutación ^d	Tipo de cambio
Ba1	ta T - ta C	489	163	Ts	Silenciosa (Tyr)
Ba2	aa G - aa A	657	219	Ts	Silenciosa (Lys)
	G cc - A cc	1111	371	Ts	Ala- Thr
B2	aa A - aa G	1014	338	Ts	Silenciosa (Lys)
B6	G gt - A gt	253	85	Ts	Gly - Ser
B9	G cc - A cc	619	207	Ts	Ala - Thr
	A aa - G aa	1063	355	Ts	Lys - Glu
	A tc - G tc	1243	415	Ts	Ile - Val
B12	cc G - cc A	1203	401	Ts	Silenciosa (Pro)
	at G - at A	519	173	Ts	Met - Ile
	gc T - gc C	1287	429	Ts	Silenciosa (Ala)

^a La mutación se indica en mayúscula, ^b. En la secuencia nucleotídica, ^c. En la secuencia de aminoácidos, ^d. Ts:transición

Tabla 7. Variantes expresadas en *E. coli* VAL23 obtenidas por selección en anaerobiosis.

Clona	Mutación ^a	Posición nt ^b	Posición aa ^c	Tipo de mutación ^d	Tipo de cambio
G12	at G - at A	519	173	Ts	Met - Ile
C3	gc T - gc C	699	233	Ts	Silenciosa (Ala)
	G gc - A gc	712	238	Ts	Gly - Ser
	g A a - g G a	923	308	Ts	Glu - Gly
	gt C - gt A	1122	374	Tv	Silenciosa (Val)
C4 y C42	g T c - g C c	935	312	Ts	Val - Ala
	gc T - gc A	1023	341	Tv	Silenciosa (Ala)
M2	g C c - g T c	830	277	Ts	Ala- Val
	G gc - A gc	1546	516	Ts	Gly - Ser
M3	c G c - c A c	1298	433	Ts	Arg - His

^a La mutación se indica en mayúscula, ^b. En la secuencia nucleotídica, ^c. En la secuencia de aminoácidos, ^d. Ts:transición, Tv: transversión.

9.5 Caracterización bioquímica de las variantes en PDC.

Las clonas que contienen a las variantes se cultivaron en condiciones aerobias (LB-Ap, IPTG 0.05 mM). Se analizó la fracción soluble de los extractos celulares de cada cultivo porque contienen la mayoría de la actividad enzimática (resultados no mostrados).

Con cada extracto se realizaron mediciones de actividad PDC. Estos datos se compararon con la velocidad específica de crecimiento obtenida de cultivos líquidos anaerobios (LB- Glc 2 g/l). Los valores relativos de estos experimentos se muestran en la Figura 20 donde el valor de 1 corresponde a los datos de la cepa que contiene a la proteína PDC parental. Se observa una tendencia de aumento de velocidad de crecimiento cuando existe una mayor actividad PDC. La actividad de las variantes PDC-G12 y PDC-C42 es significativamente mayor (1.55 y 1,56 veces) que la actividad parental, con un aumento correspondiente en la velocidad específica de crecimiento (1.41 y 1.45 veces).

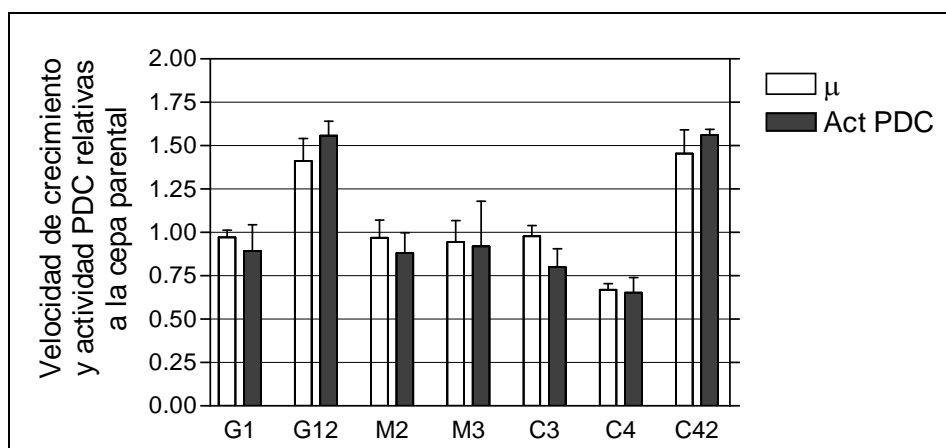


Figura 20. Determinación de actividades PDC y velocidad de crecimiento de las variantes obtenidas del DNA shuffling, los ensayos se hicieron por duplicado.

En un segundo experimento se midió nuevamente actividad PDC de 4 variantes elegidas. El nivel de expresión de cada proteína se determinó mediante inmunodetección de la etiqueta de histidinas de las proteínas. La intensidad de las bandas de un "Western Blot" (Figura 21) se cuantificó usando un programa de análisis de imágenes (Scion Image Beta 4.0.2) determinando los píxeles por área. La información obtenida con la inmunodetección de las proteínas nos permite

evaluar si las variantes se expresan al mismo nivel, aunque por las características del método, no es posible cuantificar con exactitud. Entonces, para calcular de manera semicuantitativa la actividad específica de cada variante, se normalizaron los valores de actividad obtenidos, con los píxeles medidos del “western blot”. (Figura 22).

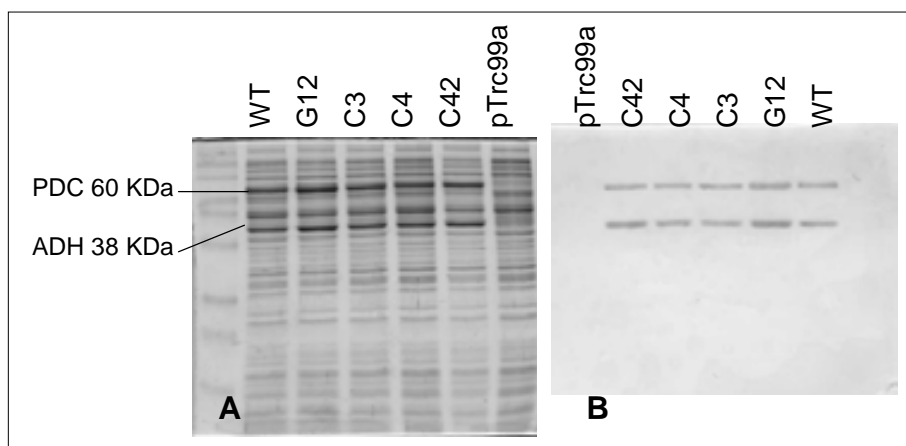


Figura 21. **A.** SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie. **B.** Western Blot con anticuerpo anti6-His

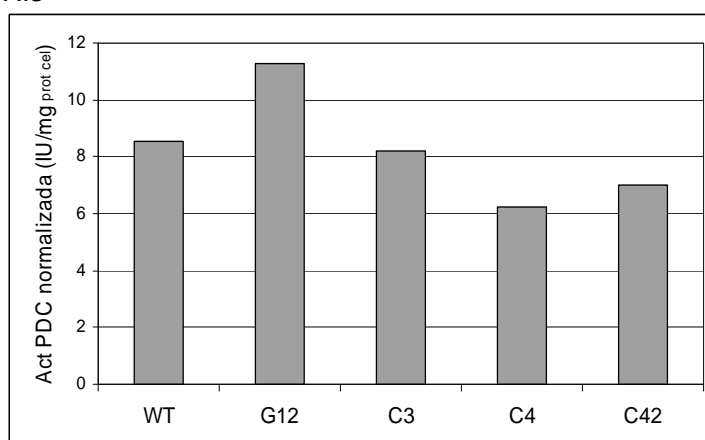


Figura 22. Actividad PDC de las variantes normalizada por píxeles.

Los valores de actividad para la proteína parental (WT), G12, C3, C4 y C42 fueron de 8.56, 12.51, 8.11, 5.91 y 7.48 IU/mg_{prot} respectivamente. Al normalizar por píxeles se obtuvieron los datos graficados en la Figura 22

De acuerdo a estos resultados, aún cuando la proteína PDC-G12 presenta un ligero aumento en la expresión (Figura 21), el valor de actividad normalizado se mantiene con la tendencia de aumento con respecto a la proteína parental (1.3 veces). La actividad medida de la variante PDC-C42 fue menor que en el experimento anterior, por lo que se descartó.

A continuación se caracterizó a la variante PDC-G12 por mostrar mejores resultados. La mutación que contiene PDC-G12 se encuentra en el residuo 173 (Tabla 7). Ninguno de los residuos modificados en las mutantes seleccionadas, está cerca de los residuos importantes para la catálisis, ni de aquellos residuos involucrados en la interfase de las subunidades.

Las proteínas PDC-G12 y PDC-WT se purificaron por cromatografía de afinidad para una caracterización cuantitativa. Las actividades específicas con 5 mM piruvato de las enzimas purificadas resultaron similares entre ellas, de 28.5 IU/mg_{prot} para PDC-G12 y 29.2 IU/mg_{prot} para PDC-WT. Se determinó también la cinética enzimática de ambas proteínas a diferentes concentraciones de sustrato, los parámetros catalíticos resultaron muy cercanos, con una k_2 de 34 IU/mg_{prot}, para ambas enzimas y un valor de K_m muy cercano entre ellas (PDC-WT: 0.8 mM y PDC-G12: 1.1 mM); teniendo la enzima parental una mejor afinidad por el sustrato, lo que indica que las propiedades catalíticas de PDC-G12 no son responsables del incremento en actividad volumétrica.

La secuencia nucleotídica de la mutante G12, se obtuvo desde el promotor *trc* hasta el fin del gen *pdv* y principio del gen *adhB* inclusive. En esta fracción no se observó otro cambio además del ya mencionado en el n519, Experimentos de subclonación de la variante a un vector fresco; dio como resultado una cepa que no presenta la ventaja en la velocidad de crecimiento previamente observada. Con este resultado y de acuerdo con las propiedades catalíticas de la enzima purificada, creemos que existe una mutación en el plásmido. Una posible explicación es un aumento en el número de copias del plásmido. No se descarta que la alteración en el plásmido haya incrementado la actividad transcripcional en la dirección del gene que codifica para PDC, por lo que se tendría un incremento en la cantidad de proteína producida.

Este tipo de falsos positivos ocurren con frecuencia en los experimentos de evolución dirigida, por lo que es importante contar con una estrategia que permita discernirlos. En este caso, el fenotipo de las cepas *E. coli* VAL23 que contienen al genotipo parental (*pdv* de *Z. mobilis*) es de colonias grandes, incluso mayores que

una cepa W3110, puesto que producen eficientemente etanol en condiciones anaerobias.

Para superar esta limitación es necesario partir de un fenotipo visiblemente debilitado. Como regla empírica, cuando se alcanzan resultados como éste, se sugiere aumentar la presión de selección al disminuir la concentración intracelular de la enzima. Esto se puede lograr mediante varias estrategias: cambiar a un promotor débil que reduzca la transcripción del RNA mensajero; proporcionar una dosis muy baja del gene; usar sitios de unión a ribosoma muy débiles para disminuir la traducción de la proteína; o bien, agregar a la proteína una etiqueta que sea reconocida por una proteinasa específica, para llevar a cabo una proteólisis controlada (Neuenschwander *et al.* 2007).

9.6 Obtención de vectores de baja expresión

9.6.1 Vector con un promotor débil V3

El primer paso en la iniciación de la transcripción es la asociación de la RNA polimerasa con ciertas regiones en el promotor del DNA, en *E. coli* estas regiones de unión son dos hexámeros de secuencia conservada localizadas aproximadamente a 10 y 35 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (caja -10 y -35). Existe evidencia que estos hexámeros son determinantes en la fuerza de unión del promotor (Moyle *et al.* 1991).

Para aumentar la presión de selección usando el plásmido pTrc99A, se propuso introducir al vector una mutación en la caja -35 (TTGACA → TTGACC) con la cual se ha reportado que se pueden bajar los niveles de transcripción, obteniendo tan solo el 8% de la expresión original de *trc* (Hernández-Montalvo *et al.* 2003).

Para lograr este objetivo se utilizó el kit “quick-change site-directed mutagenesis” de Stratagene, el par de oligonucleótidos se diseñaron en la zona de la caja -35, incluyendo la mutación que se deseaba introducir. El plásmido sintetizado se utilizó para transformar a *E.coli* XL1Blue. De las colonias que crecieron, se ensayó actividad PDC (cultivadas en condiciones aerobias, en medio LB-Ap-IPTG 1mM; Tabla 8). Bajo estas condiciones se observa que ninguna de las candidatas presenta una actividad tan disminuída como lo reportado, sin embargo, la variante V3 que presentó un ligero decremento, fue ensayada a concentraciones menores del inductor, observando menor nivel de actividad.

Tabla 8. Actividad PDC expresada a partir de los promotores mutantes en la caja -35. (Cultivos aerobios, LB, Ap, IPTG 1 mM)

Variante	Actividad PDC (U/mg _{prot cel})
T1	14.0
T2	13.9
T3	13.4
V1	13.1
V2	13.8
V3	9.8
pTrcPDC (control)	12.7

Al determinar la actividad enzimática de extractos de la variante V3, cultivada a diferentes concentraciones de IPTG (Tabla 9), se observó que el nivel de expresión no es tan bajo como lo esperado, sin embargo, en presencia de inductor se obtiene una expresión de alrededor del 50% con respecto a la expresión original; y cuando no se agrega inductor de un 30%. La mutación en la caja -35 se confirmó por secuenciación nucleotídica.

Tabla 9. Comparación de actividades entre el plásmido pTrcPDC nativo y el plásmido V3, con la mutación en la caja -35 a diferentes concentraciones de IPTG (cultivos aerobios, LB-Ap).

[IPTG] mM	Act. PDC promedio U/mg _{prot cel}		% act V3/pTrcPDC
	V3 (mut -35)	pTrcPDC (control)	
0	0.46	1.59	28.74
0.01	3.17	5.85	54.17
0.05	5.33	10.42	51.21
1.00	6.19	12.46	49.71

E. coli VAL23 transformada con el plásmido V3 se caracterizó en condiciones anaerobias, a diferentes concentraciones de IPTG. Como se observa en la Figura 23 y en la Tabla 10, en ausencia del inductor, la velocidad de crecimiento es muy baja (0.07 h^{-1} contra 0.23 h^{-1} con el vector original), pero se recupera al adicionar IPTG, puesto que la actividad PDC incrementa a valores cercanos a los obtenidos con el vector nativo (0.5 h^{-1} contra $0,57 \text{ h}^{-1}$ con el vector nativo). El fenotipo observado al crecer *E. coli* VAL23-V3 en cajas LB-Glc 2% sin inductor, fue de

colonias muy pequeñas que tardan mucho tiempo en crecer (más de 48 h)

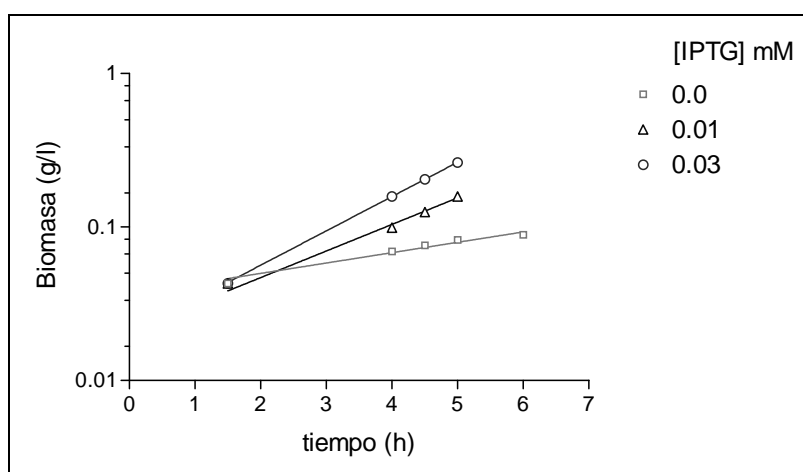


Figura 23. Cinética de crecimiento en tubo sellado *E. coli* VAL23-V3, LB-Glc 20 g/l.

Tabla 10. Análisis del cultivo anaerobio *E. coli* VAL23-V3, LB-Glc 20 g/l

[IPTG] mM	PDC U/mg _{prot cel}	μ (h ⁻¹)
0.00	0.08	0.07
0.01	2.04	0.35
0.03	3.70	0.50

9.6.2 Vector pT4 con un sitio de unión a ribosoma débil.

Se modificó el sitio de unión a ribosoma (RBS) de un vector pT4Bla Figura 24, para disminuir el nivel de expresión de la proteína. El diseño se realizó según lo publicado por Vellanoweth & Rabinowitz (1992) quienes reportaron un marcado decremento en la expresión del producto (en su caso, de la β -galactosidasa) cuando disminuyen el espacio entre el RBS y el inicio de la traducción. En *E. coli* el espacio óptimo es de 7 a 8 nucleótidos (aprox 3000 U β -gal), cuando el espacio disminuye a 3 nucleótidos, la actividad encontrada es de tan solo 72 U.

Por lo tanto, se decidió intercambiar el RBS de pT4Bla por la secuencia reportada como wk2: AAAAAAAAAAGGAAAA; donde la región subrayada corresponde al RBS (Vellanoweth & Rabinowitz 1992).

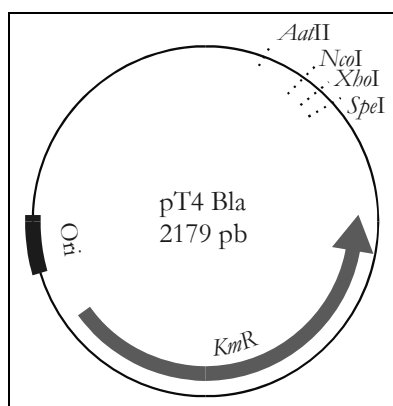


Figura 24. Plásmido pT4Bla.

Para introducir esta modificación se empleó la técnica “crossover PCR” con dos fragmentos sintéticos como moldes. El primer fragmento (FR-wk) se sintetizó con los oligonucleótidos 30tailEco que inicia 200 pb corriente arriba del RBS, y SDpdcNde; usando como molde el plásmido pT4Bla (Figura 25).

30tailEco (inicia 50 pb arriba del sitio de restricción *AatII*, único en pT4Bla):

5'- CCGTGGATGGTGGTTCTGCTTTCCCGGAGCA -3'

SDpdcNde (contiene 10 pb homólogas a pT4Bla; el RBS modificado, y 18 pb correspondientes al inicio de *pdc*, insertando 5 mutaciones puntuales para generar un sitio *NdeI* -traducidas en 1 mutación sinónima y un cambio de aminoácido (valina por tirosina):

5'- ACCGACAACATATGACATTTTCCTTTTTTTTTTATTATTGAAGC -3'

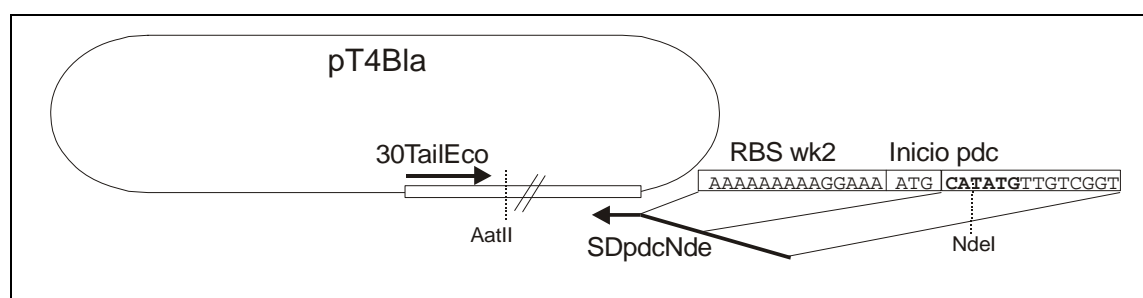


Figura 25. Amplificación del fragmento FR-wk con el RBS modificado y el inicio de *pdc*.

Se reamplificó el fragmento FR-wk con los oligonucleótidos 30TailEco y pdcNdeR para incluir otras 20 pb de *pdc*, y así, generar una zona homóloga a *pdc* más amplia (de 38 pb en vez de 18 pb).

pdcNdeR:

5'- CGCTCCGCTAAATAGGTACCGACAACATATGACAT -3'

El segundo fragmento (FR-pdc), que contiene a *pdc*, se amplificó con los oligonucleótidos BpdcNde y EpdcXho usando al plásmido pTrcPDC como molde.

BpdcNde:

5'- ATGTCATATGTTGTCGGTACCTATTTAGCG -3'

EpdcXho (corresponde al final de *pdc*, que inserta además el sitio de restricción *Xho*):

5'- CTCGAGCTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGGAGCTTGTTAAC -3'

El fragmento completo (que contiene el RBS modificado seguido del gen *pdc* completo) se obtuvo usando como moldes FR-wk y FR-*pdc*; y como iniciadores 30tailEco y EpdcXho, obteniendo alta eficiencia en la síntesis del fragmento de aprox. 1.9 kb (Figura 26).

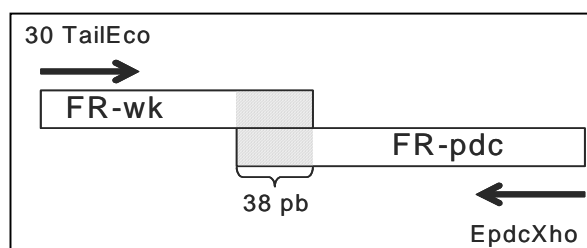


Figura 26. Síntesis del fragmento que contiene a *pdc* con el RBS modificado, usando dos moldes, y dos iniciadores sintéticos.

Este fragmento digerido *Aat*II-*Xho* se ligó con el plásmido pT4Bla digerido con las mismas enzimas, para obtener el plásmido pT4PDCwk (3.8 kb), que tiene las siguientes características: un RBS débil (wk2), el gen *pdc* completo escindible mediante digestión con *Nde*I y *Xho*I, además de una etiqueta de 6 codones de histidina. Se verificó la construcción pT4PDCwk, secuenciando desde el promotor hasta 760 pb de *pdc*, con lo cual se confirmaron las características mencionadas.

Para tener al operón *pet* completo, se introdujo además el gen *adhB*, que se sintetizó por PCR partiendo de pTrcPET como molde, usando los oligonucleótidos:

BadhXho: 5'- CCGCTCGAGCTAGTATGTAGGGTGAGGTTATAGCTATG -3'

EadhSp: 5'- ACTAGTCTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAAAGCGCTC -3'

El fragmento obtenido se digirió *Xho*I-*Spe*I, al igual que el plásmido

pT4PDCwk. Mediante la reacción de la ligasa, se obtuvo el plásmido pT4PETwk (Figura 27), con las mismas características que pT4PDCwk, pero que contiene además el gen *adhB*.

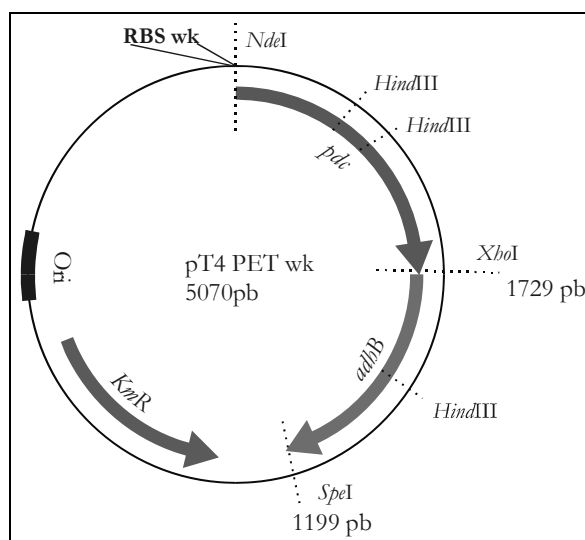


Figura 27. Plásmido pT4PETwk

Los plásmidos construidos se evaluaron por complementación del crecimiento anaerobio de la cepa *E. coli* VAL23. De acuerdo a los resultados, el plásmido pT4PETwk no le proporciona a la cepa una ventaja en crecimiento anaerobio, puesto que su fenotipo fue de crecimiento muy lento (en medio sólido); a las 48 h se observaron colonias muy pequeñas, características de la cepa *E. coli* VAL23 sin una vía alterna de regeneración de NAD^+ . Sin embargo, cabe notar que el fenotipo de la doble mutante no es de nulo crecimiento (Donnelly *et al.* 1998) y es posible observar crecimiento cuando se cultiva por tiempos prolongados (72 h). Lo que nos indica este resultado, es que la PDC contenida en el plásmido pT4PETwk no se expresa a niveles suficientes para recuperar el equilibrio REDOX de la célula por la vía de conversión de piruvato a etanol.

No se logró detectar actividad de PDC en extractos celulares (provenientes de cultivos aerobios); para comprobar la presencia de la proteína, se realizó una inmunodetección contra la etiqueta de histidinas, encontrando que se expresa a niveles muy bajos (Figura 28).

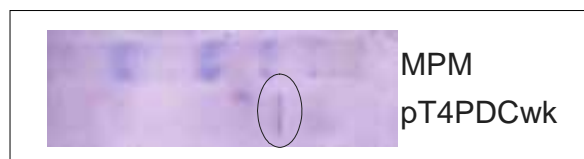


Figura 28. Western blot del extracto celular de *E. coli* VAL23 expresando el plásmido pT4PDCwk

Con los vectores construidos, es ahora posible aumentar la sensibilidad del método de selección, puesto que la proteína parental le confiere a la célula un crecimiento muy pobre en anaerobiosis. Antes de clonar bancos de *pdC* en los vectores, se analizó la pertinencia de continuar con PDC como proteína modelo.

La PDC de *Z. mobilis* se usó en la primera parte del trabajo como proteína modelo para determinar la relación entre la velocidad de crecimiento y la actividad enzimática, este resultado se obtuvo al modular la expresión de la proteína. Las ventajas de este modelo fueron que los niveles de expresión de la enzima no causaron sobrecarga metabólica ni limitación del crecimiento de la bacteria. En el primer banco generado por DNA shuffling, no se encontraron variantes con mejores propiedades catalíticas. El siguiente paso para lograr explorar un mayor espacio de secuencia es generar un nuevo banco, aumentando la tasa de mutagénesis o cambiando el método de generación de diversidad; además de clonar en un vector como pT4PETwk con el que el nivel de expresión es lo suficientemente bajo como para encontrar variantes mejoradas.

De acuerdo a los resultados obtenidos del primer banco de variantes en PDC, cuya tasa de mutagénesis fue de 1.4 mutaciones por kilobase, se infiere que se requiere de una exploración de un espacio de secuencia más amplio, puesto que el incremento en la actividad específica de las variantes arriba mencionadas, fue de apenas 1.5 veces, es decir, muy cercana a la actividad desarrollada por la enzima parental que además, de acuerdo a los resultados, la expresión de la proteína fue el factor clave en este incremento.

Predecir si un problema particular puede ser resuelto por evolución dirigida, depende en cierta medida, de cuán fuerte ha actuado la evolución natural hacia la proteína. Si la característica medida ya se encuentra bajo presión de selección, es muy difícil que puedan obtenerse posteriores mejoras en el laboratorio (Arnold 2008).

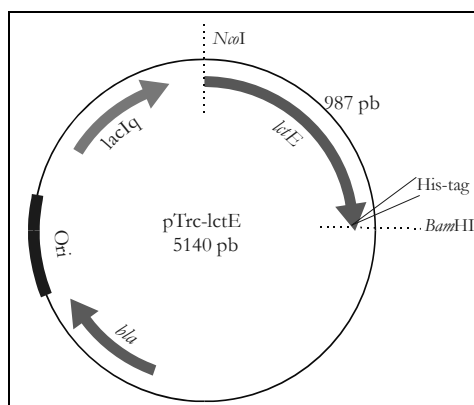


Figura 29. Plásmido pTrc-lctE.

La variante LDH D38G (equivalente a la D52G de *B. subtilis*) se construyó mediante la técnica de “overlapping PCR”; los oligonucleótidos usados para producir el primer fragmento que se sobrelapa fueron:

BldhNc (descrito arriba).

36LDHBs 5'-GCTTTTTCTTTATTTAC**ACCA**TGACCACAAGCTCA (la mutación se marca en negritas).

Y para el segundo fragmento:

36LDH2 5'-GAGCTTGTGGTCATT**GGT**GTAAATAAA-GAAAAAGCA

EldhBm (descrito arriba).

Al determinar los parámetros catalíticos de la variante LDH D38G, comparada con la LDH parental (WT), se encontró que la K_{cat}/K_m también es afectada fuertemente (6.3×10^5 y $2.8 \times 10^4 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ para LDH-WT y LDH-D38G respectivamente). Al comparar cultivos de *E. coli* VAL23 transformada con el vector portador de dicha variante (pTrclctE-G38) y con la silvestre (pTrclctE-WT) se observa una notable disminución del tamaño de las colonias formadas en condiciones de anaerobiosis (Figura 30).

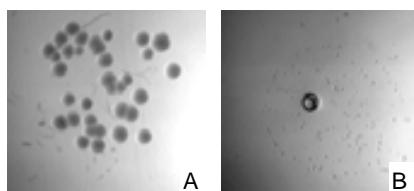


Figura 30. Cultivos sólidos anaerobios LB, Na_2CO_3 4 g/l y glucosa 2 g/l sin inductor. *E. coli* VAL23 expresando: A. LDH WT, B. LDH G38

Al trabajar con VAL23-pTrclctE, se encontró también que, a diferencia de PDC, la expresión de esta enzima LDH en *E. coli* tiene un efecto tóxico, lo cual se hace evidente al sobreexpresar la proteína aumentando la concentración del inductor (Figura 31).

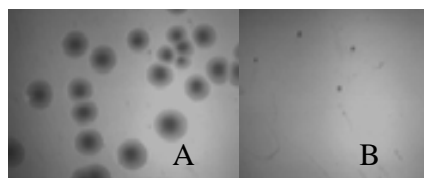


Figura 31. Efecto de la sobreexpresión de LDH de *B. subtilis* en *E. coli* VAL23 transformada con pTrclctE. Cultivos anaerobios LB, Na₂CO₃ 4 g/l y Glc 2 g/l. A. Sin inductor, B. IPTG 0.1 mM

9.8 Evolución dirigida de LDH

La disminución de crecimiento de *E. coli* VAL23 con pTrclctE que se observó al agregar inductor al medio de cultivo, indica una sobrecarga metabólica para la bacteria cuando aumenta la expresión de la proteína. Con la finalidad de disminuir o eliminar dicho efecto, se generó un banco genómico mediante “error prone PCR” y se seleccionó en anaerobiosis, en presencia de IPTG.

De la selección en caja pudieron distinguirse clones que en condiciones de inducción claramente tuvieron mayor crecimiento. Las variantes 6T3 y 2P, disminuyeron notablemente el efecto negativo de crecimiento que presenta la WT

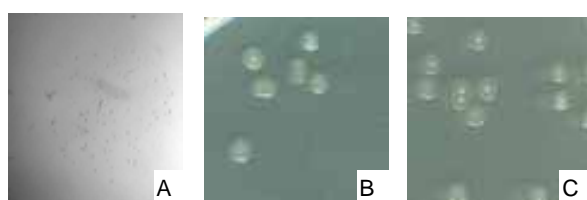


Figura 32. Selección anaerobia de variantes de LDH obtenidas por evolución dirigida en *E. coli* VAL23. Cultivos en medio sólido LB, 4 g Na₂CO₃ 4 g/l y Glc 20 g/l y 0.1 mM IPTG . A. WT (amplificación 2X), B. 6T3, C. 2P.

Las dos variantes 6T3 y 2P se caracterizaron en cultivos líquidos microaerobios con y sin inductor a pH controlado (M9, Glc 40 g/l, pH 7.0). En la Figura 33 se puede observar que el crecimiento de 6T3 y 2P es menos afectado por la presencia del inductor que la WT (los valores de μ sin IPTG fueron: WT,

0.06; 6T3, 0.09 y 2P, 0.08 h⁻¹, mientras que con IPTG se obtuvieron: WT, 0.037; 6T3, 0.11 y 2P, 0.08 h⁻¹)

La producción de lactato en presencia de inductor de las variantes mejora con respecto a la WT pero tiene rendimientos inferiores comparados con los obtenidos en ausencia de inductor. Por lo que inferimos que las variantes expresadas en *E. coli* VAL23, en presencia de IPTG, siguen ocasionando un desequilibrio en la célula, que sin embargo, es menor que el observado con la proteína parental.

Es importante señalar que en el experimento mostrado en la Figura 33 no podemos relacionar el crecimiento exclusivamente a la regeneración de NAD⁺ puesto que no se trata de cultivos anaerobios sino microaerobios. En la siguiente sección (Figura 34), se muestra que la actividad obtenida con LDH-WT en el mismo vector, sin inductor; está por arriba del rango en el cual la relación con la velocidad de crecimiento es lineal. Por lo que un aumento en la expresión de la proteína y por lo tanto en la actividad específica ya no le proporciona una ventaja de crecimiento a la célula. El efecto que estamos observando aquí es de disminución del daño que provoca a la célula la expresión de la proteína recombinante.

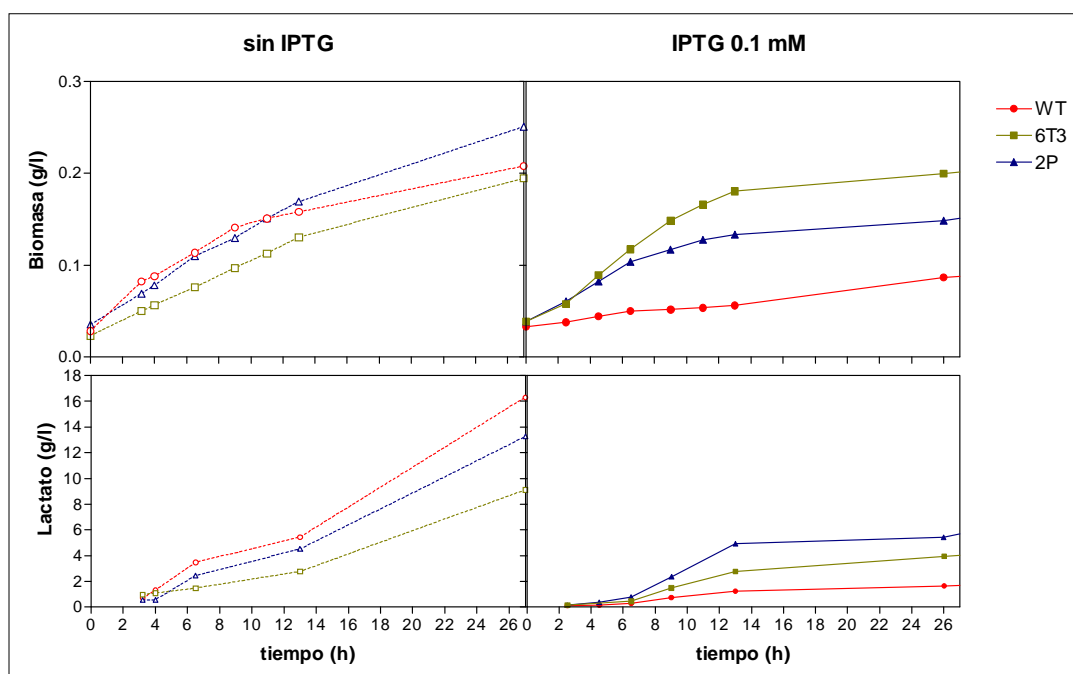


Figura 33. Cultivos microaerobios de *E. coli* VAL23 pTrclctE (medio mineral, Glc 40 g/l) con las variantes en LDH 6T3, 2P y la parental.

Bajando el nivel de expresión de la proteína, podría continuarse la selección de variantes que no generen efectos negativos cuando se expresan de manera heteróloga y que además mejoren los rendimientos en la producción de metabolitos.

9.9 Mutagénesis a saturación en la posición G38 de la LDH

Partiendo de la mutante LDH G38 (expresada en pTrclctE-G38), se realizó una mutagénesis a saturación en la posición 38 por PCR (Merino *et al.* 1992) para permitir que el sistema de selección identificara cuál de las posibles sustituciones recupera la actividad de la enzima y por lo tanto permite un mejor crecimiento de las bacterias en condiciones anaeróbicas. El banco resultante de la mutagénesis a saturación se utilizó para transformar a *E. coli* VAL23, y se seleccionó en medio sólido LB-glucosa, adicionado con Na₂CO₃ (como amortiguador), sin IPTG y bajo condiciones anaerobias. El tamaño de colonia, y por consecuencia, la velocidad de regeneración de NAD⁺, fue el criterio de selección. De las candidatas seleccionadas y secuenciadas, se detectaron 3 sustituciones: G38A, G38C, G38E y el aminoácido silvestre recuperado: G38D. Sin presión de selección se aislaron clonas que se secuenciaron posteriormente. Del análisis de la secuencia, se encontró que aparece la mayoría de los 20 aminoácidos posibles, sin embargo, sólo las clonas que contienen las sustituciones originalmente seleccionadas en anaerobiosis (G38A, G38C, G38E G38D) son capaces de crecer en condiciones anaerobias. Cada una de estas variantes expresadas en *E. coli* VAL23 se evaluó en cultivo líquido anaerobio (LB, Na₂CO₃ 4 g/l, Glc 2 g/l, Ap, pH 7, sin IPTG), encontrando que la velocidad de crecimiento calculada correlaciona con el tamaño de colonia observado en caja.

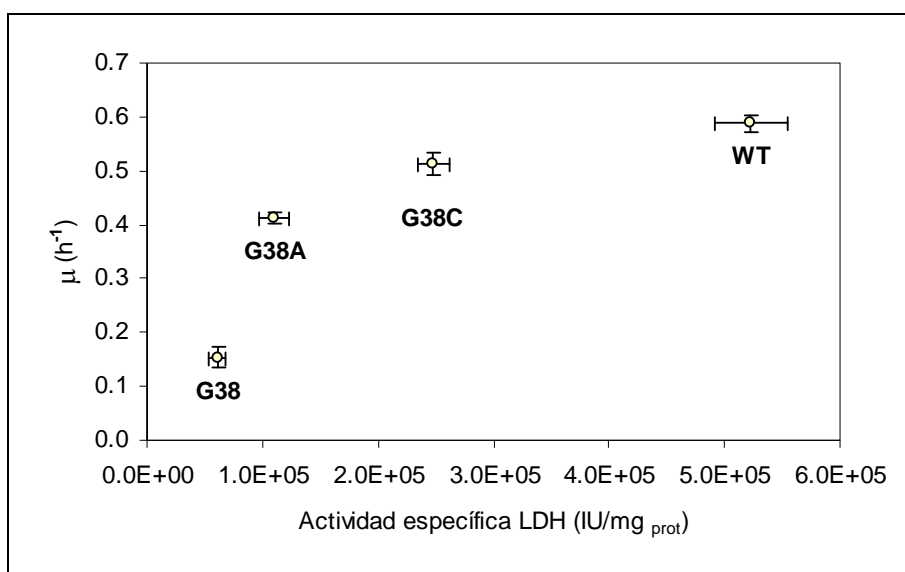


Figura 34. Relación entre la velocidad de crecimiento anaerobio y la actividad de variantes de LDH G38 contenidas en *E. coli* VAL23.

Nota: μ : promedio de 4 cinéticas (LB-Glc 2g/l, sin IPTG). Actividad específica: promedio de al menos tres mediciones de actividad con las enzimas purificadas.

Se determinó la actividad específica de las proteínas arriba mencionadas, partiendo de las enzimas purificadas, puesto que los extractos crudos contienen otras actividades deshidrogenasas que dificultan la evaluación. Los datos se presentan en la Figura 34 donde se evidencia nuevamente la relación que existe entre la velocidad de crecimiento y la velocidad de regeneración de NAD^+ , que en este caso está controlada por la actividad limitante LDH. Este resultado comprueba la utilidad de nuestro método de selección basado en crecimiento.

10 CONCLUSIONES

1. Se comprobó la relación entre la velocidad de crecimiento y la actividad específica responsable de regenerar NAD^+ en condiciones anaerobias
2. Se desarrolló un método de selección de variantes de enzimas fermentativas basado en la velocidad de crecimiento.
3. El método se retó para dos enzimas fermentativas: PDC de *Z. mobilis* y LDH *B. subtilis*.
4. Para PDC se obtuvieron cepas con mayores actividades, debidas a una mejora en los niveles de producción de la enzima.
5. Se identificaron mutantes de LDH de *B. subtilis* que permiten disminuir el efecto tóxico de la sobreexpresión de esta proteína en *E. coli*.
6. Para LDH se identificaron variantes que mejoraron la catálisis usando como punto de partida una mutante deficiente en la unión de NAD (D38G).

11 PERSPECTIVAS

Aplicar el método en un esquema de cultivo continuo. En un quimiostato las clonas que contienen variantes con mejores propiedades catalíticas se seleccionan, mientras que las desfavorecidas se “lavan” del reactor. Este esquema se probó con otra cepa etanológica (*E. coli* KO11) en tanques pequeños con 700 ml de medio, las variaciones de la velocidad de dilución fueron de 0.05 h^{-1} . La μ_{max} para esta cepa se determinó en 0.35 h^{-1} . Por lo que metodológicamente es posible manejar el rango de velocidades observadas por *E. coli* VAL23 que como se demuestra tiene una relación lineal entre la actividad específica y μ a valores de 0.2 a 0.5 h^{-1} .

Generar bancos de PDC con mayor tasa de mutagénesis, e insertarlos en el vector de baja expresión pT4PETwk. Con una tasa de mutagénesis más alta, sería posible explorar un espacio de secuencia más amplio, para determinar si la PDC de *Z. mobilis* es aún posible de mejora. El vector de baja expresión permite mayor sensibilidad puesto que descarta actividades parecidas a la WT.

Emplear el método para estudios estructura - función de enzimas deshidrogenasas. La malato deshidrogenasa (MDH) y la LDH son miembros de una familia homóloga funcional de deshidrogenasas, ambas enzimas tienen alta especificidad de sustrato. Recientemente se ha logrado por mutagénesis sitio-dirigida cambiar la especificidad de sustrato de la MDH para convertirla en LDH, pero aún con baja eficiencia de conversión. Con el método reportado en este trabajo es posible seleccionar variantes con mejores rendimientos.

Secuenciar el plásmido pTrcPDCG12 completo para determinar con exactitud el cambio que originó un aumento en la expresión de la proteína.

Identificar las mutaciones LDH 2P y 6T3. Evaluar el efecto de cada una de las mutaciones que disminuyeron la toxicidad de LDH, y aplicar otro ciclo de evolución para incrementar la producción de lactato

12 REFERENCIAS.

[1] Alexeeva S, de Kort B, Sawers G, Hellingwerf KJ, Texeira de Mattos MJ (2000) Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 4934-4940.

[2] Altaras NE, Cameron DC (2000) Enhanced production of (R)-1,2-propanediol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 16: 940-946.

[3] Arjunan P, Umland T, Dyda F, Swaminathan S, Furey W, Sax M, Farrenkopf B, Gao Y, Zhang D, Jordan F (1996) Crystal structure of the thiamin diphosphate-dependent enzyme pyruvate decarboxylase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 256: 590-600.

[4] Arnold, F (2008) <http://www.che.caltech.edu/groups/fha/>

[5] Bailey J (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 252: 1668-1674.

[6] Berg, C (2000) <http://distill.com/berg/>

[7] Bernard N, Ferain T, Garmyn D, Hols P, Delcour J (1991) Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 290: 61-64.

[8] Böck A, Sawers G (1996) Fermentation. In: Neidhardt FC, Curtiss RI, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schacchter M, & Umberger HE, eds. *Escherichia coli and Salmonella cellular and molecular biology*, Washington D.C.: ASM .

[9] Brau B, Sahm H (1986) Cloning and expression of the structural gene of pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 144: 296-301.

[10] Breuer M, Pohl M, Hauer B, Lingen B (2002) High-throughput assay of (R)-phenylacetylcarbinol synthesized by pyruvate decarboxylase. *Anal. Bioanal. Chem.* 374: 1069-1073.

[11] Bringer-Meyer S, Sahm H (1988) Acetoin and phenylacetylcarbinol formation by the pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biocatalysis.* 1: 321-331.

- [12] Bunch PK, Mat-Jan F, Lee N, Clark DP (1997) The *IdhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology-(UK)*. 143: 187-195.
- [13] Burchhardt G, Ingram LO (1992) Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1128-1133.
- [14] Candy JM, Duggleby RG (1998) Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1385: 323-338.
- [15] Chandra Raj K, Ingram LO, Maupin-Furlow JA (2001) Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by *Acetobacter pasteurianus*. *Arch. Microbiol.* 176: 443-451.
- [16] Chandra Raj K, Talarico LA, Ingram LO, Maupin-Furlow JA (2002) Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gen (pdc) and comparison to bacterial homologues. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2869-2876.
- [17] Chang AK, Nixon PF, Duggleby RG (1999a) Aspartate-27 and glutamate-473 are involved in catalysis by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Biochem. J.* 339: 255-260.
- [18] Chang AK, Nixon PF, Duggleby RG (2000) Effects of deletions at the carboxyl terminus of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase on the kinetic properties and substrate specificity. *Biochemistry.* 39: 9430-9437.
- [19] Chang DE, Jung HC, Rhee JS, Pan JG (1999b) Homofermentative production of D- or L- lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1384-1389.
- [20] Claasen PAM, van Lier JB, Lopez Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams AJM, de Vries SS, Weusthuis RA (1999) Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 741-755.
- [21] Clark DP (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 223-234.
- [22] Conway T, Osman YA, Konnan JI, Hoffmann EM, Ingram LO (1987) Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J. Bacteriol.* 169: 949-954.

-
- [23] Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 258-266.
- [24] Dien BS, Hespell RB, Wyckoff HA, Bothast RJ (1998) Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 366-371.
- [25] Dien BS, Iten LB, Bothast RJ (1999) Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *E. coli* strain FBR3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22: 575-581.
- [26] Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ (2001) Recombinant *Escherichia coli* engineered for production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 259-264.
- [27] Dien BS, Nichols NN, Bothast RJ (2002) Fermentation of sugar mixtures using *Escherichia coli* catabolite repression mutants engineered for production of L-lactic acid. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29: 221-227.
- [28] Dien BS, Nichols NN, O'Bryan PJ, Bothast RJ (2000) Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 181-196.
- [29] Dobritzsch D, König S, Schneider G, Lu G (1998) High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J. Biol. Chem.* 273: 20196-20204.
- [30] Donnelly MI, Millard CS, Clark DP, Chen MJ, Rathke JW (1998) A novel fermentation pathway in an *Escherichia coli* mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-2: 187-198.
- [31] ElHawrani AS, Sessions RB, Moreton KM, Holbrook JJ (1996) Guided evolution of enzymes with new substrate specificities. *J. Mol. Biol.* 264: 97-110.
- [32] Garmyn D, Ferain T, Bernard N, Hols P, Delcour J (1995a) Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 266-272.
- [33] Garmyn D, Ferain T, Bernard N, Hols P, Delplace B, Delcour J (1995b) *Pediococcus acidilactici* *ldhD* gene: cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* 177: 3427-3437.
- [34] Garvie EI (1980) Bacterial Lactate Dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* 44: 106-139.
- [35] Goetz G, Iwan P, Hauer B, Breuer M, Pohl M (2001) Continuous
-

production of (R)-phenylacetylcarbinol in an enzyme-membrane reactor using a potent mutant of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 317-325.

[36] Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Liden G, Zacchi G (2008) Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24: 549-556.

[37] Hahn-Hägerdal B, Jeppson H, Olsson L, Mohagheghi A (1994) An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing microorganisms in a xylose rich acid hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 62-72.

[38] Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Valle F, Gosset G (2003) Expression of galP and glk in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 687-94.

[39] Hespell RB, Wyckoff H, Dien BS, Bothast RJ (1996) Stabilization of pet operon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lacking lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4594-4597.

[40] Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D (2006) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 11206-11210.

[41] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 87-107.

[42] Holmberg N, Ryde U, Bülow L (1999) Redesign of the coenzyme specificity in L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* using site-directed mutagenesis and media engineering. *Protein eng.* 12: 851-856.

[43] Hong SH, Lee SY (2000) Metabolic flux distribution in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain producing succinic acid. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 10: 496-501.

[44] Hoppner TC, Doelle HW (1983) Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxilase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 152-157.

- [45] Huang CY, Chang AK, Nixon PF, Duggleby RG (2001) Site-directed mutagenesis of the ionizable groups in the active site of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase: effect on activity and pH dependence. *Eur. J. Biochem.* 268: 3558-3565.
- [46] Ingram LO, Conway T (1988) Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 397-404.
- [47] Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewel GW, Preston JF (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2420-2425.
- [48] Inoue Y, Kimura A (1995) Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 177-227.
- [49] Jeffries TW, Jin YS (2004) Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 494-509.
- [50] Jensen KF (1993) The *Escherichia coli* Kr12 "wildtypes" W3110 and MG1655 have a *rph* frameshift mutation that lead to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriol.* 175: 3401-3407.
- [51] Killenberg-Jabs M, König S, Eberhardt I, Hohmann S, Hubner G (1997) Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxylase from yeast studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* 36: 1900-1905.
- [52] König S, Hubner G, Schellenberger A (1990) Cross-linking of pyruvate decarboxylase. Characterization of the native and substrate-activated enzyme states. *Biomed. Biochim. Acta.* 49: 465-471.
- [53] Kötter P, Ciriacy M (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 776-783.
- [54] Kuyper M, Harhangi HR, Stave AK, Winkler AA, Jetten MS, de Laat WT, den Ridder JJ, Op den Camp HJ, van Dijken JP, Pronk JT (2003) High level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?. *FEMS Yeast Res.* 4: 69-78.
- [55] Lara AR, Vazquez-Limon C, Gosset G, Bolivar F, Lopez-Munguia A, Ramírez OT (2006) Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 1164-1175.

[56] Lawford HG, Rousseau JD (1995) Loss of ethanogenicity in *Escherichia coli* B recombinants pLOI297 and KO11 during growth in the absence of antibiotics. *Biotechnol. Lett.* 17: 751-756.

[57] Lawford HG, Rousseau JD (1996) Factors contributing to the loss of ethanogenicity of *E. coli* recombinants pLOI297 and KO11. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57/58: 277-292.

[58] Link AJ, Phillips D, Church GM (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179: 6228-6237.

[59] Martinez A, York SW, Yomano LP, Pineda VL, Davis FC, Shelton JC, Ingram LO (1999) Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdg*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 15: 891-897.

[60] Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 171: 342-348.

[61] Merino E, Osuna J, Bolivar F, Soberon X (1992) A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. *Biotechniques.* 12: 508-510.

[62] Mills DR, Peterson RL, Spiegelman S (1967) An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58: 217-224.

[63] Mohagheghi A, Evans K, Chou YC, Zhang M (2002) Cofermentation of glucose, xylose and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 885-898.

[64] Moyle H, Waldburger C, Susskind MM (1991) Hierarchies of base pair preferences in the P22 ant promoter. *J. Bacteriol.* 173: 1944-1950.

[65] Neale AD, Scopes RK, Wettenhall RE, Hoogenraad NJ (1987a) Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. *Nucleic Acids Res.* 15: 1753-1761.

[66] Neale AD, Scopes RK, Wettenhall RE, Hoogenraad NJ (1987b) Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 1024-1028.

- [67] Neuenschwander M, Butz M, Heintz C, Kast P, Hilvert D (2007) A simple selection strategy for evolving highly efficient enzymes. *Nat. Biotechnol.* 25: 1145-1147.
- [68] Nichols NN, Dien BS, Bothast RJ (2001) Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 120-125.
- [69] Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT, Ingram LO (1991) Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 893-900.
- [70] Ostendorp R, Liebl W, Schuring H, Jaenicke R (1993) The L-lactate dehydrogenase gene of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* cloned by complementation in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry.* 216: 709-715.
- [71] Osuna J, Perez-Blancas A, Soberon X (2002) Improving a circularly permuted TEM-1 β lactamase by directed evolution. *Protein eng.* 15: 463-470.
- [72] Pohl M (1997) Protein design on pyruvate decarboxylase (PDC) by site-directed mutagenesis. Application to mechanistical investigations, and tailoring PDC for the use in organic synthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58: 15-43.
- [73] Reid MF, Fewson CA (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 13-56.
- [74] Romero S, Merino E, Bolivar F, Gosset G, Martinez A (2007) Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: Lactate dehydrogenase plays a key role in the fermentative metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5190-5198.
- [75] Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Spring Harbor Laboratory Press.
- [76] Schar HP, Zuber H, Rossman MG (1982) Crystallization of lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* 154: 349-353.
- [77] Singh SK, Ahmed SU, Pandey A (2006) Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.* 41: 991-1000.
- [78] Skory CD (2000) Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 2343-

2348.

[79] Stemmer WP (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 10747-10751.

[80] Stephanopoulos G, Simpson TW (1997) Flux amplification in complex metabolic networks. *Chem. Eng. Science.* 52: 2607-2627.

[81] Stols L, Donnelly MI (1997) Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2695-2701.

[82] Tarmy EM, Kaplan NO (1968) Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 243: 2579-2586.

[83] Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 4350-4354.

[84] Tsotsou GE, Cass AEG, Gilardi G (2002) High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosens. Bioelectr.* 17: 119-131.

[85] Underwood SA, Buszko ML, Shanmugam KT, Ingram LO (2002a) Flux through citrate synthase limits the growth of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1071-1081.

[86] Underwood SA, Zhou S, Causey TB, Yomano LP, Shanmugam KT, Ingram LO (2002b) Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6263-6272.

[87] Vellanoweth RL, Rabinowitz JC (1992) The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. *Mol Microbiol.* 6: 1105-1114.

[88] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E (2002) Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 28: 325-332.

[89] Walfridsson M, Bao X, Anderlund M, Lilius G, Bülow L, Hahn-Hägerdal B (1996) Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harbouring

the *Thermus thermophilus xylA* gene which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4648-4651.

[90] Wong TS, Zhurina D, Schwaneberg U (2006) The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb. Chem. High Throughp. Screen.* 9: 271-288.

[91] Wu YG, Chang AK, Nixon PF, Li W, Duggleby RG (2000) Mutagenesis at asp27 of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Effect on its ability to form acetoin and acetolactate. *Eur. J. Biochem.* 267: 6493-6500.

[92] Wyckoff HA, Chow J, Whitehead TR, Cotta MA (1997) Cloning, sequence, and expression of the L-(+) lactate dehydrogenase of *Streptococcus bovis*. *Current Microbiology.* 34: 367-373.

[93] Yoshida A (1965) Enzymic properties of lactate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 99: 66-77.

[94] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17-34.

[95] Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO (2003a) Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 399-407.

[96] Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO (2003b) Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2237-2244.

13 ANEXO.

ARTICULO:

Vazquez-Limon,C. Vega-Badillo,J. Martinez,A. Espinosa-Molina,G. Gosset,G. Soberon,X. Lopez-Munguia,A. Osuna,J. (2007). Growth rate of a non-fermentative *Escherichia coli* strain is influenced by NAD⁺ regeneration. *Biotechnol.Lett.* 29 1857-1863

Growth rate of a non-fermentative *Escherichia coli* strain is influenced by NAD⁺ regeneration

Consuelo Vázquez-Limón · Joel Vega-Badillo · Alfredo Martínez · Gabriela Espinosa-Molina · Guillermo Gosset · Xavier Soberón · Agustín López-Munguía · Joel Osuna

Received: 4 June 2007 / Accepted: 26 June 2007 / Published online: 13 October 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract By complementing a non-fermentative *Escherichia coli* (*ldhA*⁻ *pflB*⁻) strain with the recombinant *Zymomonas mobilis* ethanol pathway (*pdC*, *adhB*), we evaluated the effect of different levels of enzymatic activity on growth rate demonstrating that there is a direct relationship between anaerobic growth rate and the total specific activity of pyruvate decarboxylase, which is the limiting enzyme of this specific fermentative NAD⁺ regenerating pathway. This relationship was proved to be useful to establish a selection strategy based on growth rate for the analysis of *lctE* libraries, which encode lactate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*.

Keywords Growth rate control · Lactate dehydrogenase · NAD⁺ regeneration · Non-fermentative *Escherichia coli* · Pyruvate decarboxylase

Introduction

Escherichia coli as a facultative anaerobe can operate under aerobic or anaerobic conditions, its energetic

metabolism in each condition diverges at the fate of the pyruvate obtained by glycolysis (Clark 1989). During fermentation neither the respiratory chain linked to O₂ nor those linked to alternative electron acceptors, such as nitrate, fumarate or trimethylamine oxide, are functional (White 1999). However growth under such fermentative conditions requires that *E. coli* reoxidizes NADH and restores NAD⁺ so that ATP synthesis by substrate level phosphorylation during glycolysis can continue. Thus, the key issue in fermentation is the recycling of NADH through conversion of pyruvate to fermentation products. (Clark 1989).

The two major pathways in *E. coli* for the formation of terminal fermentation products are the direct conversion of pyruvate to lactate, which is carried out in a single step catalyzed by lactate dehydrogenase (LDH), and the splitting of pyruvate into acetyl coenzyme A and formate by means of pyruvate formate lyase (PFL); with subsequent conversion of acetyl coenzyme A to approximately equal amounts of ethanol and acetate (Böck and Sawers 1996). Therefore, *E. coli* double mutants lacking *ldhA* and *pflB* are unable to regenerate the NAD⁺ used by glycolysis, rendering the cells incapable of fermentative growth on glucose or other sugars even when supplemented with acetate (Bunch et al. 1997; Mat-Jan et al. 1989). This fermentative defect can be offset by an alternative enzymatic activity that could restore the pyruvate channeling towards NAD⁺ regeneration. As in the case of

C. Vázquez-Limón · J. Vega-Badillo · A. Martínez · G. Espinosa-Molina · G. Gosset · X. Soberón · A. López-Munguía · J. Osuna (✉)
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apartado Postal 510-3,
Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico
e-mail: joel@ibt.unam.mx

metabolically-engineered strains containing the PET-operon, i.e. pyruvate decarboxylase (*pd*c) and alcohol dehydrogenase (*adh*B) from *Zymomonas mobilis*, which efficiently convert pyruvate to ethanol and regenerate NAD⁺ (Hespell et al. 1996). Besides, plasmids coding for activities that complement anaerobic growth in these strains are highly stable as their loss is lethal for the double mutant viability (Hespell et al. 1996).

As these strains lack the two most important anaerobic pathways, interest has been focused on redirecting fermentative metabolism so, when the proper enzymatic activity is given, the corresponding metabolite can be produced with high efficiency and low by-product amounts. However, the influence of each complementing pathway on growth rate has not been evaluated comprehensively. As it has already been demonstrated in different reports using these non-fermentative mutants, any pathway that restores the redox equilibria also restores anaerobic growth (Altaras and Cameron 2000; Boernke et al. 1995; Garmyn et al. 1995; Hespell et al. 1996; Stols and Donnelly 1997). Based on this fact, we hypothesized that the rate at which NAD⁺ is regenerated should influence the rate of ATP generation by glucose catabolism. Therefore, if there is no flux control in another step in glycolysis, there should be a direct correlation between growth rate and the enzymatic NAD⁺ regeneration rate. To evaluate this hypothesis we modulated the recombinant PDC activity on the *E. coli* *ldhA*⁻, *pflB*⁻ mutant, finding increased growth rates at higher levels of PDC activity. As a proof of this concept, growth rate was used as a criterion for the selection of two LDH libraries. A saturation mutagenesis at position 38 of a NADH-binding deficient LDH (D38G LDH from *B. subtilis*) (Holmberg et al. 1999) was carried out to find variants that allow bacteria to grow faster than clones containing the single D38G mutant. A second library was intended to remove the bacterial toxicity observed when the recombinant *B. subtilis* LDH is over-expressed in *E. coli*.

Materials and methods

Strains, plasmids and growth media

Strain *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) was used for plasmid conservation. Strain *E. coli* VAL23 is a

double mutant (*ldhA*⁻, *pflB*⁻), constructed from *E. coli* W3110. (Lara et al. 2006)

Plasmid pLOI510 (Ohta et al. 1991), was used as template for amplification of PET operon genes, i.e. *pd*c (pyruvate decarboxylase) and *adh*B (alcohol dehydrogenase) from *Zymomonas mobilis*. Plasmid pTrc99A (Pharmacia Biotech) was used for cloning *pd*c, *adh*B and *lctE*.

Strains were grown on Luria Broth medium (Sambrook and Russell 2001), containing 200 mg ampicillin/l when appropriate. For the expression of fermentative enzymes under anaerobic conditions, media were supplemented with glucose and isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as indicated.

Microaerobic cultures were carried out on fleakers with M9 minimal medium (Sambrook and Russell 2001) supplemented when appropriate with glucose, ampicillin or IPTG.

Solid anaerobic cultures were grown on anaerobic jars, in H₂CO₂ atmosphere, using a Gas-Pak kit (Becton -Dickinson). For anaerobic growth on liquid media, rubber stoppered tubes were flushed with nitrogen gas, filled with 5 ml of previously degassed broth (boiled and flushed with nitrogen), sealed and sterilized.

DNA manipulations

Standard procedures were used for plasmid preparation, restriction enzyme digestion, ligation, transformation, and gel electrophoresis (Sambrook and Russell 2001).

Plasmids pTrcPET, pTrcpdc, and pTrclctE

Plasmids pTrcpdc and pTrcPET were constructed by inserting *pd*c, and *pd*c-*adh*B into the expression vector pTrc99A. Genes were amplified by PCR using the plasmid pLOI510 as template. The oligonucleotides were designed to include appropriate restriction sites and a C-terminal polyhistidine tag. An internal *Nco*I site on *pd*c was eliminated using the quick-change site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The oligonucleotides used for *pd*c amplification were BpdcNco: 5'-GGAGTAAGCCATGGGTTATACTGTCGGTACC, and EpdcBm: 5'-CGCGCGGATCCC TATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAGGAGCTTGTTAAC; for *adh*B, BadhBm: 5'-GCCGCGGATCCCTAGTATGTAGGGTGAGGTTATAG and

EadhHd: 5'-CCCAAGCTTCTATTAGTGGTGGTG GTGGTGGTGAAAGCGCTCAGGAA.

pTrclctE was constructed by inserting *lctE* (from *Bacillus subtilis*) into pTrc99A at NcoI and BamHI restriction sites. *lctE* was amplified by PCR using plasmid pUCIdh (Romero et al. 2007) as template. The oligonucleotides used were: BldhNc 5'-CATGCCA TGGTGAACAAACATGTAAATAAAGTAGC and EldhBm 5'-CGCGGATCCCTATTAGTGGTGGTG GTGGTGGTGGTTGACTTTTTTGTCTGC.

lctE libraries building

The LDH D38G site directed variant was constructed by overlapping PCR; the oligonucleotides used to produce the overlapped fragments were: (1) BldhNc (described above) and 36LDHBs 5'-GCTTTTTCT TTATTTACACCAATGACCACAAGCTCA (mutation is boldfaced) and (2) 36LDH2 5'-GAGC TTGTGGTCATTGGTGTAATAAAGAAAAAG CA and EldhBm (described above).

Saturation mutagenesis at position 38 of LDH G38 was done by PCR-based mutagenesis (Merino et al. 1992) using the following oligonucleotides: Tail99N-co 5'-AGCCGTGGATCGTGGGCGCCGACATCAT AACGGTTCTGGC, BsNNG/C 5'-GCTTTTTCTTT ATTTACSNNAATGACCACAAGCTCATCTGTG, this first fragment was used as megaprimer together with oligonucleotides Tail20 5'-GGAATAGC CGTGGATCGTGG and EldhBm (described above) to synthesize the complete *lctE* mutagenized gene.

Randomization of *lctE* by error prone PCR

A library of variants on *lctE* was obtained by error-prone PCR using the commercial kit GeneMorphII Random Mutagenesis (Stratagene), the oligonucleotides used were Tail99Nco (described above) and Tail-99Hind 5'-AGCCGTGGATCGTGGGACCAC CGCGCTACTGCCGACAGG. This library was inserted into pTrc99A as described for pTrclctE.

Analytical procedures

Pyruvate decarboxylase activities were measured from sonicated cell extracts as has already been described (Conway et al. 1987a, b).

LDH D38variants and wild type were purified with Ni-NTA resin (Qiagen) to determine their kinetic parameters.

Lactate dehydrogenase activities from crude extracts and purified enzymes were measured in 100 mM Na₂HPO₄ pH 6.5 buffer at 35°C by monitoring oxidation of NADH at 340 nm.

The amount of protein analyzed on crude extracts was standardized by adjusting OD₅₅₀ of each culture prior to cell disruption. Total protein was estimated as OD₅₅₀ of 1 = 0.23 mg cell protein per ml. Activities are reported as IU per mg of protein (IU/mg_{prot}).

Protein was measured with Bradford reagent.

Ethanol was determined by gas chromatography using *n*-butanol as internal standard. Glucose and organic acids (lactic acid) concentrations were determined by HPLC equipped with a refractive index detector using an Aminex HPX-87H column. A mobile phase of 5 mM H₂SO₄ was used at 0.8 ml/min, run at 60°C.

Results and discussion

Effect of PDC on growth rate

As an *ldhA*⁻ *pfkB*⁻ double mutant, *E. coli* VAL23 was complemented with the PET-operon expressed on an inducible plasmid (pTrcPET), in such a way that PDC and ADH expression levels could be modulated by adding IPTG. *E. coli* VAL23/pTrcPET was cultured in anaerobic LB media, containing 2 g glucose/l and different concentrations of inducer. As induction level was increased, higher PDC activities were obtained (Fig. 1A, B), as well as higher growth rates (Fig. 1B). This observation confirmed the hypothesis that growth rate correlates with the rate at which NAD⁺ is regenerated in the ethanol pathway, which in turn is controlled by the limiting step of this pathway, i.e. PDC activity as shown below.

Ingram and Conway (1988) have previously found that the expression level of ethanologenic enzymes in a wild type *E. coli* containing PET-plasmids, correlates with the final cell density. These authors attributed this correlation to the replacement of organic acids by ethanol which is a less toxic product. We found that the increase in growth rate obtained at higher PDC activities, also correlates with

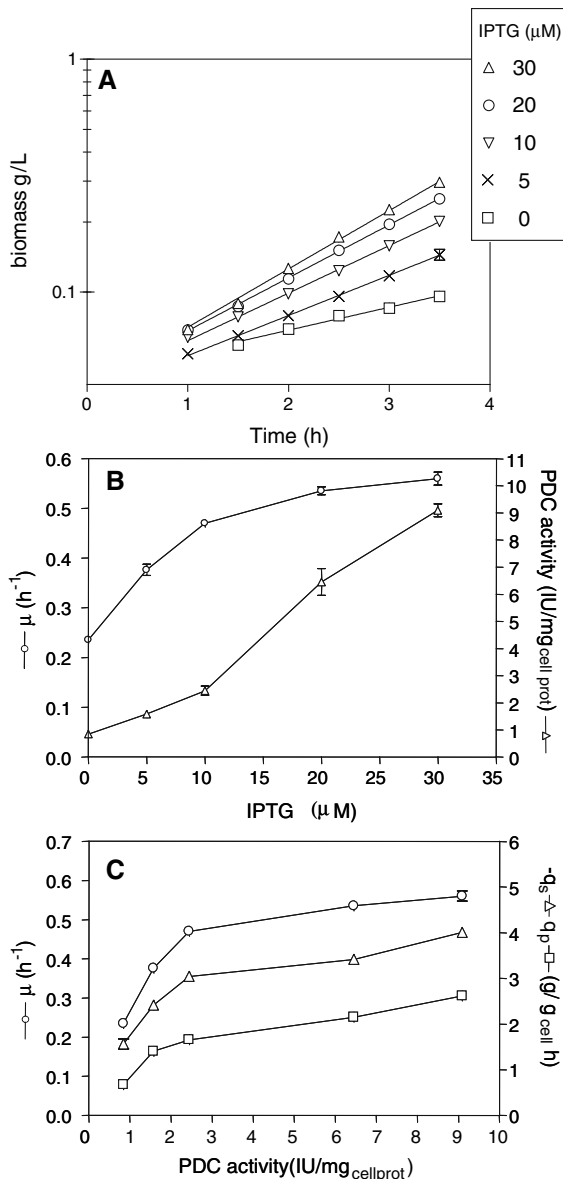


Fig. 1 *E. coli* VAL23/pTrcPET grown on LB, 2 g glucose/l at different IPTG concentrations. *Note:* Standard error was calculated from three independent experiments, however, symbols are greater than error bars in most of the reported values. (A) Exponential phase of anaerobic growth kinetics. (B) Specific growth rate and PDC activity. *Note:* PDC activity was measured from crude extracts of cells at exponential phase. (C) Effect of PDC activity on specific rates of: growth (μ), glucose consumption ($-q_s$) and ethanol formation (q_p)

glucose consumption rate resulting from a higher carbon flux toward ethanol production, and therefore a higher NAD^+ recycling rate (Fig. 1C). The same effect of increased glucose consumption rate at

Table 1 Correlation between growth rate and PDC specific activity in *E. coli* VAL23-pTrcpdc grown on LB plus 20 g glucose/l

IPTG (mM)	PDC activity (IU/mg _{cell prot})	μ (h ⁻¹)
0.00	0.6	0.10
0.01	1.8	0.40
0.03	7.2	0.44

increasing fermentative activity has been observed on a non-fermentative *E. coli* strain complemented with a malic enzyme, which restores anaerobic growth by converting pyruvate into malate resulting in the formation of succinate (Stols and Donnelly 1997).

Although both PDC and ADH expression levels were modulated, in the heterologous ethanol pathway, PDC is the controlling activity (Martinez et al. 1999). This was confirmed using a plasmid expressing only *pdc* (pTrcpdc). PDC activity was enough to complement the anaerobic growth of *E. coli* VAL23, due to the presence of the native *E. coli* ethanol dehydrogenase (ADHE), which catalyzes the conversion of acetaldehyde to ethanol, recycling the NAD^+ . Table 1 shows that at low PDC activities, the ADH step does not represent a bottleneck in the conversion of pyruvate to ethanol, as growth rate increased with the inducer concentration. It is therefore clear that, within a specific PDC activity range, there is a direct correlation between PDC level and specific growth rate, with a saturating effect at higher expression levels (Fig. 1C).

Although a continuous culture may be implemented to select the fastest growing strains, an alternative and straightforward way to detect them is by direct observation of colony size after plating in solid media. Colony diameter—which is directly related to growth rate—increases at higher inducer concentrations as shown in Fig. 2.

Saturation mutagenesis at position 38 of LDH

Holmberg et al. (1999) reported that substitution of the conserved aspartate residue by glycine at position 52 in LDH from *B. stearothermophilus* (which correspond to aspartate 38 in LDH from *B. subtilis*) caused a significant decrement on the NADH affinity and also a decrement on k_{cat} , resulting in a two orders of magnitude decreased k_{cat}/K_m . We constructed the

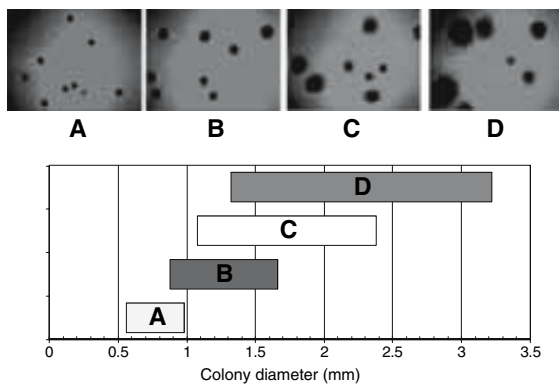


Fig. 2 Colony size distribution of *E. coli* VAL23 pTrcPET on anaerobic solid media LB, 20 g glucose/l, at different concentrations of IPTG, 48 h on anaerobic jar. IPTG concentration (μM): **A**, 0; **B**, 10; **C**, 20 and **D**, 30. Lower part: colony diameters (Note: Colony diameter was measured from images obtained with a stereoscope equipped with image analysis software (ImagePro Plus, Media Cybernetics), 30–50 colonies were analyzed from each plate) measured for each IPTG condition

equivalent D38G on LDH from *B. subtilis* (which shares 67% identity with LDH from *B. stearothermophilus*). As expected, mutant D38G yields very small colony forming strains under anaerobic culture conditions (Fig. 3B).

A library was constructed by saturation mutagenesis at position G38 and selected on *E. coli* VAL23, under anaerobic conditions, on LB media supplemented with Na_2CO_3 (as buffer) and glucose. Colony size and consequently an improved NAD^+ regeneration rate was the screening criteria for mutants later identified by nucleotide sequence as G38A, G38C, G38E and G38D (Fig. 3). It is important to note that under aerobic culture conditions, clones containing most of the 20 amino acid substitutions were found; however, most of them were unable to form easily visualized colonies when grown on anaerobic culture conditions.

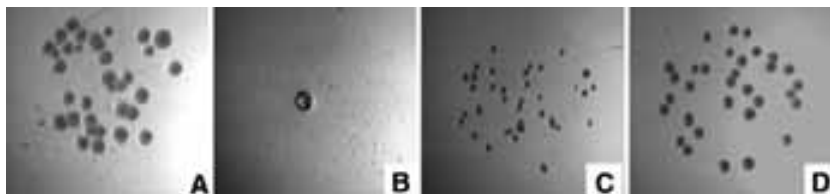


Fig. 3 *E. coli* VAL23 containing LDH G38 variants individually cultured on anaerobic solid LB media supplemented with 4 g $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{l}$ and 2 g glucose/l. (**A**) LDH wild type, (**B**) LDH G38, (**C**) LDH G38A, (**D**) LDH G38C

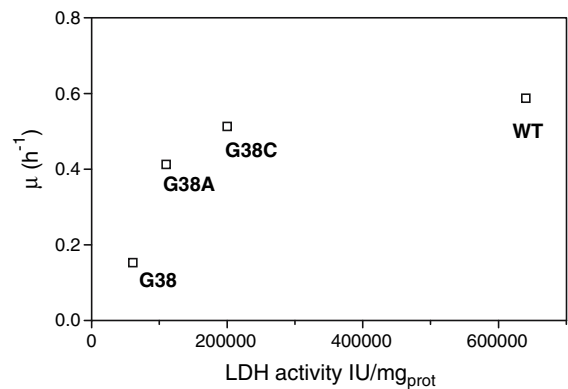


Fig. 4 Relationship of activity and growth rate of the *E. coli* VAL23 containing LDH G38 variants. LDH specific activity from the purified enzymes versus anaerobic maximum growth rate

Specific growth rates on liquid anaerobic media of *E. coli* VAL23 transformed with variants D38G ($0.15 \pm 0.019 \text{ h}^{-1}$), G38A ($0.41 \pm 0.009 \text{ h}^{-1}$), G38C ($0.51 \pm 0.021 \text{ h}^{-1}$) and wild type LDH ($0.59 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$) show that the differences in colony diameter correlates with specific growth rate. Due to low production of LDH under anaerobic conditions and to the presence of endogenous NADH-NAD^+ activities on crude cell extracts, specific activities of the above mentioned variants and the wild type clone were obtained using purified enzymes. Again, the specific growth rate of each clone could be directly associated with the rate of the limiting enzymatic step in the strain (Fig. 4), proving the usefulness of the method.

Directed evolution of LDH

LDH from diverse organisms causes a cell toxicity effect when over-expressed in *E. coli* (Dr. Humberto Flores, personal communication). During this work, we found a negative effect on bacterial growth when *E. coli* VAL23 transformed with pTrelctE was grown

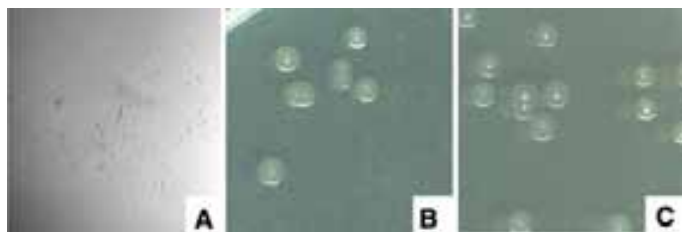


Fig. 5 Anaerobic selection of the *E. coli* VAL23 containing LDH variants obtained by directed evolution, cultured on solid LB, 4 g $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{l}$, 20 g glucose/l and 0.1 mM IPTG. (A) WT (2X stereoscope amplification), (B) 6T3, (C) 2P

Table 2 Kinetic parameter of *E. coli* VAL23 containing selected LDH variants from directed evolution

Enzyme	μ (h^{-1})	q_p (g lactate/g _{cell} h) ^a	Maximum lactate concentration (g/l)	LDH activity IU/mg _{cell} prot ^b
WT	0.04	2.21	2.4	0.68
6T3	0.11	4.35	6.4	6.5
2P	0.08	5.52	10.5	4.3

Microaerobic, pH controlled cultures on M9 media supplemented with 40 g glucose/l and 0.1 mM IPTG

^a Specific lactate formation rate

^b Specific activity measured from crude extracts of cells at exponential phase, adjusted to 1 OD prior to cell disruption

even at low levels of IPTG inducer (0.05 mM). To remove the toxicity effect on bacterial growth, an LDH mutant library generated by error-prone PCR was selected on anaerobic media in the presence of IPTG.

Variants 6T3 and 2P manifested the highest colony diameter (Fig. 5). Variant 6T3 included six amino acid substitutions (N3D, A22T, D141E, A145V, K230R and Y235F), and variant 2P included four substitutions (K87N, L120I, D270E, L311F). Substitutions were mapped on the known quaternary structure of LDH of *B. stearothersophilus* (Schar et al. 1982) and found on the solvent exposed protein surface, far from subunit interfaces and far from ligand binding sites (not shown).

When cultured on microaerobic, pH controlled liquid cultures (M9 media, 40 g glucose/l and 0.1 mM IPTG), a rapid lactate production from bacteria transformed with variants 6T3 and 2P resulted in higher specific growth rates as compared with bacteria transformed with the wild type clone (Table 2). It is important to point out that the specific growth rate of *E. coli* VAL23 transformed with the variants is similar independently of the presence or absence of IPTG in the culture (data not shown), in contrast to the specific growth rate of *E. coli* VAL23 transformed with the wild type clone which is diminished twofold in presence of the inducer. These

variants also reached a higher specific lactate production rate than the wild type clone (Table 2).

In summary, we have demonstrated that the non-fermentative mutant strain (*ldhA*⁻, *pflB*⁻) could be useful to select variants of fermentative enzymes with improvements in their catalytic properties. Furthermore, the selection method could also be useful to remove undesirable protein properties that might have an impact in the production yields of important metabolites such as L-lactate.

Acknowledgements This work was supported by CONACYT grants 138498, 50952, MOR-2004-C02-048; SAGARPA-2004-C01-224, and DGAPA-UNAM. The authors thank Eugenio López and Jorge Yañez from “Unidad de Síntesis y Secuenciación” (Instituto de Biotecnología, UNAM), Dr. Humberto Flores for technical assistance in the LDH work and Fernando González for HPLC support.

References

- Altaras NE, Cameron DC (2000) Enhanced production of (R)-1,2-propanediol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 16:940–946
- Böck A, Sawers G (1996) Fermentation. In: Neidhardt FC, Curtiss RI, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schacchter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella cellular* and Molecular biology. ASM, Washington, DC
- Boernke WE, Millard CS, Stevens PW, Kakar SN, Stevens FJ, Donnelly MI (1995) Stringency of substrate specificity of

- Escherichia coli* malate dehydrogenase. Arch Biochem Biophys 322:43–52
- Bunch PK, Mat-Jan F, Lee N, Clark DP (1997) The *IdhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Microbiology-(UK) 143:187–195
- Clark DP (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Rev 63:223–234
- Conway T, Osman YA, Konnan JI, Hoffmann EM, Ingram LO (1987a) Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. J Bacteriol 169:949–954
- Conway T, Sewel GW, Osman YA, Ingram LO (1987b) Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J Bacteriol 169:2591–2597
- Garmyn D, Ferain T, Bernard N, Hols P, Delcour J (1995) Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase gene. Appl Environ Microbiol 61:266–272
- Hespell RB, Wyckoff H, Dien BS, Bothast RJ (1996) Stabilization of pet operon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lacking lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase activities. Appl Environ Microbiol 62:4594–4597
- Holmberg N, Ryde U, Bülow L (1999) Redesign of the coenzyme specificity in L-lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* using site-directed mutagenesis and media engineering. Protein Eng 12:851–856
- Ingram LO, Conway T (1988) Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 54:397–404
- Lara AR, Vazquez-Limon C, Gosset G, Bolivar F, Lopez-Munguia A, Ramirez OT (2006) Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. Biotechnol Bioeng 94:1164–1175
- Martinez A, York SW, Yomano LP, Pineda VL, Davis FC, Shelton JC, Ingram LO (1999) Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdhC*, *adhB*) in *Escherichia coli*. Biotechnol Prog 15:891–897
- Mat-Jan F, Alam KY, Clark DP (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. J Bacteriol 171:342–348
- Merino E, Osuna J, Bolivar F, Soberon X (1992) A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors. Biotechniques 12:508–510
- Ohta K, Beall DS, Mejia JP, Shanmugam KT, Ingram LO (1991) Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. Appl Environ Microbiol 57:893–900
- Romero S, Merino E, Bolivar F, Gosset G, Martinez A (2007) Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: Lactate dehydrogenase plays a key role in the fermentative metabolism. Appl Environ Microbiol (submitted)
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd edn. Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schar HP, Zuber H, Rossmann MG (1982) Crystallization of lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. J Mol Biol 154:349–353
- Stols L, Donnelly MI (1997) Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. Appl Environ Microbiol 63:2695–2701
- White D (1999) Fermentations. In: The physiology and biochemistry of prokaryotes. Oxford University Press, New York, pp 363–382