



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS**

**EVOLUCION DIRIGIDA DE LA L-(+) LACTATO
DESHIDROGENASA (LctE) DE *Bacillus subtilis*
PARA MEJORAR SUS PROPIEDADES CATALITICAS
Y NIVEL DE EXPRESION EN *Escherichia coli*.**

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

P R E S E N T A:

ING. JOEL VEGA BADILLO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOEL OSUNA QUINTERO



CUERNAVACA, MORELOS

MARZO DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. F. Xavier Saberon Mainero, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Joel Osuna Quintero.

*Esta tesis se la dedico a mis dos
grandes padres. Que sin su apoyo
jamás se hubiera realizado.*

*Gracias por su confianza y sobre
todo por su motivación.*

Agradecimientos.

Le agradezco en principio al Dr. Joel Osuna Quintero por su asesoría y apoyo constante en la realización de este proyecto, además de ser un buen jefe también es un buen amigo.

Les agradezco a los Drs. Alfredo Martínez Jiménez y Agustín López-Munguía por ser parte de mi comité tutorial y por el apoyo y cooperación para la culminación del proyecto.

A los Drs. Lorenzo Segovia, Enrique Rudiño Piñera, Mario Soberón Chávez, Daniel Alejandro Fernández Velasco y Joel Osuna Quintero por sus comentarios valiosos y consejos en la mejora del escrito.

Agradezco también la participación al Dr. F. Xavier Soberón Mainero por su apoyo e interés en la realización del presente trabajo.

De igual manera un sincero agradecimiento al Dr. Humberto Flores por compartir sus conocimientos y por su constante apoyo técnico en el laboratorio.

A la Dra. Consuelo Vázquez por compartir su espacio, paciencia y conocimiento en la consolidación de este proyecto.

Y todos los amigos del laboratorio Adrian, Bivi, Azzu, Etienne, Gabriel, Fily, Kary, Lianet, Aldo, Pablo, Víctor, Mary, Lety, Dr. Humberto, Juanita, Alfredo, Dr. Ricardo, Dra. Saab, Nelly y Joel.

A los amigos Dago, Omar, David, Cuauhtémoc, Fernando Z, Fernando O, José, Sergio, y a toda la comunidad del IBT por hacer más cómoda mi estancia.

También un agradecimiento a mis hermanos Guillermo, Saúl, Rocio, Anallely y a mi sobrina Ingrid por creer en mí y motivarme constantemente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología por permitirme crecer académicamente.

Y si bien, no debería ir al final, un agradecimiento a Dios porque al final, él ha trazado mi camino.

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS _____	
RESUMEN _____	iii
INTRODUCCIÓN _____	1
Ácido láctico._____	1
Acido Poli-Láctico._____	1
ANTECEDENTES _____	3
Ingeniería de rutas metabólicas para la producción de lactato._____	3
Evolución dirigida de proteínas._____	5
Método de selección._____	6
Antecedentes del mejoramiento de los parámetros catalíticos de la L-LDH._____	8
Efecto tóxico de sobre-expresión de la L-LDH._____	9
PLANTEAMIENTO _____	9
HIPÓTESIS _____	10
OBJETIVO GENERAL _____	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	10
MATERIALES Y MÉTODOS _____	11
Cepa, plásmidos y medio de crecimiento._____	11
Manipulación de ADN._____	11
Construcción del plásmido pTrc-lctE y pTrc-lctwk._____	11
Enzimas de restricción._____	13
Clonación de la secuencia <i>lctE</i> ._____	14
Métodos analíticos._____	17
Método de selección._____	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL _____	20
Disminución de toxicidad._____	20
Mejoramiento de los parámetros catalíticos._____	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	23
Tamaño del banco._____	23
Selección de colonias._____	28
Secuenciación de las variantes de selección._____	31
Alineamiento._____	35
Retransformación._____	37
Fermentaciones._____	40
Determinación de producción de ácido láctico mediante HPLC._____	45
Niveles de expresión de las variantes de interés en un cultivo no aireado con IPTG.____	49
Actividad específica de extracto celular._____	51
Comparación de parámetros cinéticos de las variantes 6T3 y 2P*._____	52
Análisis estructural de las variantes L-LDH de <i>B. subtilis</i> ._____	53
Aumento de actividad específica._____	55
CONCLUSIONES _____	58
PERSPECTIVAS _____	59
BIBLIOGRAFÍA _____	60
APÉNDICE _____	62
ARTÍCULO _____	67

ABREVIATURAS.

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN shuffling	Recombinación génica <i>in vitro</i>
APL	Ácido Poliláctico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín Trifosfato
D-APL	Isómero D del ácido poliláctico
D-LDH	Lactato deshidrogenasa productora de D-lactato
Eco's	Cepas transformadas con la secuencia genética que incluye un sitio de restricción EcoRI cerca del codón de inicio.
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
KOH	Hidróxido de Potasio
L-APL	Isómero L del ácido poliláctico.
LB-GLU	Medio Luria-Bertani (Suplementado con glucosa)
LctE	Lactato deshidrogenasa nativa de <i>Bacillus subtilis</i>
<i>LctE</i>	Gen nativo de la lactato deshidrogenada de <i>Bacillus subtilis</i> .
LDH	Lactato deshidrogenasa.
<i>ldhA</i>	Gen de la lactato deshidrogenasa de <i>E. coli</i>
<i>ldh bacst</i>	Secuencia genética del gen de la LDH de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>ldh basu</i>	Secuencia genética del gen de la LDH de <i>Bacillus subtilis</i>
L-LDH	Lactato deshidrogenasa productora de L-lactato
ml	mililitro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NAD ⁺	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina (Oxidado)
NADP ⁺	Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Fosfato (Oxidado)
NCBI	National Center for biotechnology information
NMN ⁺	Nicotinamida mononucleótido.
OD	Densidad Óptica
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pflB</i>	Gen de la piruvato formatoliasa en <i>E. coli</i>
pTrc-	Cepa VAL23 transformada con el plásmido pTrc (Sin inserto <i>LctE</i>)
rpm	revoluciones por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VAL23	Cepa de <i>E. coli</i> con dos genes ausentes (<i>pflB</i> , <i>ldhA</i>)
WT	Lactato deshidrogenasa nativa de <i>Bacillus subtilis</i> .
μ	Velocidad específica de crecimiento celular

Resumen.

Es conocido que las LDH's de diversos organismos causan un efecto de toxicidad cuando se sobre-expresan en *E.coli*. En este trabajo, nosotros encontramos un efecto negativo de crecimiento bacterial cuando *E. coli* VAL23 (*pfIB*⁻, *ldhA*⁻) se transformó con pTrclctE bajo inducción con IPTG (0.05 mM). Para remover el efecto de toxicidad que reduce la velocidad de crecimiento, fue generada una librería de mutantes LDH mediante PCR mutagénica la cual fue seleccionada en medio anaerobio en presencia de IPTG.

Cuando se cultivó en medio anaerobio, en cultivos líquidos controlando el pH (Medio M9, 40g de glucosa/l y 0.1 mM IPTG), fue observada una rápida producción de lactato de las bacterias que fueron transformadas con las variantes 6T3 y 2P* resultando en una mayor velocidad de crecimiento en comparación con las bacterias que fueron transformadas con la clona WT. Estas variantes también alcanzaron un incremento en la velocidad específica de producción de lactato que la clona WT.

La variante 6T3 incluyó 6 sustituciones de aminoácidos (N3D, A22T, D141E, A145V, K230R y Y235F), y la variante 2P* incluyó 4 sustituciones (K87N, L120I, D270E, L311F). Las sustituciones fueron mapeadas sobre la estructura cuaternaria conocida de la LDH de *B. stearothermophilus* (28) y se encontraron en la superficie de la proteína expuestas al solvente.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la mutante no fermentativa (*ldhA*⁻, *pfIB*⁻) puede ser usada para remover propiedades indeseables de la proteína que podrían tener un impacto en los rendimientos de producción de metabolitos importantes tales como el L-lactato.

INTRODUCCIÓN.

Ácido láctico.

El ácido láctico es una molécula orgánica que se produce en el curso del metabolismo de anaerobiosis, también es conocido por su nomenclatura oficial como ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido α -hidroxi-propanoico y es un compuesto que juega un importante rol en diversos procesos bioquímicos de la fermentación, en solución puede perder el protón y convertirse en el anión lactato. El ácido láctico es un quirómero que posee dos isómeros ópticos, uno es el dextrógiro, ácido D-(-)-láctico o d-ácido láctico (en este caso, se trata de ácido (R)-láctico); y el otro es el levógiro, ácido L-(+)-láctico ó l-ácido láctico (en este caso se trata del ácido (S)-láctico) como se muestra en la Figura 1.

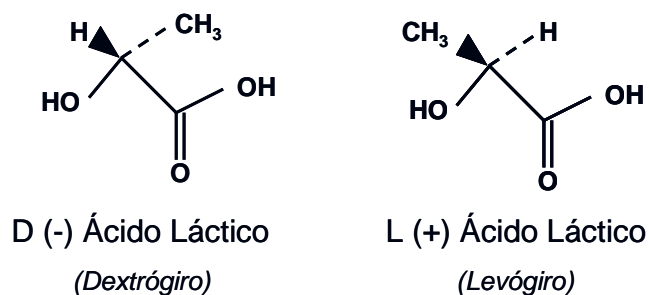


Figura 1.- Orientaciones quirales del ácido láctico.

Acido Poli-Láctico.

El Ácido Poli-Láctico (APL) presenta buenas propiedades mecánicas, de apariencia y biodegradabilidad; por ello, se considera un polímero de interés potencial en la fabricación de envases y otros bienes de consumo. El APL es un material biodegradable que es producido a partir de recursos renovables y no es

tóxico para el cuerpo humano ni para el ambiente. El APL es utilizado como material biomédico para la regeneración de tejidos, para la fabricación de matrices de liberación de drogas y como una alternativa de polímero comercial para reducir el impacto sobre el ambiente (1). El APL está siendo desarrollado como un material alternativo de los plásticos convencionales basados en petróleo (2,3), y es un plástico versátil que puede ser manipulado para aplicaciones específicas mediante la alteración de las proporciones de los isómeros L-(+) y D-(-) del ácido láctico (4).

El APL se forma a partir de monómeros de L-lactato y D-lactato para formar cadenas de poliéster alifático de L-Ácido Poli-Láctico (L-APL) y D-Ácido Poli-Láctico (D-APL) respectivamente, la polimerización se lleva a cabo mediante la deshidratación y formación de enlaces éster del carbono carboxílico del ácido láctico. Numerosos estudios se han llevado a cabo con respecto a la formación, estructura, propiedades, degradación y aplicaciones del APL en la formación de cristales y fibras que son utilizados en la elaboración de biopolímeros como plásticos biodegradables. La estéreo-complementación de cadenas L-APL y D-APL mediante fuerzas de van-der-Waals fortalece las propiedades mecánicas, la resistencia térmica, de hidrólisis y ambiental del APL. Se ha demostrado que los parámetros cruciales que afectan la estéreo-complementación son la proporción en la mezcla y el peso molecular de las cadenas de L-APL y D-APL, lo cual requiere monómeros de L-lactato y D-lactato ópticamente puros para su formación (1).

Los isómeros ópticamente puros pueden ser generados como productos separados mediante la fermentación microbiana de carbohidratos (5), utilizando las enzimas, L-(+) lactato deshidrogenasa (L-LDH) y D-(-) lactato deshidrogenasa (D-LDH); aunque la glucosa es la materia prima comercial, la adición de otros azúcares tales como pentosas (xilosa, arabinosa) y celobiosas, potencialmente disponibles, permitiría bajar los costos de producción (5, 6).

ANTECEDENTES

Ingeniería de rutas metabólicas para la producción de lactato.

Una variedad de microorganismos pueden ser usados para producir los isómeros ópticamente puros de ácido láctico (5). Estos típicamente requieren la adición de nutrientes complejos debido a las limitaciones biosintéticas, lo que incrementa los costos por nutrientes, purificación y traslado de residuos. Una alternativa para la producción de ácido láctico está siendo diseñada tanto en levaduras como en *Escherichia coli* (7, 8), microorganismos generalmente usados como plataforma en la biotecnología (2).

E. coli silvestre produce una mezcla de ácidos y productos de fermentación como se muestra en la Figura 2 (9).

Varios grupos han reportado ingeniería metabólica de estos organismos para la producción de D- lactato usando diferentes propuestas genéticas. La cepa de *E. coli* desarrollada por Chang et al. (7) contiene mutaciones en la fosfotransacetilasa (*pta*) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*); produce un alto rendimiento de ácido láctico, pero requiere de ácidos dicarboxílicos o nutrientes complejos para su crecimiento. Aunque la omisión de la mutación de *ppc* elimina el requerimiento de

ácidos dicarboxílicos, el rendimiento fue significativamente disminuido por la acumulación de succinato.

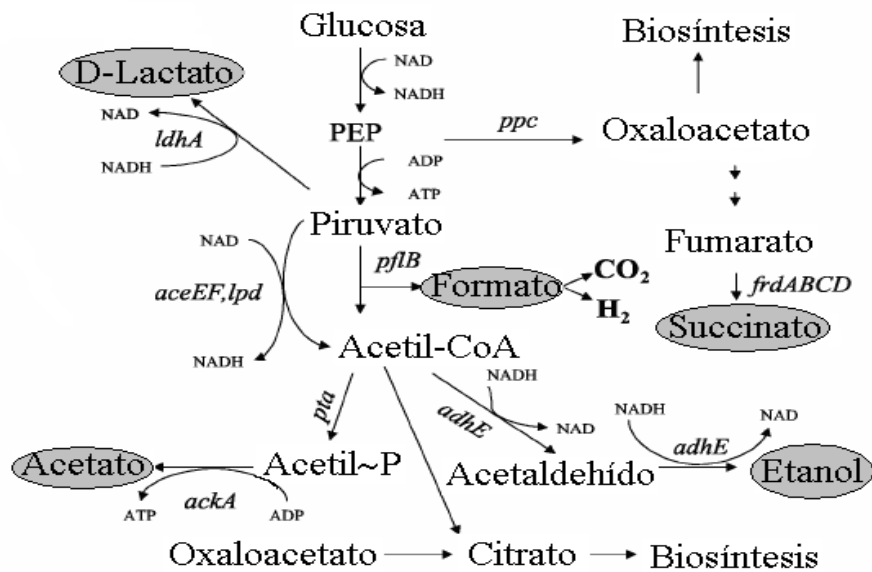


Figura 2. Fermentación de glucosa por *E. coli*, los productos de fermentación están indicados dentro de óvalos oscuros y los genes de las enzimas importantes están escritos en itálicas. *ldhA*, lactato deshidrogenasa; *ppc*, fosfoenolpiruvato carboxilasa; *frdABCD*, fumarato reductasa; *pflB*, piruvato formatoliasa; *aceEF,lpd*, complejo piruvato deshidrogenasa; *pta*, fosfotransacetilasa; *adhE*, alcohol deshidrogenasa; *ackA*, acetato cinasa.

Una alternativa propuesta por Zhou, et al. (8) combinó mutaciones en cuatro genes: *frdBC*, fumarato reductasa; *pflB*, piruvato formatoliasa; *adhE*, alcohol deshidrogenasa; *ackA*, acetato cinasa. La cepa resultante (SZ63) produjo, a partir de azúcares, altos rendimientos de D-lactato durante el crecimiento en un medio de sales minerales sin la adición de nutrientes. Zhou, et al (6) realizaron ingeniería metabólica en *E. coli* para generar cinco supresiones cromosomales (*pflB*, *ackA*, *adhE*, *ldhA*, y *frdBC*) e integraron el gen *ldhL* de la L-(+)-LDH de *Pediococcus acidilactici* (10). La cepa resultante (SZ85) produce altos rendimientos de L-(+) lactato óptimamente puro a partir de glucosa y xilosa en un medio de sales minerales.

Evolución dirigida de proteínas.

La evolución permite seleccionar de manera natural especies que estén mejor adecuadas a una serie de factores, Segovia L, *et al* (11) sugiere que μ -cristalino la cual es una proteína que funciona como lente en algunos marsupiales, siendo un componente natural de la retina y de otros tejidos, es sometida a un reclutamiento génico para ganar un rol estructural adicional en la lente, durante la evolución de las especies marsupiales diurnas. Y propone que μ -cristalino podría ser una enzima, posiblemente del metabolismo de aminoácidos, con particular importancia para fotoreceptores.

Así mismo las enzimas son poderosos catalizadores que son capaces de incrementar la velocidad de reacción en varios órdenes de magnitud con respecto a la reacción no catalizada (12, 13). Ciertas enzimas muestran un control perfecto sobre la estereoquímica y selectividad, estas características pueden ser atractivas para la industria, además de que algunas enzimas catalizan naturalmente las reacciones que los químicos necesitan bajo condiciones que son industrialmente convenientes y económicamente ventajosas. Muchos esfuerzos están actualmente dirigidos hacia la modificación de la actividad enzimática para satisfacer las necesidades industriales.

Múltiples propuestas han sido desarrolladas para permitir la identificación de enzimas mutadas que posean cualidades deseables tales como el incremento de la actividad enzimática, la modificación de la especificidad o la unión al cofactor. Propuestas recientes han sido usadas en el diseño racional de enzimas. Estas

propuestas requieren un conocimiento profundo de las características estructurales del sitio activo de la enzima y de su contribución y función. La complejidad de la relación Estructura/Función en las enzimas ha sido un factor que limita las aplicaciones del diseño racional. Recientemente, la evolución dirigida ha probado ser una herramienta poderosa para la modificación de la actividad enzimática, y actualmente es la herramienta generalmente usada en estos casos. La evolución dirigida consiste en la generación de mutaciones aleatorias en un gen de interés, seguida de selección de la proteína mutada que posee las características deseadas. La evolución dirigida puede permitir una ingeniería enzimática relativamente rápida sin requerir un entendimiento profundo de la relación Estructura/Función, La principal limitación de la evolución dirigida es la necesidad de desarrollar una metodología de alta resolución que permita la identificación de las propiedades deseadas bajo condiciones relevantes (14).

Método de selección.

Las L-lactato y D-lactato deshidrogenasas, las cuales están involucradas en la reducción de piruvato a L-lactato y D-lactato, pertenecen a familias enzimáticas no relacionadas evolutivamente. Los genes que codifican la L-LDH han sido usados como un modelo de duplicación génica debido a los múltiples parálogos encontrados en eubacterias, arqueobacterias, y eucariontes (15).

Algunos enfoques genéticos han sido usados para la producción de L-lactato mediante *E. coli* modificada, productora en un principio de D-lactato, en todos ellos se ha remplazado la ruta fermentativa nativa por el gen que codifica la enzima L-

LDH (6). Los primeros estudios por Clark et al. (9,16) demostraron que la cepa de *E. coli* que contiene mutaciones en la piruvato formatoliasa (*pflB*) y la lactato deshidrogenasa (*ldh*) es incapaz de metabolizar glucosa anaeróticamente en medio de sales minerales, a menos que se suplemente con una ruta alternativa para la oxidación de NADH, subsecuentemente, esta doble mutante ha sido usada para aislar plásmidos expresando los genes de la LDH de una variedad de diferentes microorganismos (17, 18, 10).

Este defecto fermentativo puede ser compensado mediante una actividad enzimática que restaure la canalización de piruvato hacia la regeneración de NAD⁺, y se ha visto que plásmidos que codifican para actividades que complementan el crecimiento anaeróbico son altamente estables, al grado que su pérdida es letal para la viabilidad de la doble mutante (19).

Diferentes reportes han demostrado que usando esta mutante no fermentativa (*pflB*, *ldhA*⁻), cualquier ruta que restaure el equilibrio redox también restaura el crecimiento anaeróbico (20, 10, 19). Basados en este hecho, Vázquez-Limón ha planteado que la velocidad a la cual el NAD⁺ es regenerado influye en la velocidad de generación del ATP mediante el catabolismo de la glucosa, y así, mientras que el flujo de carbono no sea limitado por otros pasos en la glucólisis, existe una correlación directa entre la velocidad de crecimiento y la actividad de la enzima que limita la ruta de regeneración de NAD⁺ (21).

La estrategia anterior nos permite discriminar variantes funcionales de bancos de enzimas que regeneran NAD^+ , puesto que las variantes inactivas son segregadas, y aun cuando exista contaminación de actividad parental, ésta puede ser discriminada al utilizar vectores que permiten un nivel de expresión muy bajo del gene que codifica a la enzima de interés. Finalmente aquellas variantes con propiedades mejoradas son fácilmente identificadas basándose en su rápida velocidad de crecimiento, resultando en colonias significativamente más grandes (21).

Antecedentes del mejoramiento de los parámetros catalíticos de la L-LDH.

Zhou, et al. (6) encontró cinco mutaciones en la región que codifica *ldhL* de SZ85 (*Pediococcus acidilactici*); (I) codón 15, GAC (asp) a GGC (gly); (II) codón 63, AAC (asn) a AGC (ser); (III) codón 221(doble mutación), GCA (ala) a AAA (lys); y (IV) codón 228, AAG (lys) a GAG (glu). Las mutaciones observadas en la región que codifica *ldhL* y su región terminadora de SZ85 contribuyen en el incremento de la actividad de la L-(+)-LDH, lo cual podría deberse al aumento en la estabilidad del mensajero, al mejoramiento en la estabilidad y plegamiento de la proteína, o al incremento de la actividad enzimática.

Humberto Flores, et al. (22) mediante alineamiento de secuencias de aminoácidos generó una librería filogenética donde sustituyó de manera preferencial aminoácidos cerca del sitio de unión al cofactor NADH de la lactato deshidrogenasa de *B. stearothermophilus*. Un estudio mostró que una triple mutante (Mut31) es más eficiente catalíticamente que la enzima silvestre así como

también fue mejor en la utilización de NAD^+ , y débilmente activa para NADP^+ y NMN^+ .

Efecto tóxico de sobre-expresión de la L-LDH

Se ha observado que la L-LDH de varias especies de *Bacillus* sobre-expresada en *E. coli* causa un efecto tóxico, el cual se ve reflejado en la disminución de generación de biomasa, y en la caída de los rendimientos de ácido láctico (21). De igual forma se ha observado que la expresión de mutantes de la L-LDH de *B. subtilis* sin actividad enzimática (sin producción de ácido láctico) desencadena el mismo efecto de toxicidad cuando se sobre-expresa la proteína en el medio intracelular (21), lo cual podría estar asociado a interacciones de regiones hidrofóbicas en la superficie de la proteína, que evita la adecuada solubilidad, y por tanto conlleva a la formación de agregados.

PLANTEAMIENTO.

En este trabajo se planteó mejorar los parámetros catalíticos de la lactato deshidrogenasa (LctE) de *Bacillus subtilis* mediante evolución dirigida, además de incrementar los niveles de expresión de proteína LDH activa mediante la eliminación del efecto tóxico que genera la sobre-expresión de la LctE de *Bacillus subtilis* en *E. coli*. Para esto se utilizó una cepa de *E. coli* que contiene las supresiones genéticas en *ldhA* y *pf1B*, lo cual confiere a las bacterias una velocidad de crecimiento disminuida en condiciones anaerobias a menos que se integre una enzima que restaure el equilibrio redox de NAD^+ .

HIPÓTESIS.

Mediante evolución dirigida se puede eliminar el efecto tóxico de la LctE expresada en *E. coli* y mejorar los parámetros catalíticos de la LctE de *Bacillus subtilis*.

OBJETIVO GENERAL.

Incrementar la producción de L-lactato generada por la LctE de *Bacillus subtilis* expresada en *E. coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Mediante evolución dirigida de la LctE de *Bacillus subtilis* determinar el impacto de selección en la regeneración de NAD⁺
- Eliminar el efecto tóxico que causa la LctE de *Bacillus subtilis* expresada en *E. coli*.
- Evaluar la producción de L-lactato con la LctE de *Bacillus subtilis* en *E. coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa, plásmidos y medio de crecimiento.

Se utilizó la cepa de *E. coli* (VAL23), la cual carece de secuencias completas de *pflB* y *ldhA* y tiene una velocidad de crecimiento disminuida en condiciones anaeróbicas (21). Fue utilizado el plásmido pTrc99A (Pharmacia Biotech) para clonar la secuencia *lctE* de *Bacillus subtilis*, se utilizó medio de crecimiento “Luria Broth” (23) que contiene 200 mg de ampicilina/l. Para la expresión del operón de la L-LDH bajo condiciones anaerobias, el medio fue suplementado con glucosa e (IPTG). Los cultivos para el análisis de los productos de fermentación fueron realizados en medio mineral M9 (23) suplementado con glucosa al 4%.

Los cultivos anaerobios en medio sólido fueron cargados en jarras anaeróbicas (Becton-Dickinson) en una atmósfera de H₂-CO₂, usando un “Gas-Pak© Kit” (Becton-Dickinson). Para el crecimiento anaeróbico en medio líquido, se utilizó un equipo de fermentación múltiple (6 mini-fermentadores), a 100 rpm, pH 7, 37°C y 200 ml de medio de cultivo.

Manipulación de ADN.

Se utilizaron los procesos estándar para la preparación de plásmidos, enzimas de restricción, ligación, transformación y electroforesis (23).

Construcción del plásmido pTrc-lctE y pTrc-lctwk.

El plásmido pTrc-lctE fue construido mediante la inserción del gen *lctE* de *Bacillus subtilis* dentro del vector de expresión pTrc99A como se muestra en la Figura 3. El

plásmido pTrc-lctEwk será diseñado mediante la inserción de una secuencia “Shine-Dalgarno” que codifica para una región de baja afinidad al sitio de unión del ribosoma y se insertará en el vector de expresión pTrc99A (23).

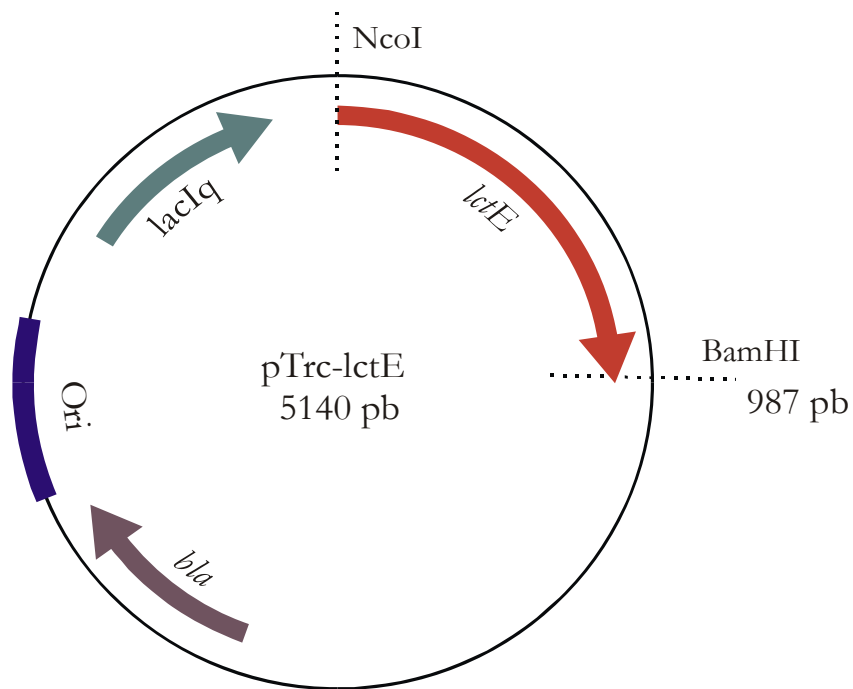


Figura 3.- Vector de expresión pTrc-lctE, la secuencia *lctE* codifica para la L-LDH de *Bacillus subtilis*.

El gen *LctE* fue amplificado mediante PCR y los oligonucleótidos 99HinD y 99NCO (Tabla 1) se diseñaron de manera tal que permitieron la inserción de un sitio de restricción adecuado y una cola de poli-histidina en la región C-Terminal del péptido de la L-LDH para fines de purificación (Figura 4).

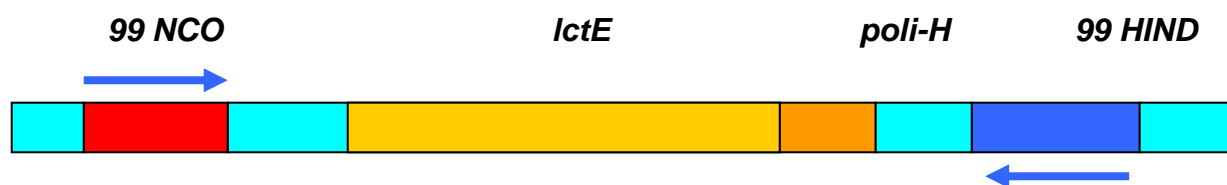


Figura 4.- Diseño de oligonucleótidos con fines de amplificación y clonación del segmento *lctE*, así como la inserción de un fragmento *poli-H* con motivos de purificación.

Tabla 1.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación por medio de PCR Mutagénica.

Oligonucleótidos	Secuencia
99NCO	5' AGCCGTGGATCGTGGGCGCCGACATCATAACGGTTCTGGC 3'
99HIND	3' CCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCGGTGCTAGGTGCCGA 5'

Enzimas de restricción.

Se utilizaron las siguientes enzimas para la digestión de la secuencia *lctE* y del vector de expresión pTrc99a como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.- Enzimas de restricción empleadas para digerir *lctE* y pTrc99a.

ENZIMA	SEGMENTO DE CORTE
Hind III	↓ 5'... AAGCTT...3' 3'...TTCGAA...5' ↑
Nco I	↓ 5'...CCATGG...3' 3'...GGTACC...5' ↑

Se utilizó la Tabla 3 obtenida del protocolo Mutazyme® II Polymerase que fue recomendado por la compañía GeneMorph® para obtener una frecuencia media de mutagénesis.

Tabla 3.- Frecuencia mutagénica vs. Cantidad de muestra inicial.

Frecuencia Mutagénica.	Cantidad de muestra inicial	Amplificaciones recomendadas
0-4,5 (baja)	500-1000ng	1,5-10
4,5-9 (media)	100-500 ng	10-100
9-16 (alta)	0,1-100 ng	100-10,000

Clonación de la secuencia *lctE*.

La Figura 5 muestra los productos de amplificación de la PCR mutagénica, el producto amplificado esperado es de 1025 pb, lo cual coincide con el tamaño esperado según el marcador de peso molecular.

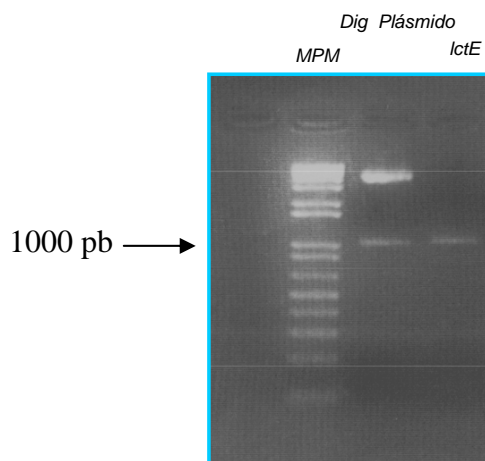


Figura 5.- Productos de PCR mutagénica resueltos en un gel de agarosa al 2%.

Los productos de PCR mutagénica digeridos con NcoI-HindIII fueron ligados como se muestra en la Figura 6. En el primer carril se observa el inserto digerido el cual

fue producto de la PCR mutagénica, en el segundo se colocó el plásmido digerido, en el tercero se observa el producto de ligación, en el cual se percibe un barrido antes y después de la banda esperada, los cuales son generados debido a dobles y triples ligaciones y a productos lineales respectivamente, el cuarto muestra la extracción de plásmido obtenido después de la transformación.

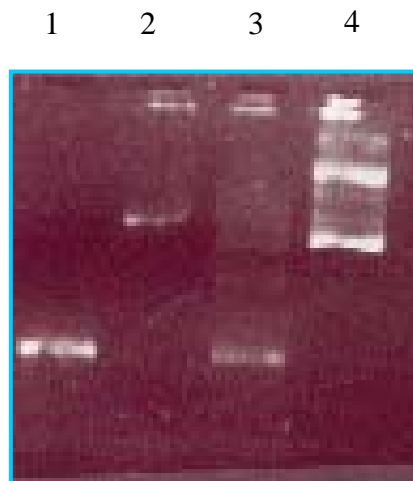


Figura 6.- Ligación del producto de PCR de *lctE* de *Bacillus subtilis* en el plásmido pTrc99a.

Los productos de ligación fueron transformados en la cepa VAL23, y se tomó 1 μ l para inocular una caja con medio LB-GLU, el medio restante de electroporación se transfirió a un matraz con 20 ml de medio LB-GLU líquido, y después de 10 h, las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, a las cuales se les extrajo el plásmido usando el Kit "High Pure Plasmid Isolation de ROCHE, el cual sirvió como banco muestra para realizar diversos experimentos.

De la caja se picaron 15 colonias, las cuales fueron crecidas en 5ml de medio LB durante 10 h, las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se extrajo el plásmido de cada una de las variantes.

El ADN obtenido de las extracciones fue digerido con las enzimas NcoI y Hind III, y fue separado en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la Figura 7, de las cuales se seleccionaron aquellas que corren a la misma altura de la banda del inserto (producto de PCR de *lctE*) (Figura 7, 8). Las muestras seleccionadas se enviaron a secuenciar para corroborar la presencia de la secuencia *lctE*.

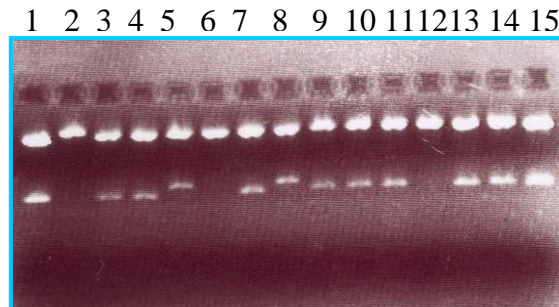


Figura 7.- Digestiones de ADN plasmídico del segmento *lctE*, con las enzimas NcoI y HindIII (15 colonias).

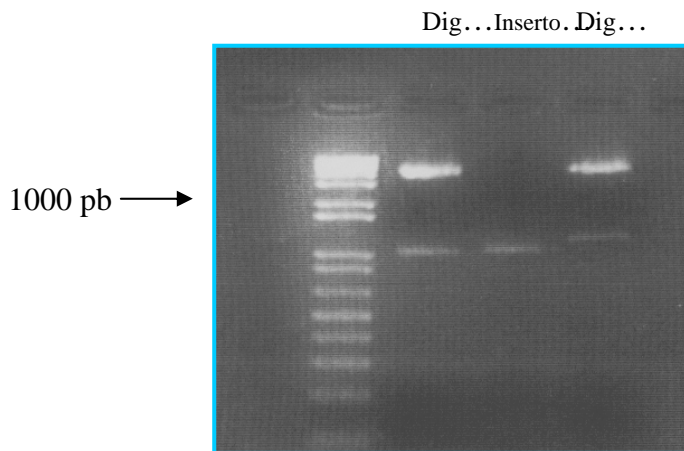


Figura 8.- Determinación del tamaño esperado de la secuencia *lctE* (inserto) en relación al plásmido digerido con NcoI y Hind III.

Métodos analíticos.

La actividad enzimática de la L-LDH fue medida de manera indirecta mediante el análisis espectrofotométrico de consumo de NADH a 340 nm, la actividad se reporta como UI (μ moles de NAD⁺ producidos/min) por miligramo de proteína celular. La concentración de ácido láctico, glucosa y otros ácidos orgánicos fueron determinados mediante HPLC (“High-Pressure-Liquid-Chromatography”, Waters).

Método de selección:

Emplear evolución dirigida siempre implica utilizar un método de selección que permita identificar variantes con características de interés de una amplia población, por lo que el grado de éxito siempre estará en función del tipo de selección que permita aislar aquellas variantes con características de interés.

Para fines de este trabajo se ha utilizado un método de selección que se basa en la regeneración de NAD^+ utilizado en la dependencia de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa para el funcionamiento de la glucólisis (Figura 9), bajo condiciones anaerobias, prácticamente imposible que *E. coli* (VAL23) mantenga un crecimiento normal. Por lo tanto basados en este hecho se propone que cualquier enzima capaz de restaurar el equilibrio Redox (NAD^+) permitirá que la velocidad de crecimiento esté en función de la actividad enzimática, logrando con ello descartar aquellas variantes de la lactato deshidrogenasa que carecen de actividad o desencadenan una serie de factores asociados a toxicidad.

Por tanto, para este trabajo se clonaron una serie de variantes de L-LDH obtenidas mediante PCR mutagénica, en el vector pTrc99a y se transformaron en la cepa VAL23, las colonias obtenidas fueron colocadas en placas con medio LB-GLU y depositadas en una cámara de anaerobiosis, obteniendo después de dos días colonias de diferentes tamaños, de las cuales se seleccionaron aquellas de mayor diámetro que en principio están relacionadas a la actividad enzimática

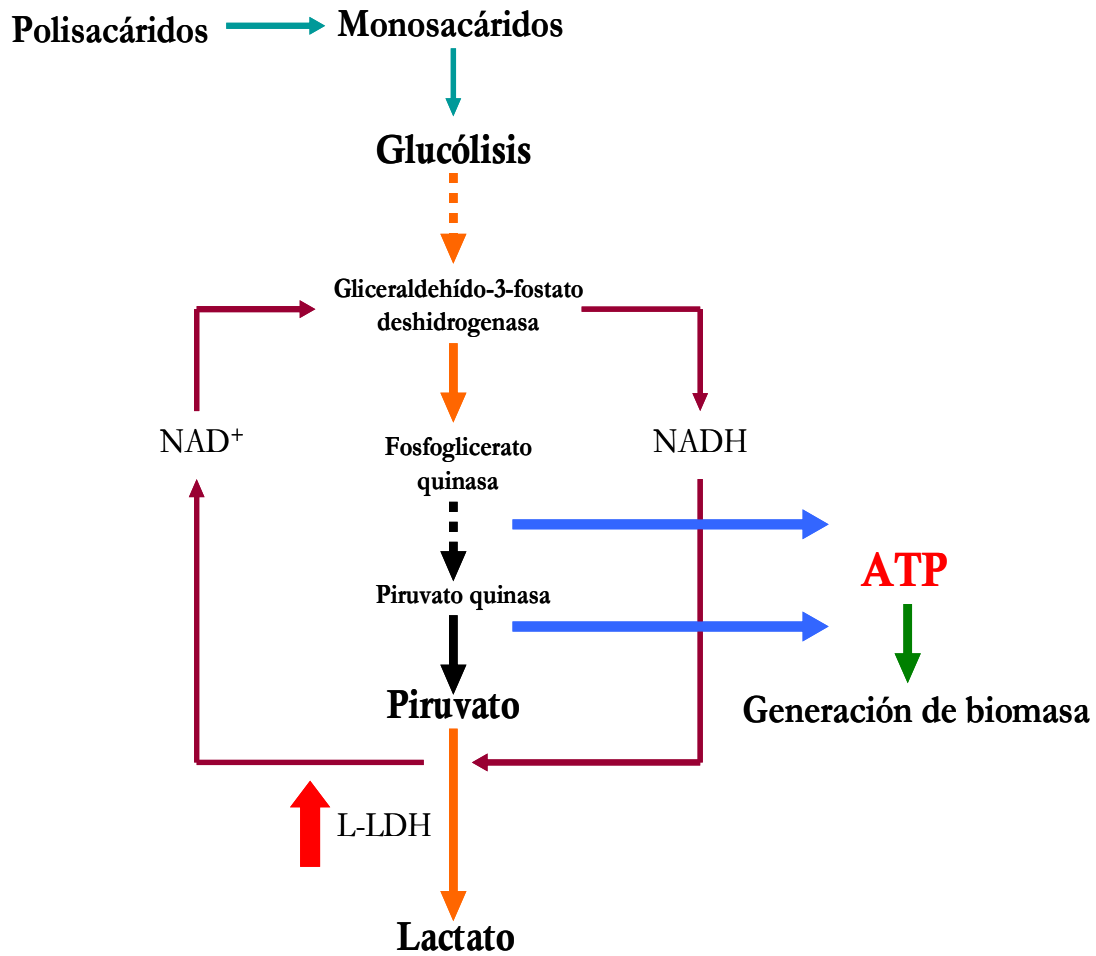


Figura 9.- Método de selección en condiciones anaerobias que se basa en la regeneración de NAD⁺ por la enzima L-LDH, lo cual permite que el flujo glucolítico continúe, y por tanto, la producción de ATP se vea reflejada en la generación de biomasa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Disminución de toxicidad.

Se realizó evolución dirigida a la secuencia *IctE* mediante PCR mutagénica (Mutazyme^R II Polymerase, GeneMorph[®]), la diversidad de secuencias fueron integradas en el vector de expresión pTrc-IctE, las colonias transformadas fueron seleccionadas con base en su velocidad de crecimiento (generación de biomasa), el fenotipo observado consistió en la formación de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de diferentes tamaños, de las cuales se seleccionaron aquellas que presentaban un diámetro mayor. La selección se llevó a cabo bajo condiciones anaerobias, de las colonias seleccionadas se extrajo el plásmido mediante columnas de purificación (Roche USA), y se retransformó para corroborar el fenotipo previamente observado. Estas variantes fueron secuenciadas para determinar los cambios presentes en cada una de ellas, y analizar las modificaciones estructurales de las enzimas mediante el alineamiento con la secuencia de *B. stearothermophilus*, la cual ha sido cristalizada y actualmente se encuentra reportada (24).

Mejoramiento de los parámetros catalíticos.

El inicio de la síntesis de proteínas en *E. coli* involucra el reconocimiento de la subunidad ribosomal 30S por elementos específicos del ARN-mensajero cerca del codón de inicio de una región de codificación. Corriente arriba del codón de inicio de casi todos los ARNm's de *E. coli*, se encuentra la secuencia Shine-Dalgarno (S/D) (25), la cual forma pares de bases Watson-Crick con el ARNr 16S de la subunidad 30S (26). Entre estos dos elementos se encuentra una región de

longitud variable y composición de nucleótidos denominada “espaciador” como se muestra en la Tabla 4. Mediante análisis genéticos y estadísticos, la longitud óptima de esta secuencia aparece en nueve nucleótidos.

Tabla 4.- Determinación de actividad específica de β -galactosidasa en una serie wkN, en la cual se han utilizado diferentes longitudes del “espaciador” al sitio de unión del ribosoma (27).

Clona	Secuencia	Actividad específica	
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
wk2	AAAAAAAAAAGGA AAA	0	72
wk3	AAAAAAAAAGGA AAAA	0	85
wk4	AAAAAAAAAGGA AAAAA	0	217
wk5	AAAAAAGGA AAAAAA	1.8	916
wk6	AAAAAGGA AAAAAAA	5.8	1323
wk7	AAAAGGA AAAAAAAA	10.4	3088
wk8	AAAGGA AAAAAAAA	13.3	2573
wk9	AAAGGA AAAAAAAA	25.4	2523
wk11	AAAGGA AAAAAAAA	20.3	1719
wk12	AAAGGA AAAAAAAA	21.1	1182

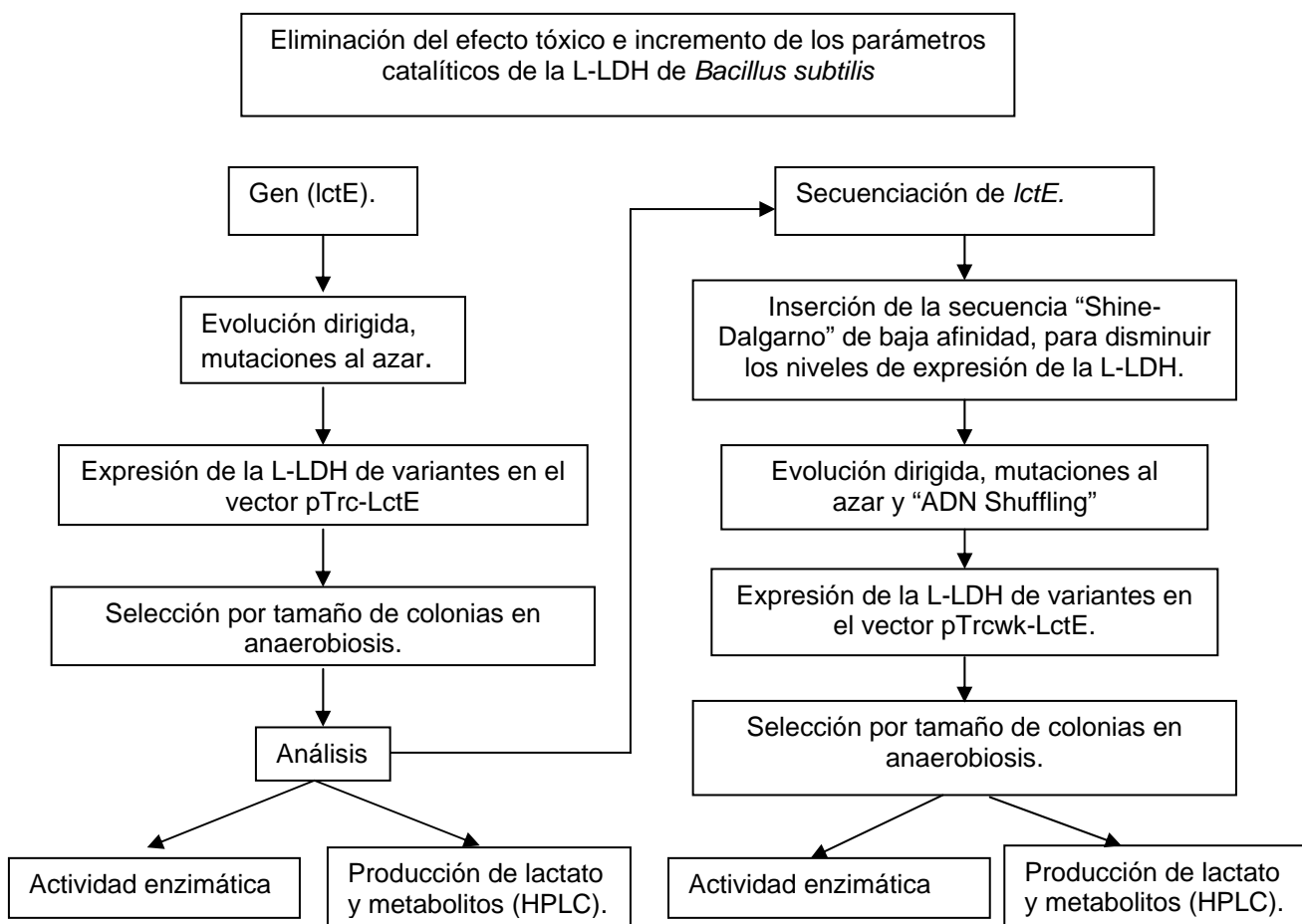
Por lo tanto, para disminuir los niveles de expresión (traducción) se utilizará una secuencia “Shine-Dalgarno” de baja afinidad al sitio de unión del ribosoma, lo cual permitirá bajar los niveles de expresión de la L-LDH en el medio intracelular, de tal manera que se pueda inferir sobre mutaciones que estén involucradas propiamente en el mejoramiento de los parámetros catalíticos y no en la sobre-expresión de la proteína.

Posteriormente se realizará evolución dirigida a la secuencia que codifica *lctE* y se integrará en el vector de expresión pTrc-lctEwn, las colonias transformadas serán seleccionadas con base en su velocidad de crecimiento en condiciones anaerobias. Finalmente se medirán los parámetros cinéticos de la L-LDH y las

concentraciones de lactato y ácidos carboxílicos mediante técnicas previamente mencionadas.

El Diagrama 1 muestra la estrategia empleada para lograr mejorar los parámetros catalíticos y disminución del efecto tóxico.

DIAGRAMA DE FLUJO 1.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para lograr la selección de una variante LDH capaz de abatir los efectos tóxicos y mejorar sus parámetros catalíticos, es necesario lograr establecer un método de selección eficaz que permita discernir entre variantes con características benéficas para la productividad de ácido láctico, por lo tanto, nosotros decidimos poner a prueba el método de selección planteado por Vázquez-Limón C (21), en la búsqueda de una mutante con características tales que mejoren el crecimiento microbiano bajo la inducción con IPTG, y a la vez demuestren que el método de selección basado en la regeneración de NAD⁺ permite ser un método adecuado para la selección de variantes de enzimas fermentativas en el mejoramiento de sus propiedades catalíticas.

Tamaño del banco.

Con la finalidad de determinar el tamaño del banco, el cual es importante para conocer la tasa mutagénica, se partió del producto de ligación en el cual se obtuvieron 4 ml de medio, generados durante la transformación, se tomó 1 μ l que fue inoculado en una caja con medio LB-GLU, donde se observaron 52 colonias después de 24 h de crecimiento, por tanto; en 4 ml se tiene aproximadamente 208,000 variantes resultado de la transformación.

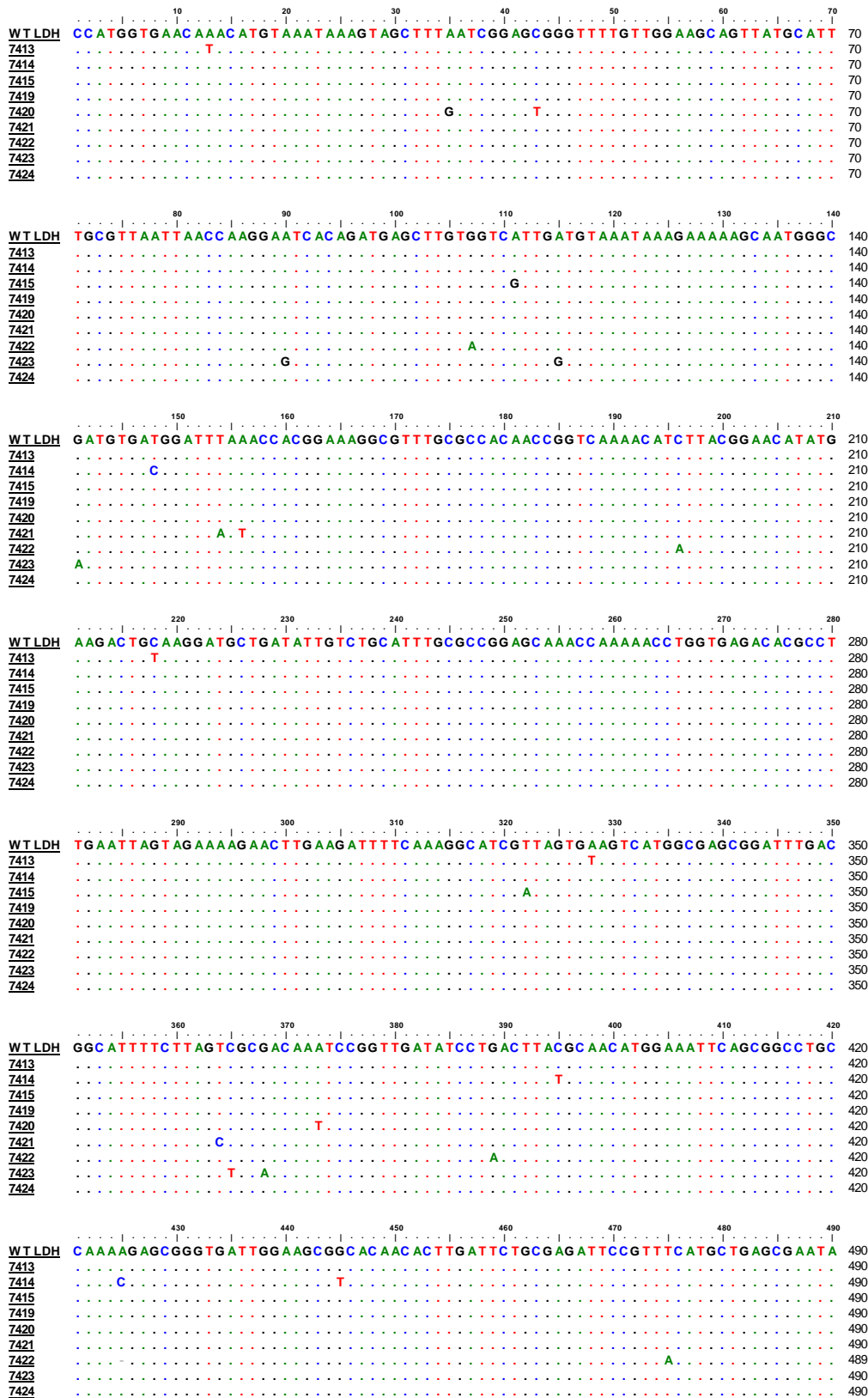
Debido a que después de la digestión sólo se observaron 12 plásmidos con inserto de los 15 que fueron seleccionados, el tamaño del banco disminuye a 166,400. Sin embargo, sólo 9 corresponden al tamaño de banda esperado (Figura 7), por tanto el tamaño del banco final es de 124,800 variantes. Las nueve variantes

mencionadas se enviaron a secuenciar (Figura 10), corroborando la presencia de la secuencia *lctE* de *Bacillus subtilis*, y se alinearon los aminoácidos mediante el programa de BioEdit. La Tabla 5 muestra los resultados de secuenciación.

Tabla 5.- Resultados de secuenciación.

Número de variantes	9
Número total de cambios de nucleótidos	49
Espacio analizado	9225 nucleótidos
Tasa mutagénica	0,53 % (Aprox. 5,5 cambios por secuencia)
Transversiones	24 (48,97%)
Transiciones	24 (48,97%)
Deleciones	1 (2,04%)
Mutaciones a cambio de aa	36 (73,47%)
Mutaciones silenciosas	13 (26,53%)

Figura 10.- Secuencias de nueve variantes de *lctE* de *B. subtilis*, alineadas en sus secuencias de nucleótidos y aa.



WTLDH
 7413 CTTTGGCGCAGCGCCTCAAACGTACACGGCATATTATCGGAGAGCACGGCGACACAGAGCTTCCGT 560
 7414 G C 560
 7415 T 560
 7419 560
 7420 560
 7421 560
 7422 T 559
 7423 560
 7424 560

WTLDH
 7413 TGGAGCCACGGGAATGTCGGCGGTGTGCCGGTCAGTGAACTCGTTGAGAAAAACGATGCGGTACAAACAAG 630
 7414 T 630
 7415 T T 630
 7419 630
 7420 630
 7421 C 630
 7422 629
 7423 630
 7424 630

WTLDH
 7413 AGGAGCTGGACCAATTGTAGATGATGTGAAAAACGACGCTTACCATATCATTGAGAAAAAGGCGCGAC 700
 7414 A 700
 7415 700
 7419 A 700
 7420 700
 7421 T 700
 7422 699
 7423 700
 7424 C 700

WTLDH
 7413 TTATTATGGGTTGCGATGAGTCTTGCTCGCATTACAAAAGCCATTCTTCATAATGAAAACAGCATATTA 770
 7414 T C 770
 7415 770
 7419 770
 7420 770
 7421 A 770
 7422 769
 7423 T 770
 7424 770

WTLDH
 7413 ACTGTCAGCACATATTTGGACGGCAATACGGTGCAGATGACGTGTACATCGGTGTGCCGGCTGTCGTGA 840
 7414 C 840
 7415 C 840
 7419 C 840
 7420 840
 7421 A 840
 7422 839
 7423 840
 7424 840

WTLDH
 7413 ATCGCGGAGGGATCGCAGGTATCACCTGAGCTGAACTTAAATGAGAAAGAAAAGAACAGTTCCTTCCACAG 910
 7414 T 910
 7415 910
 7419 910
 7420 910
 7421 910
 7422 909
 7423 C 910
 7424 910

WTLDH
 7413 CGCCGGCGTCCTTAAAAACATTTTAAAACCTCATTTTGCAGAACAAAAGTCAACCACCACCACCACCAC 980
 7414 T 980
 7415 980
 7419 980
 7420 980
 7421 980
 7422 979
 7423 980
 7424 980

```

      990      1000      1010      1020
WT LDH CACTAATAGGGATCCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT 1025
7413 ..... 1025
7414 ..... 1025
7415 .....T..... 1025
7419 ..... 1025
7420 ..... 1025
7421 ..... 1025
7422 ..... 1024
7423 ..... 1025
7424 ..... 1025

```

alineamiento aa

```

      10      20      30      40      50      60      70
WT LDH MVNKHVNKVALIGAGFVGSYAFALINQGI TDELVVIDV NKEKAMGDVMDLNHGKAFAPQPVKTSYGYE 70
7413 .....I..... 70
7414 ..... 70
7415 .....V..... 70
7419 ..... 70
7420 .....V..... 70
7421 .....Y..... 70
7422 ..... 70
7423 .....V.....G.....N..... 70
7424 ..... 70

```

```

      80      90      100      110      120      130      140
WT LDH DCKDADIVCICAGANQKPGETRLLELVKLNKIFKGI VSEVMASGFDGIFLVATNPVDILT YATWKFSGLP 140
7413 .....V..... 140
7414 ..... 140
7415 .....D..... 140
7419 ..... 140
7420 .....I..... 140
7421 .....A..... 140
7422 ..... 140
7423 ..... 140
7424 ..... 140

```

```

      150      160      170      180      190      200      210
WT LDH KERVI GSGTTLDSARFRFMLSEYFGAAPQNVH AH IGEHGDTELPVW SHANVGGVPVSELVEKNDAYKQE 210
7413 .....T..... 210
7414 N.....V.....G.....H..... 210
7415 .....I.V..... 210
7419 ..... 210
7420 .....P..... 210
7421 ..... 210
7422 .....Y.....Y..... 209
7423 ..... 210
7424 ..... 210

```

```

      220      230      240      250      260      270      280
WT LDH ELDQIVDDVKNAAAYH I EKKGATYYGVAMSLARITKAILHNENSILTVSTYLDGQYGADDVYIGVPAVVN 280
7413 .....E.....V.....T.....R..... 280
7414 ..... 280
7415 .....S.....L..... 280
7419 ..... 280
7420 ..... 280
7421 .....Y.....T..... 280
7422 ..... 279
7423 .....I..... 280
7424 .....L..... 280

```

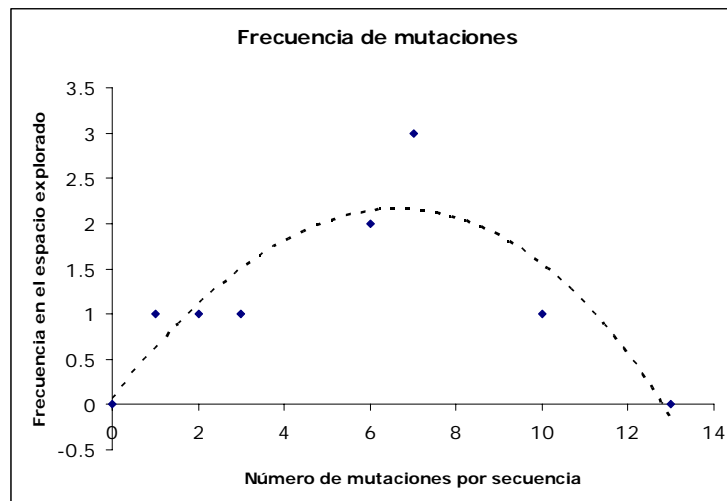
```

      290      300      310      320
WT LDH RGGIAGITELNLEKEKEQFLHSAGV LKNILKPHFAEQKVNHHHHHH 327
7413 ..... 327
7414 .....V..... 327
7415 ..... 327
7419 ..... 327
7420 ..... 327
7421 ..... 327
7422 ..... 326
7423 .....D..... 327
7424 ..... 327

```

De acuerdo a las recomendaciones proporcionadas por el protocolo de la compañía GeneMorph, mostradas en la Tabla 3, se determinó adicionar 2.5 µg de ADN de muestra inicial al tubo de reacción de la PCR, así como 20 ciclos de amplificación, los datos proporcionados por el protocolo corroboran con la Gráfica 1, en la cual se observa un máximo en la frecuencia mutagénica alrededor de 6 mutaciones por secuencia, dato que se encuentra en el intervalo de 4,5 a 9 mutaciones proporcionado por el protocolo.

Gráfica 1.- Frecuencia mutagénica evaluada en 9 secuencias del gen *lctE* de *Bacillus subtilis*.



Selección de colonias.

Una vez que se obtuvo el banco con aproximadamente 124,800 variantes, este fue transformado en la cepa VAL23, el producto de transformación fue colocado en cajas con medio LB-GLU, y depositado en una cámara de anaerobiosis, otra muestra fue colocada en condiciones aerobias, una más en un tubo con medio LB-GLU líquido sellado herméticamente. Después de 48 h se observaron colonias. En

condiciones anaerobias se obtuvieron aproximadamente 30 colonias perceptibles con diversos diámetros, en la caja bajo condiciones aerobias se observaron alrededor de 150 colonias, también con diferentes tamaños, y se tomó una alícuota del medio líquido después de 24 h, el cual fue colocado en una caja con medio LB-GLU, se observó sólo una colonia después de 48 h de crecimiento.

Posteriormente se tomó una colonia del crecimiento líquido (1A), 3 colonias bajo condiciones anaerobias, las de mayor tamaño (3A, 4A, 5A,), tres colonias bajo condiciones aerobias (5B, 6B, 7B), y se extrajo plásmido de las variantes anteriores, los cuales fueron digeridos con NcoI y HindIII, y separados en un gel de agarosa al 1% como se muestra en las Figuras 11 y 12.

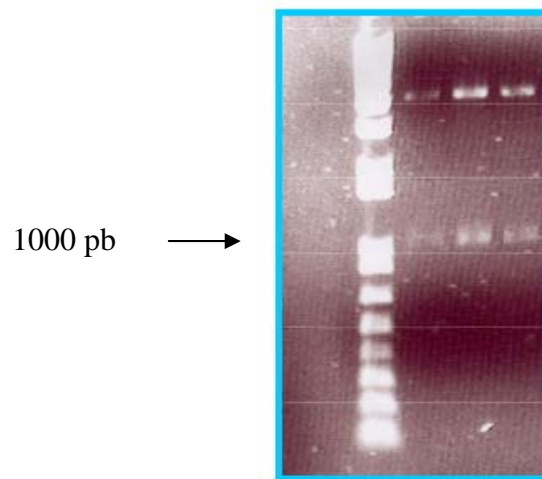


Figura 11.- Digestiones de plásmido con Nco I y HindIII de las variantes 5B, 6B y 7B, las cuales fueron seleccionadas bajo condiciones aerobias.

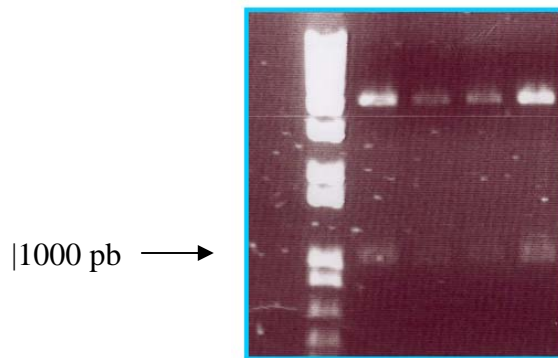


Figura 12.- Digestión de plásmido con NcoI y HindIII de las variantes 1A, 3A, 4A y 5A, en condiciones anaerobias.

A partir de la extracción de plásmido de las células obtenidas en medio líquido bajo condiciones anaerobias, se retransformó la cepa VAL23, y se seleccionaron en medio sólido, nuevamente cepas capaces de crecer en anaerobiosis, cepas capaces de crecer bajo tales condiciones, como ya ha sido mencionado con anterioridad aquellas variantes sin actividad LDH, no podrán crecer, a diferencia de las variantes con alta capacidad de regeneración NAD^+ , por tanto en esta selección se obtuvieron alrededor 20 colonias y fueron seleccionadas aquellas de mayor tamaño, (1P*, 2P*, 3P*, 4P*, 5P*).

Una tercera selección fue llevada a cabo en presencia de IPTG bajo condiciones de anaerobiosis, utilizando el mismo banco inicial, y retransformando en VAL23, de esta selección se tomaron 10 colonias (1T3, 2T3, 3T3, 4T3, 5T3, 6T3, 12NB, 13NB, 14NB, 15NB), el plásmido extraído de estas variantes fue digerido con las enzimas NcoI, y HindIII, y separado en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la Figura 13.

Después de la digestión con las enzimas de restricción, se observó que sólo algunas variantes contenían el plásmido y se digerían de manera correcta, por lo que se enviaron a secuenciar, obteniendo sólo las secuencias 2P*, 5P* y 13NB.

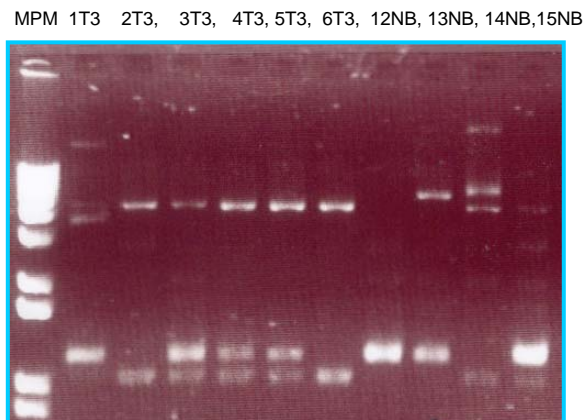


Figura 13.- Digestión de la secuencia *lctE* de *Bacillus subtilis* del plásmido pTrc, seleccionadas en medio líquido, y sólida (segunda selección), con las enzimas NcoI y HindIII.

Secuenciación de las variantes de selección.

Con base en los datos obtenidos de las digestiones, y una vez que se observó la presencia del inserto *lctE* de las diferentes variantes, se secuenciaron 12 mutantes (Figura 14).

Las siguientes tres imágenes muestran 12 secuencias con sus respectivas mutaciones (WT (*Bacillus subtilis*), 1A, 3A, 4A, 5A, 5B, 6B, 7B, 13NB, 5P*, 2T3, 2P*, 6T3). Los nucleótidos observados muestran los cambios de las diferentes variantes en relación con la cepa silvestre de *Bacillus subtilis* (WT).

Figura 14.- Secuenciación de 12 variantes de *Bacillus subtilis*.

```

WT      CCATGGTGAACAAACATGTAATAAAGTAGCTTTAATCGGAGCGGGTTTTGTTGGAAGCAGTTATGCATTGCGTTAATTAACCAAGGAA
1A      .....G.....
3A      .....
4A      .....
5A      .....
5B      .....
6B      .....G.....
7B      .....
2T3     .....
13NB    .....
5P*     .....G.....
2P*     .....
6T3     .....G.....A.....

WT      TCACAGATGAGCTTGTGGTCATTGATGTAATAAAGAAAAGCAATGGGCGATGTGATGGATTAAACCACGGAAGGCGTTTTCGCCAC
1A      .....
3A      .....
4A      .....
5A      .....
5B      .....
6B      .....A.....
7B      .....
2T3     .....
13NB    .....
5P*     .....
2P*     .....
6T3     .....

WT      AACCGGTCAAAACATCTTACGGAACATATGAAGACTGCAAGGATGCTGATATTGTCTGCATTTGCGCCGAGCAAACCAAAACCTGGTG
1A      .....
3A      .....
4A      .....C.....
5A      .....
5B      .....T.....
6B      .....
7B      .....
2T3     .....A.....T.....
13NB    .....
5P*     .....
2P*     .....T.....
6T3     .....A.....T.....

WT      AGACACGCCTTGAATTAGTAGAAAAGAACTTGAAGATTTTCAAAGGCATCGTTAGTGAAGTCATGGCGAGCGGATTTGACGGCATTTC
1A      .....C.....
3A      .....C.....
4A      .....C.....
5A      .....
5B      .....
6B      .....
7B      .....
2T3     .....A.....
13NB    .....T.....
5P*     .....
2P*     .....A.....
6T3     .....

WT      TAGTCGCGACAAATCCGGTTGATATCCTGACTTACGCAACATGGAAATTCAGCGGCCTGCCAAAAGAGCGGGTGATTGGAAGCGGCACAA
1A      .....T.....
3A      .....
4A      .....C.....A.....
5A      .....
5B      .....
6B      .....T.....
7B      .....
2T3     .....
13NB    .....
5P*     .....A.....
2P*     .....
6T3     .....

```

WT CACTTGATTCTGCGAGATTCCGTTTCATGCTGAGCGAATACTTTGGCGCAGCGCCTCAAAACGTACACGCGCATATTATCGGAGAGCACG
 1AT.....T.....
 3A
 4A
 5AT.....
 5B
 6BG.....
 7B
 2T3A.....C.....
 13NB
 5P*
 2P*
 6T3

WT GCGACACAGAGCTTCCTGTTGGAGCCACGCGAATGTCGGCGGTGTGCCGGTCAGTGAACCTCGTTGAGAAAAACGATGCGTACAAACAAG
 1A
 3A
 4AT.....
 5AT.....
 5BT.....
 6BT.....
 7B
 2T3
 13NBA.....
 5P*C.....G.....
 2P*
 6T3

WT AGGAGCTGGACCAAATTGTAGATGATGTGAAAAACGCGCTTACCATATCATTGAGAAAAAGGCGGCGACTTATTATGGGGTTGCGATGA
 1A
 3A
 4A
 5A
 5B
 6B
 7BA.....
 2T3
 13NB
 5P*
 2P*
 6T3G.....T.....

WT GTCTTGCTCGCATTACAAAAGCCATTCTTCATAATGAAAACAGCATATTAACGTGTCAGCACATATTGGACGGGCAATACGGTGCAGATG
 1A
 3A
 4A
 5A
 5BA.....
 6BA.....
 7B
 2T3
 13NB
 5P*C.....
 2P*
 6T3

WT ACGTGTACATCGGTGTGCCGGTGTGCGTGAATCGCGGAGGGATCGCAGGTATCACTGAGCTGAACTTAAATGAGAAAAGAAAAAGAACAGT
 1A
 3A
 4AA.....
 5A
 5BT.....
 6BG.....
 7B
 2T3A.....T.....
 13NBT.....
 5P*
 2P*A.....
 6T3

WT TCCTTCACAGCGCGGCGTCTTAAAAACATTTTAAAACCTCATTTGTCAGAACAAAAGTCAACCACCACCACCACCACCTAATAGG
 1AG.....
 3A
 4A
 5A
 5BC.....
 6BA.....
 7BT.....
 2T3T.....
 13NB
 5P*A.....
 2P*T.....
 6T3A.....

```

WT      GATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT
1A      .....
3A      .....
4A      .....
5A      .....
5B      .....
6B      .....
7B      .....
2T3     .....
13NB    .....
5P*     .....
2P*     .....
6T3     .....

```

La Tabla 6 muestra el reporte de las secuencias de selección de las 12 variantes anteriores, obtenidas bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Tabla 6.

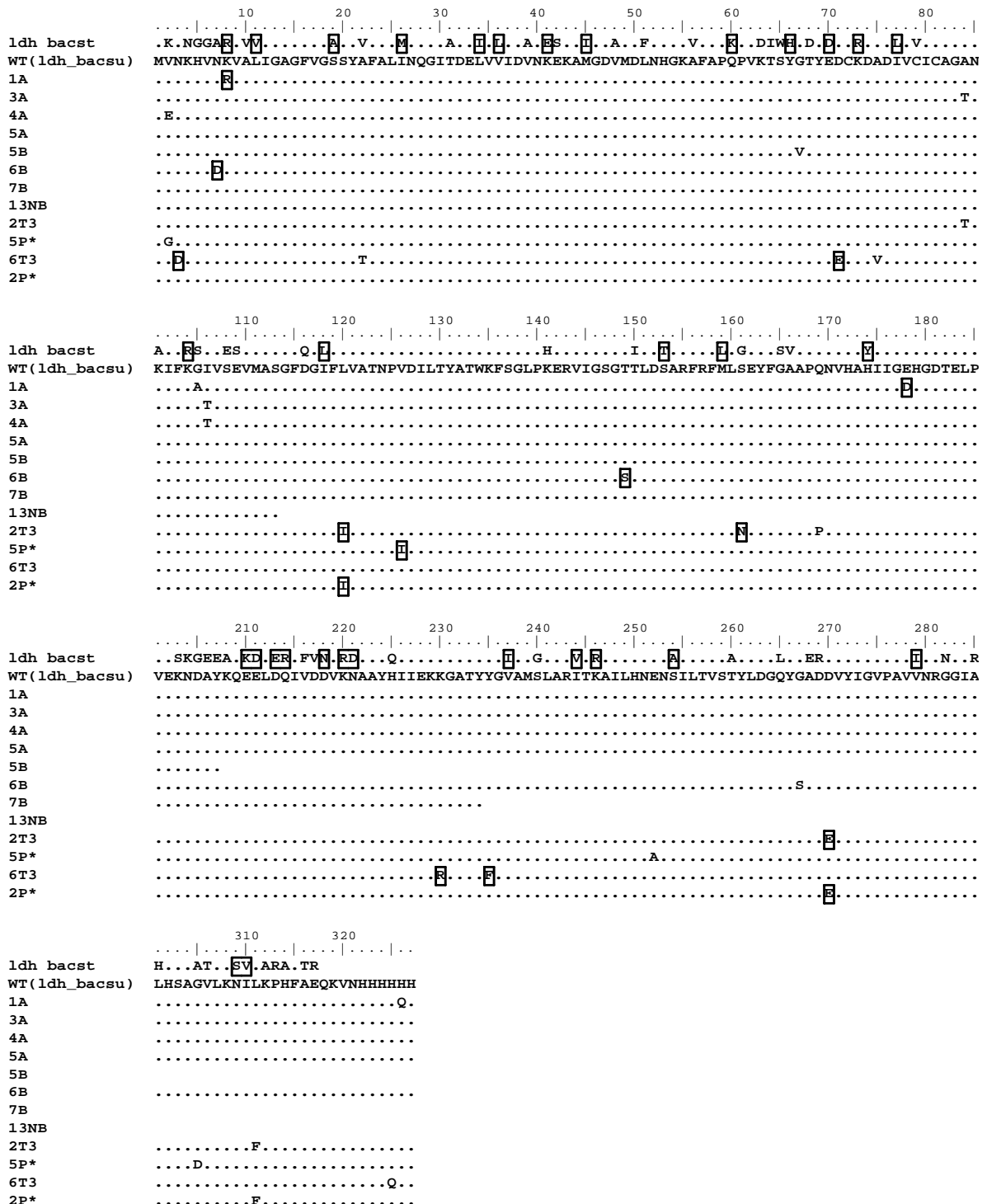
Número de variantes	12
Número total de cambios de nucleótidos	58
Espacio analizado	12,300 nucleótidos
Tasa mutagénica	0.471 % (Aprox. 4,83 cambios por secuencia)
Transversiones	30 (51.7%)
Transiciones	28 (48.3%)
Deleciones	0
Mutaciones a cambio de aa. (sin incluir aa después de codón de paro)	32 (55.17%)

Alineamiento.

Una vez realizado el alineamiento basado en nucleótidos, se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las diferentes variantes para lo cual se utilizó el programa "BioEdit". En la Figura 15 se observa el alineamiento de 12 variantes del gen *lctE*, *ldh bacs* (WT de *Bacillus subtilis*); y la secuencia *ldh bacst* (*Bacillus stearothermophilus*), en esta figura se observan 3 secuencias truncadas, producto de aminoácidos de paro, dos de ellas obtenidas de la selección bajo condiciones aerobias, la 5B y 7B, debido aparentemente a que la proteína al desnaturalizarse no causa ningún efecto de toxicidad, y por tanto logra crecer aún bajo inducción con IPTG en condiciones aerobias, logrando observar crecimiento, estas mismas cepas fueron retransformadas y se inocularon en cajas bajo condiciones anaerobias, en las cuales no se observó crecimiento, lo anterior permite corroborar que el método de selección, bajo condiciones anaerobias, conlleva a selección de colonias con actividad LDH, ya que la cepa VAL23 tiene una tasa de crecimiento muy lenta bajo tales circunstancias, y sólo una proteína LDH con suficiente actividad restauraría el equilibrio redox, permitiendo el crecimiento en condiciones anaerobias.

En la Figura 15 se pueden percibir 32 cambios de aa en todas las sus variantes, los recuadros seleccionan aa similares comparados entre *bacst*, *ldh basu* y variantes.

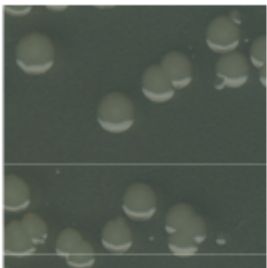
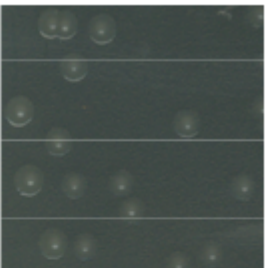
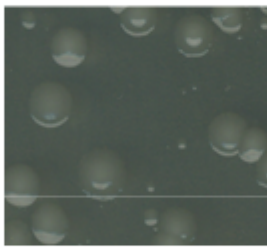
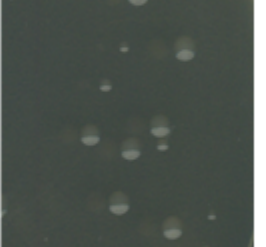
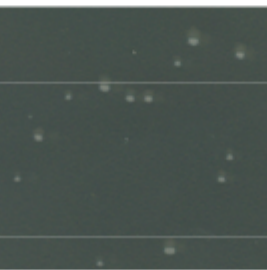
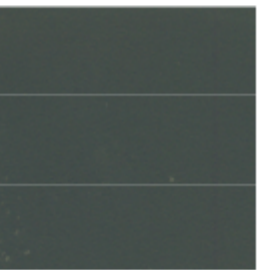
Figura 15.- Alineamiento de aa



Retransformación.

Conociendo las secuencias de las variantes, se retransformó nuevamente en VAL23, y cada mutante fue colocada en cajas con medio LB-GLU, y en una cámara de anaerobiosis, los resultados observados después de 48 hrs. de crecimiento se muestran en la Figura 16 y 17.

Figura 16-. Unidades formadoras de colonias bajo inducción con IPTG de 5 variantes, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

	IPTG (Aerobiosis)	IPTG (Anaerobiosis)
1A		
3A		
4A		

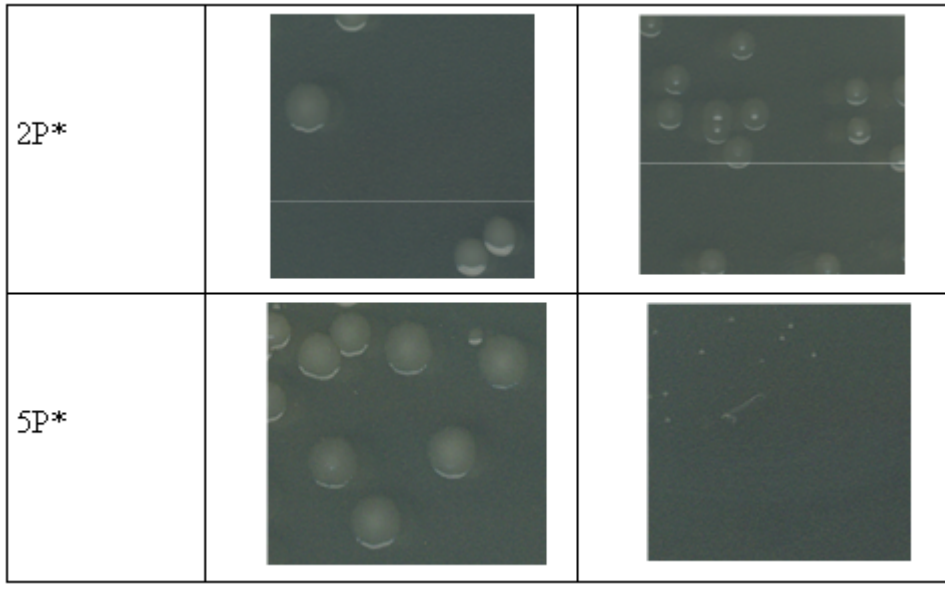
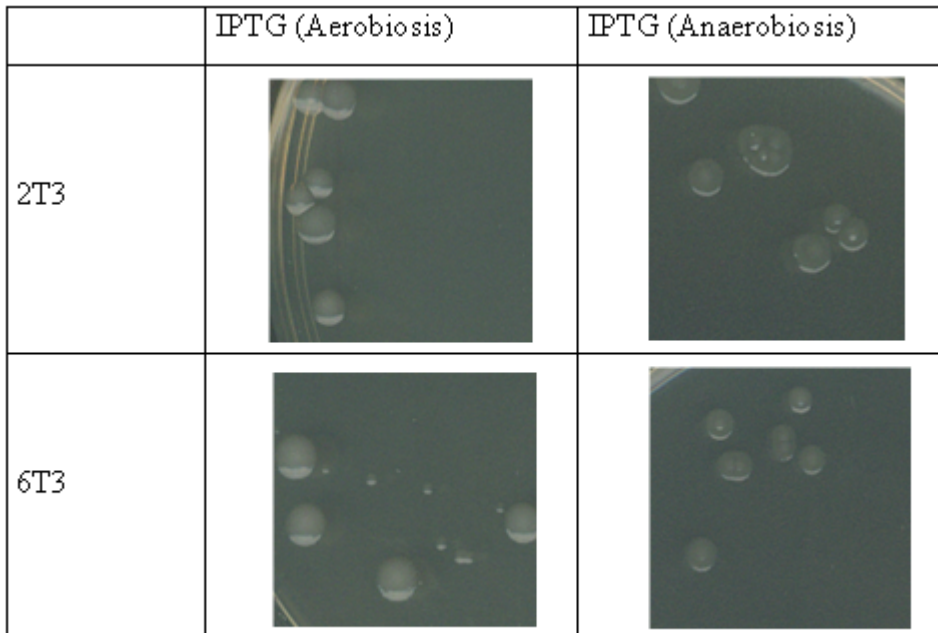
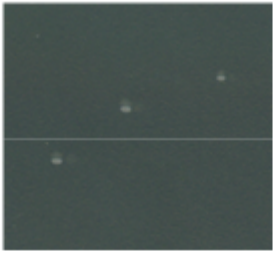
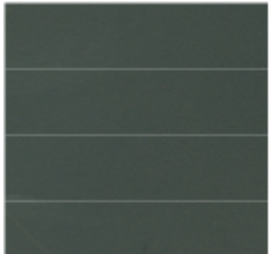
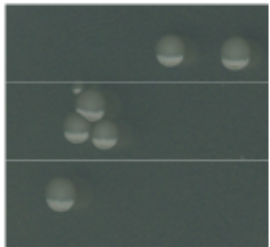
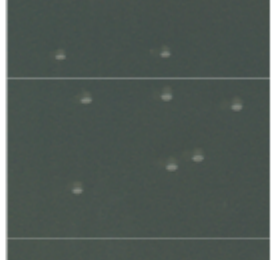
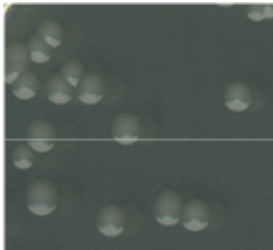

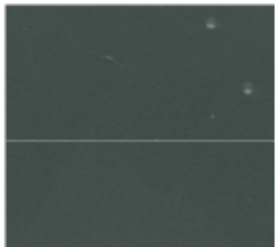
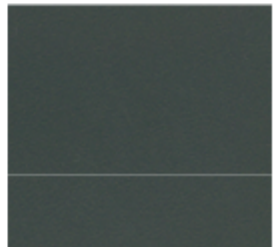


Figura 17. Unidades formadoras de colonias bajo inducción con IPTG de 5 variantes, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.



7B		
4P*		
13NB		
WT (<i>Bacillus subtilis</i>)		

En las imágenes anteriores se observa crecimiento en todas las variantes bajo condiciones aerobias, algunas con mayor tamaño que otras, observando crecimiento disminuido en las variantes 4A, 9T3 y WT, sin embargo; bajo condiciones anaerobias, sólo las variantes 1A, 3A, 2P*, 2T3, 6T3, presentan crecimiento apreciable, teniendo a las variantes 2T3, 6T3, y 2P* con el diámetro más perceptible; en las variantes 4P*, 5P*, 7B, 13NB y WT no se observa crecimiento, corroborando hasta el momento con los datos obtenidos de la

secuenciación, ya que las variante 13NB, 7B presentan codones de paro, por lo que bajo condiciones anaerobias es imposible la formación colonias, lo mismo sucede con la secuencia silvestre en condiciones de inducción con IPTG.

Fermentaciones.

Para evaluar las variantes anteriores de una manera más cuantitativa, se realizaron fermentaciones en minifermentadores de 200 ml, y se controló el pH mediante la adición de Hidróxido de Potasio (KOH), lo que permite determinar de manera indirecta la actividad de las enzimas con base en el consumo de KOH a lo largo de la fermentación.

La Gráfica 2 muestra el consumo de KOH de 10 variantes, sin inducción con IPTG, en este experimento se colocó como testigo la cepa VAL23 transformada con el plásmido vacío pTrc- (pTrcLDH⁻), incapaz de crecer y consumir KOH, en condiciones anaerobias.

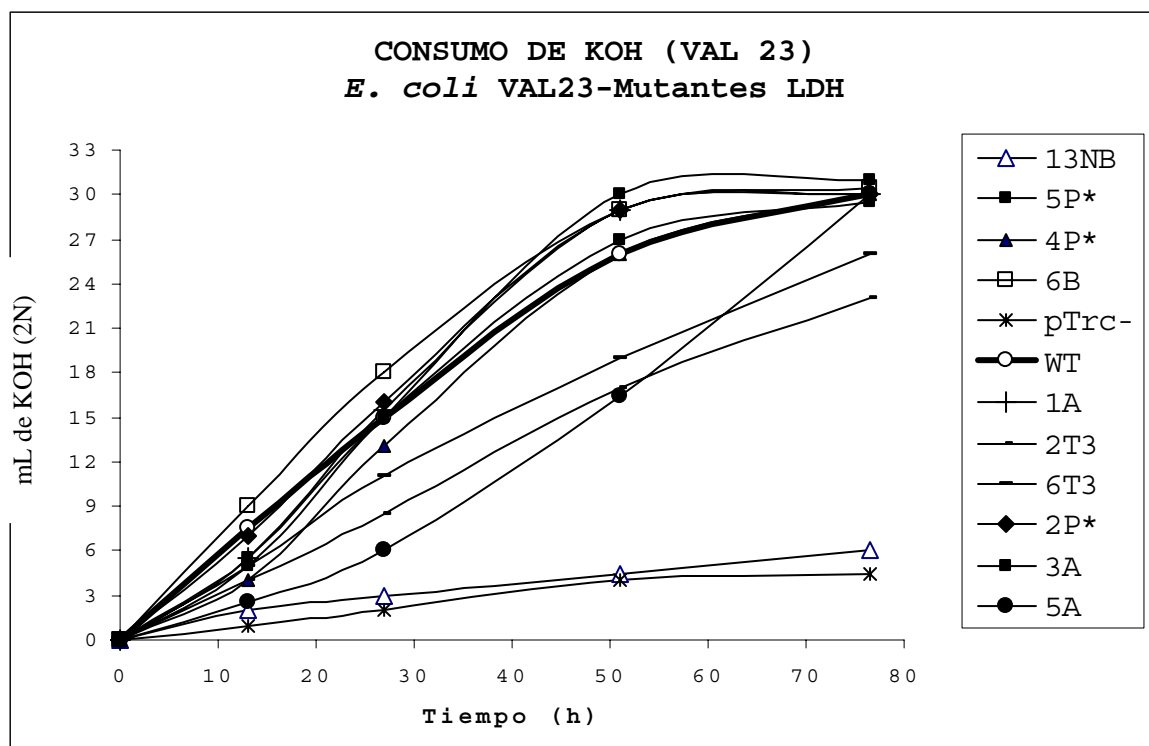
En principio se puede observar que pTrc⁻ y 13NB, no consumen KOH, lo que indica una vez más que la secuencia 13NB, se encuentra troncada por una mutación que le genera un codón de paro, y que efectivamente la cepa pTrc⁻ carece de la enzima, lo que ocasiona una disminución en el consumo de KOH.

Por otro lado, las demás variantes presentan una demanda de KOH en diferentes grados, similares a la WT, sin embargo; las variantes 2T3 y 6T3, tienen un consumo disminuido, igual que la variante 4P*.

Una parte interesante de este experimento son las variantes 6B y 2P*, estas tienen una velocidad de formación de lactato similar a la WT las primeras 12 h; sin

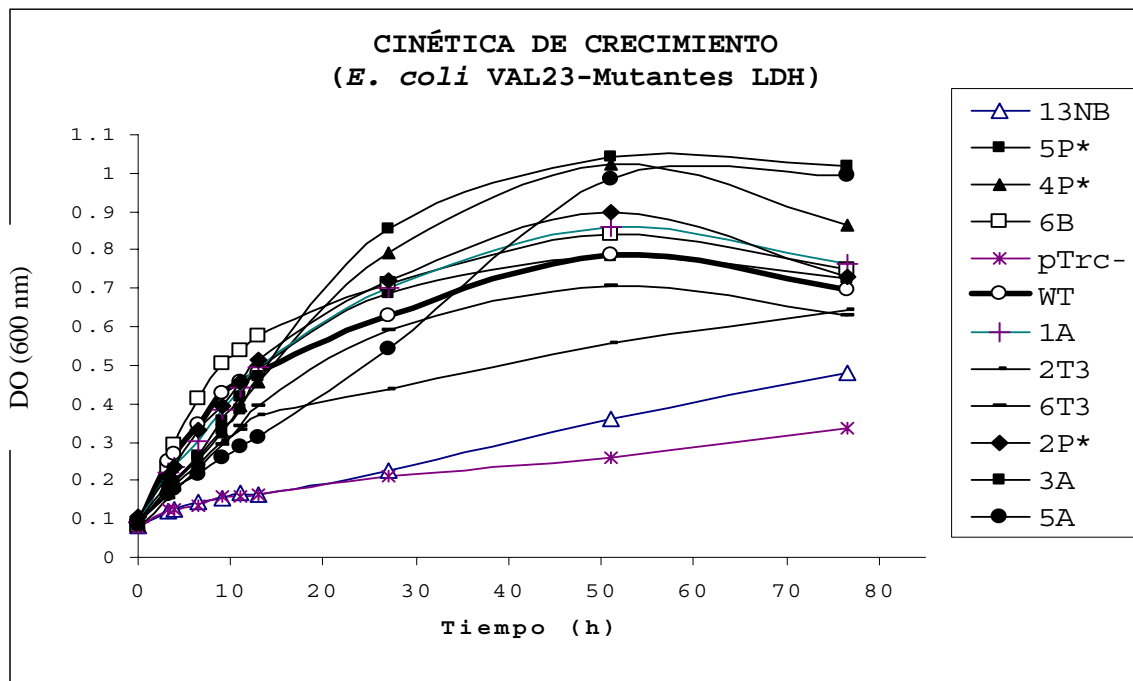
embargo observando la Gráfica 2, cuando alcanzan las 40 h de fermentación han producido la misma cantidad de láctico que la WT a sus 50 h , las variante 3A, tiene un comportamiento similar, sin embargo su productividad las primeras 12 h es inferior, para las variantes 5P* y 1A, el comportamiento es muy similar a la WT, donde la 1A tiene una productividad inferior a la WT las primeras 12 h. Para las 78 h de fermentación el consumo de KOH decae drásticamente cuando se han adicionado aproximadamente 30 mililitros de base, esto es debido a que la velocidad de crecimiento microbiano disminuye cuando la cantidad de glucosa presente en el medio se ha consumido al final de la fermentación.

Gráfica 2. Consumo de KOH durante la fermentación de 10 variantes analizadas (Ph7, 40g/l, Glucosa, Medio Mineral).



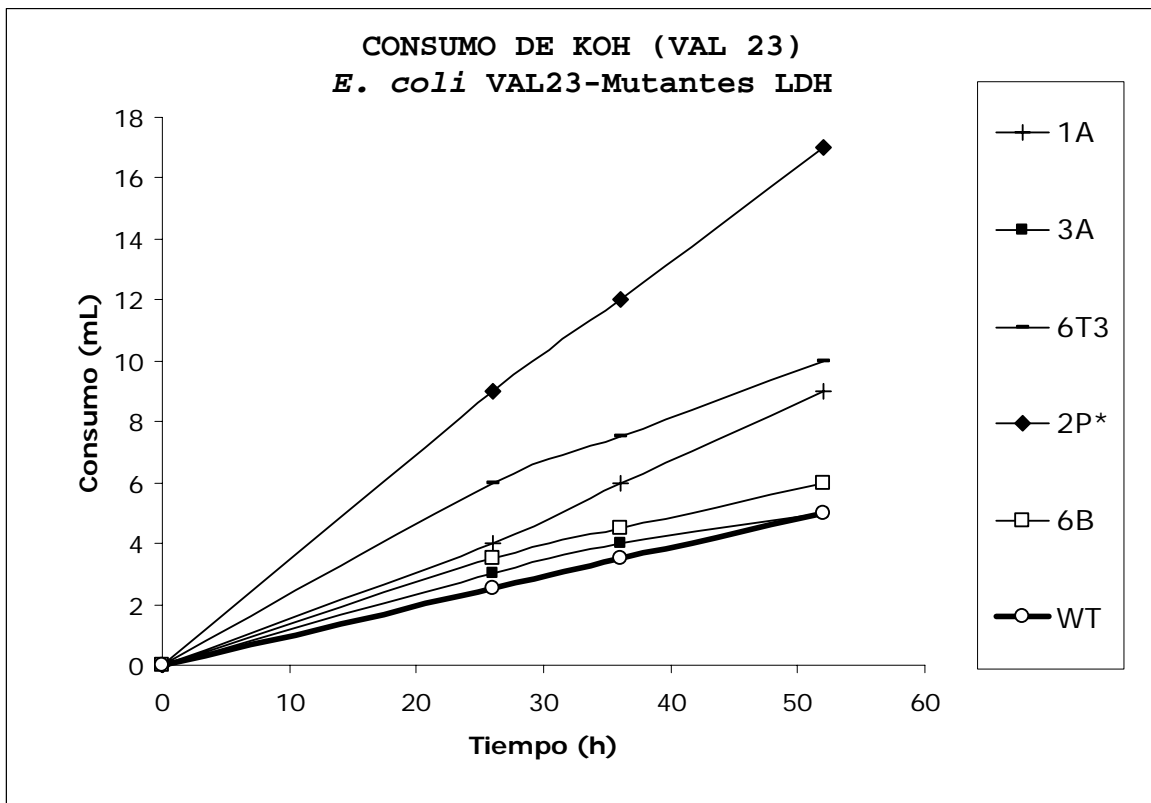
La Gráfica 3 muestra el crecimiento microbiano de la fermentación de 10 variantes sin inducción con IPTG determinado mediante Densidad Óptica (OD) a 600 nm, el comportamiento de las variantes es el mismo observado en el consumo de KOH, en donde las primeras 12 h de fermentación tienen una velocidad de crecimiento similar a la WT como es el caso de las variantes 2P* y 1A. En la variante 6B el comportamiento de crecimiento es muy similar a la WT durante todo el tiempo de fermentación. Las variantes 3A, 4P* y 5A en las primeras 12h tienen una velocidad de crecimiento por debajo de la WT, sin embargo a las 50 h han superado considerablemente a la WT. La variante 2T3 presenta una disminución de crecimiento bastante apreciable en comparación a la WT, posiblemente debido a una baja actividad de la proteína para mantenerse en condiciones anaerobias, dato que corrobora con el poco consumo de KOH, ya que en las pruebas de toxicidad logra crecer sin dificultad; también es claramente perceptible que 13NB y pTrc-, tienen una velocidad de crecimiento muy lenta a comparación de las demás variantes. En resumen, se observan 5 variantes 3A, 1A, 2P*, 5A, 6B con una OD por arriba de la WT alrededor de las 48 h de crecimiento, lo que indicaría una disminución aparente del efecto de toxicidad desencadenado por la expresión basal de la enzima LDH de *Bacillus subtilis*.

Gráfica 3.- Crecimiento microbiano de 10 variantes genéticas *lctE*, durante 78 h de crecimiento sin inducción con IPTG (Ph7, 40g/l, Glucosa, Medio Mineral).



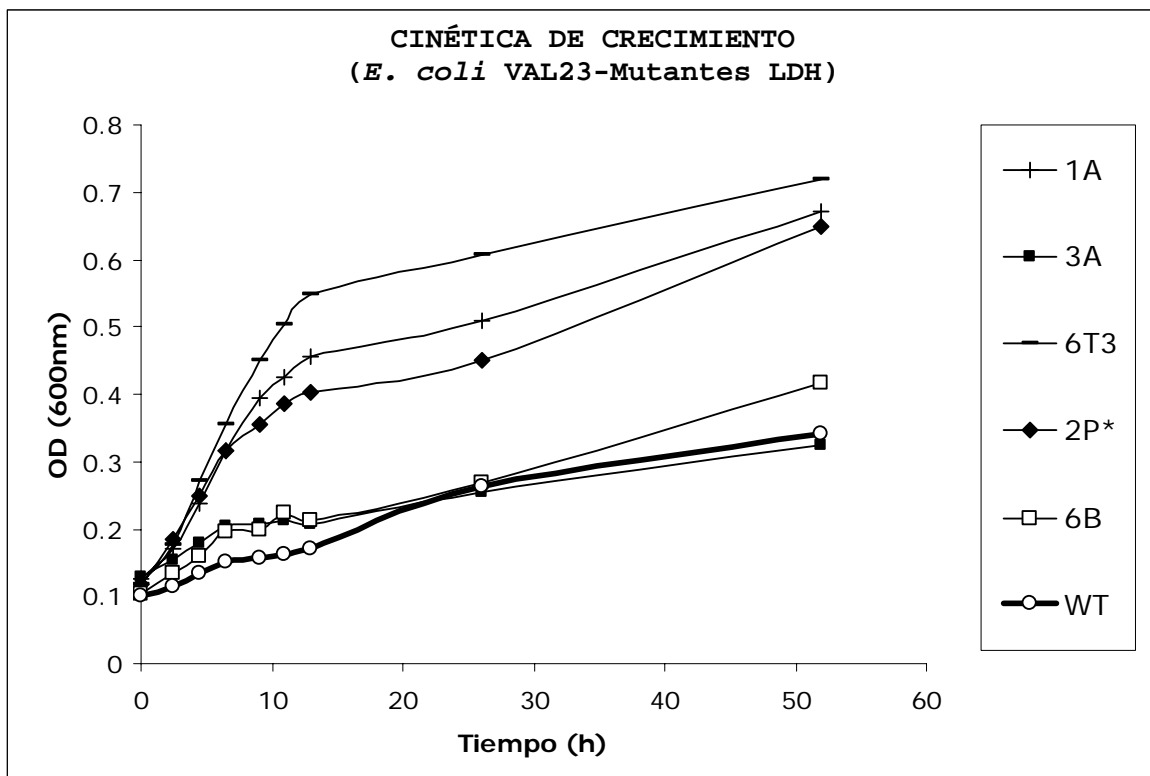
Del experimento anterior se eligieron 5 variantes 1A, 3A, 6T3, 2P*, 6B y WT; cuatro de ellas con mayor crecimiento que la WT a las 50 h de crecimiento, y una por debajo de ésta, la 6T3. La Gráfica 4 muestra el consumo de KOH de las variantes mencionadas con anterioridad, esta fermentación fue realizada bajo inducción con IPTG a una concentración de 0,1mM, en esta gráfica la WT, 6B y 3A tienen muy bajo consumo de KOH, las variantes 6T3 y 1A presentan un consumo medio, y la variante con mejores características en cuanto a consumo de KOH, es la 2P*, con un consumo tres veces mayor que la WT; sin embargo, el consumo de KOH después de 52 h de crecimiento no supera los 18 ml, a diferencia de la fermentación sin presencia de IPTG, para la cual a ese tiempo se han consumido 30 ml de base.

Gráfica 4.- Consumo de KOH de 5 variantes genéticas de la secuencia *lctE* de *Bacillus subtilis* en una fermentación láctica bajo inducción con IPTG.



La Gráfica 5 muestra el crecimiento microbiano de la fermentación bajo inducción con IPTG, la variante 6B y 3A al igual que la WT, presentan una baja velocidad de crecimiento en relación a las variantes 1A, 3A y 6T3, observando una velocidad de crecimiento similar entre ellas; sin embargo, al igual que el consumo de KOH, la velocidad de crecimiento de todas las variantes bajo estas circunstancias es inferior cuando se compara con el crecimiento sin IPTG.

Gráfica 5.- Cinética de crecimiento de la fermentación de 5 variantes genéticas de la secuencia *lctE* de *Bacillus subtilis* bajo inducción con IPTG.

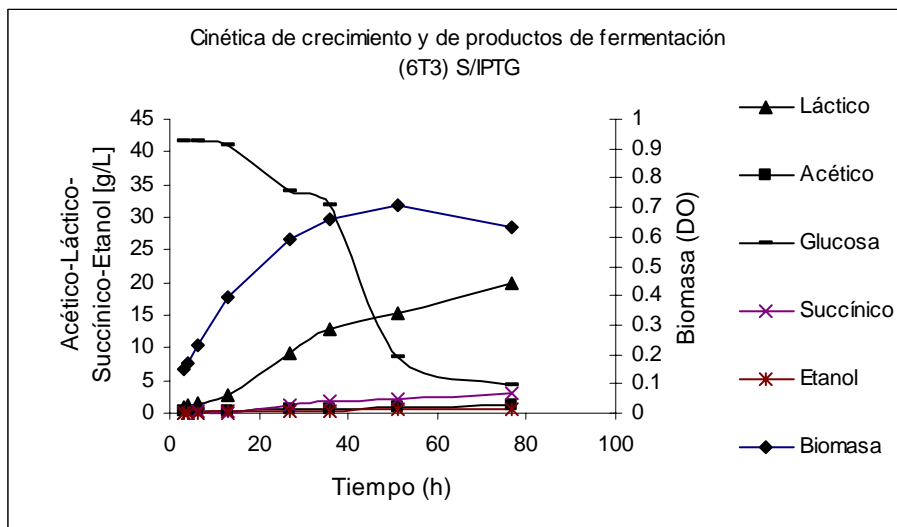


Determinación de producción de ácido láctico mediante HPLC.

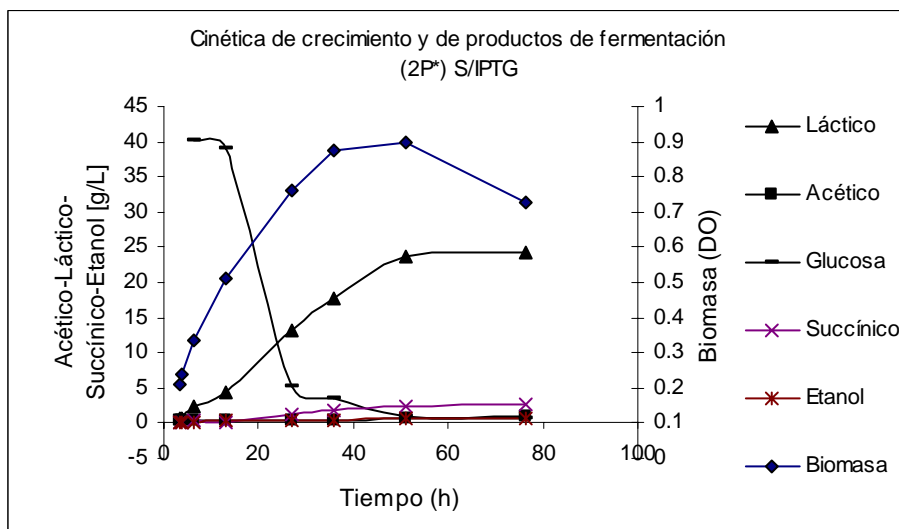
Para corroborar la presencia de ácido láctico obtenido de las diferentes variantes y determinación de ácidos orgánicos presentes en el medio de fermentación, se midió mediante HPLC la presencia de ácido succínico, acético, láctico, glucosa y etanol, para ello se eligieron dos variantes que resultan de interés apreciable, la 2P* y la 6T3 comparada con la WT (*Bacillus subtilis*) y con la cepa VAL23 pTrc-

Las Gráficas 6, 7, 8, 9 muestran datos comparativos de producción de algunos compuestos orgánicos; estos datos fueron obtenidos mediante análisis por HPLC de las variantes 6T3, 2P* y WT y pTrc⁻ sin inducción con IPTG.

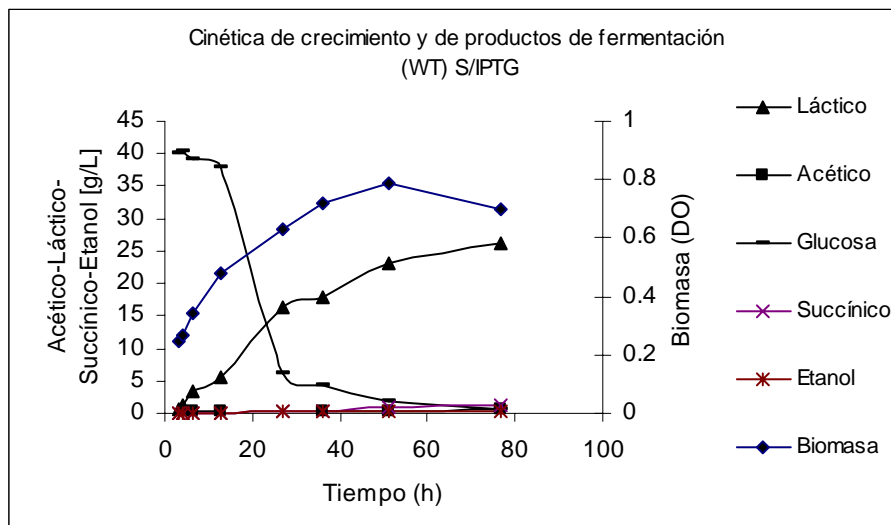
Gráfica 6.- Cinética de crecimiento de la variante 6T3 y de productos de fermentación (sin inducción con IPTG).



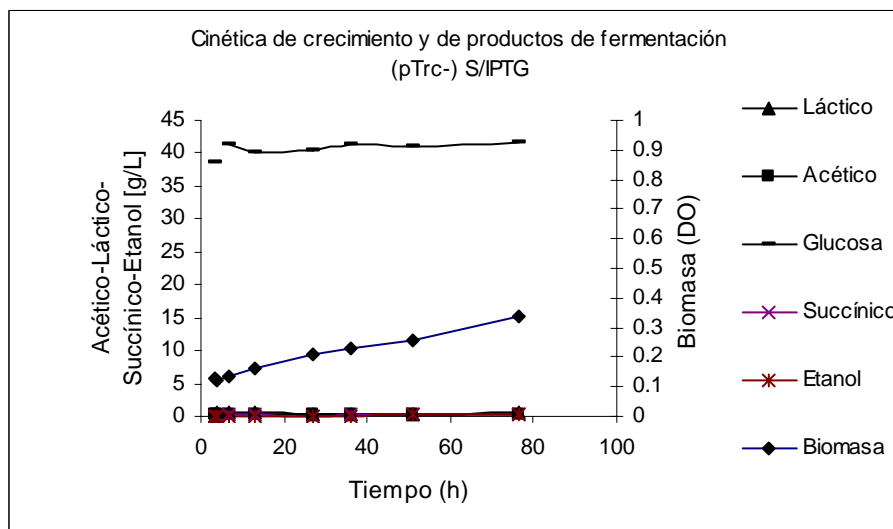
Gráfica 7.- Cinética de crecimiento de la variante 2P* sin inducción con IPTG.



Gráfica 8.- Cinética de crecimiento de la WT (*Bacillus subtilis*) sin inducción con IPTG.

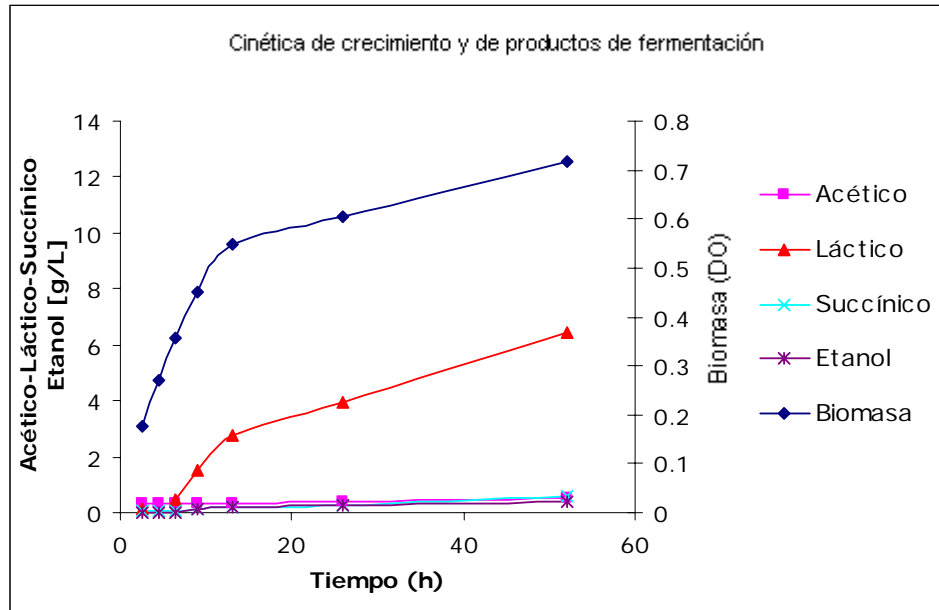


Gráfica 9.- Cinética de crecimiento de pTrc⁻ sin inducción con IPTG.

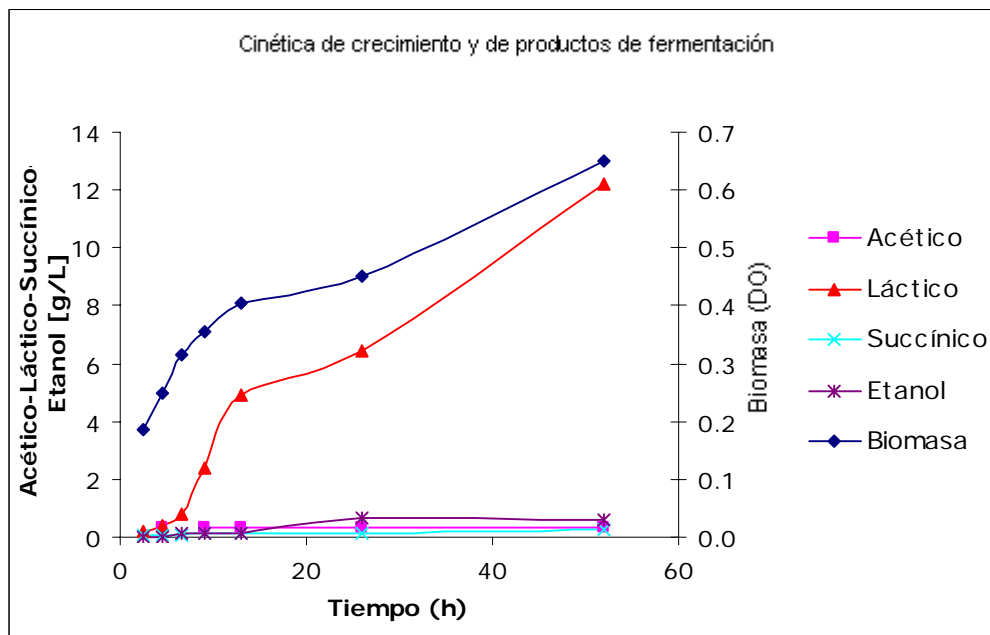


Las Gráficas 10, 11, 12 muestran datos comparativos de la producción de ácidos orgánicos tales como acético, succínico, láctico y otros compuestos como etanol y glucosa, estos datos fueron obtenidos mediante análisis por HPLC de las variantes 6T3, 2P* y WT bajo inducción con IPTG.

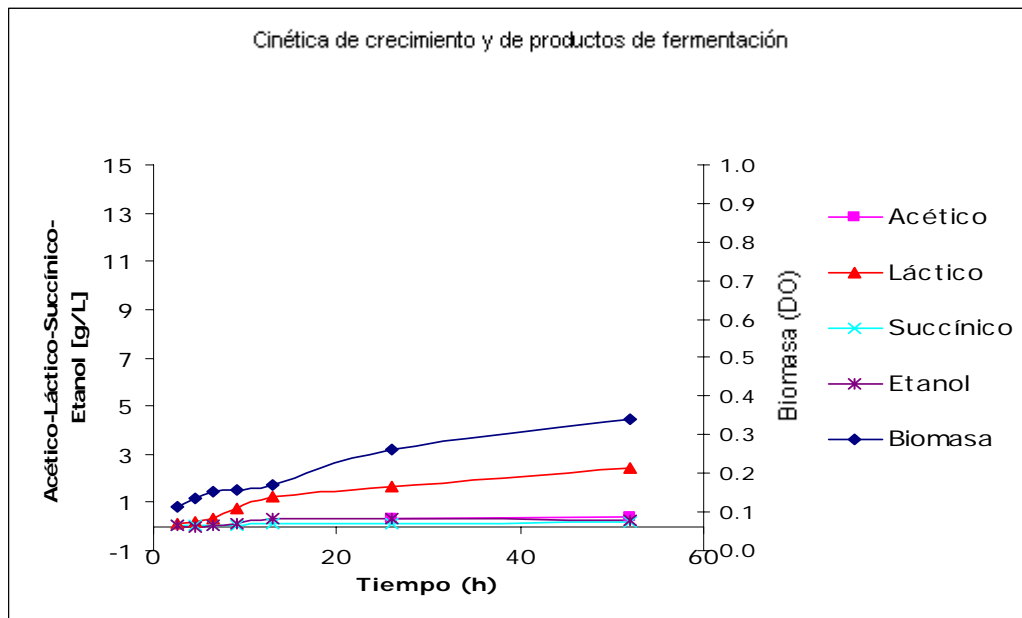
Gráfica 10.- Cinética de crecimiento de la variante 6T3 bajo inducción con IPTG.



Gráfica 11.- Cinética de crecimiento de la variante 2P* bajo inducción con IPTG.



Gráfica 12.- Cinética de crecimiento de la WT (*Bacillus subtilis*) bajo inducción con IPTG.



Niveles de expresión de las variantes de interés en un cultivo no aireado con IPTG.

Se determinaron los niveles de expresión mediante un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% de las variantes enzimáticas 2P*, 6T3, 1A, 3A y WT, y se incluyó como control negativo el extracto celular de la cepa VAL23 transformada con pTrc⁻ (Figura 18), la masa celular fue normalizada a una concentración de 5 OD's antes de ser lisada, en el gel se logra percibir una disminución aparente en los niveles de expresión de algunas variantes como por ejemplo la 3A y 2P*, y también se observa la carencia de proteína en el control negativo pTrc⁻.

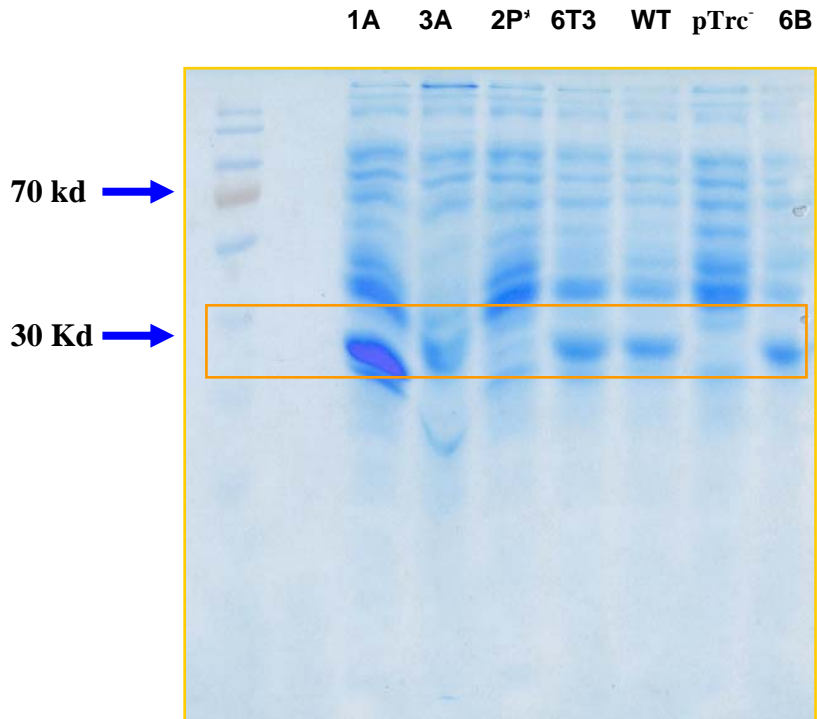


Figura 18.- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para determinar niveles de expresión de la proteína L-LDH.

Debido a que los niveles de expresión resultan disminuidos para la variante (2P*) se hizo un *western* y se determinaron los niveles de expresión mediante el anticuerpo Anti-His acoplado a fosfatasa alcalina. Como se muestra en la Figura 19, los resultados obtenidos muestran niveles de expresión disminuidos para las variantes 2P* 3A y 6T3, es de interés mencionar que la variante 6T3, tiene buenos niveles de expresión cuando se observa en una tinción con *coomassie*, sin embargo, los resultados arrojados por el *western* determinan lo contrario, lo cual puede ser justificado debido al cambio de aminoácido (H325Q) observado en la cola terminal de Histidinas de 6T3 (Figura 15) que es reconocida por Anti-His, este cambio podría afectar el acoplamiento adecuado del anticuerpo, hasta el momento se está corrigiendo esta modificación para fines de purificación de la variante

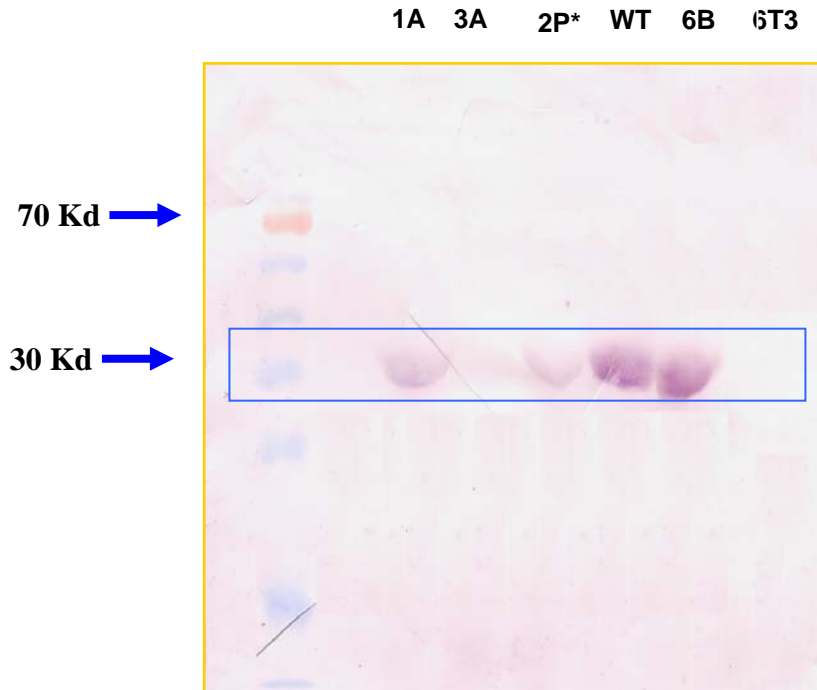
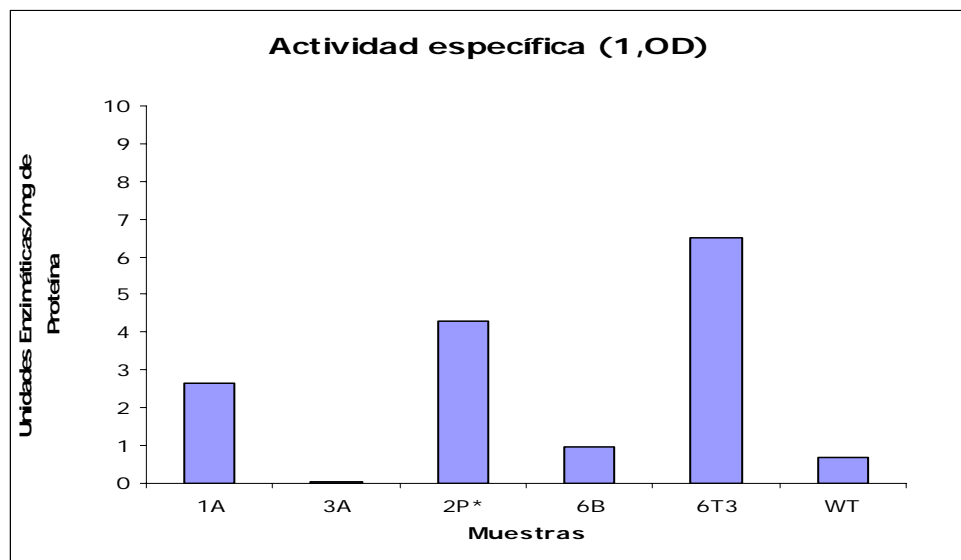


Figura 19.- *Western* (Anti-His-fosfatasa alcalina) para determinar los niveles de expresión de algunas variantes enzimáticas.

Actividad específica de extracto celular.

Los resultados de actividad específica indican que tres variantes resultan de interés (6T3, 2P*,1A) Gráfica 13, obteniendo valores de actividad específica superiores a los mostrados por la WT. Lo que indica desde una perspectiva inicial, que estas variantes logran abatir un efecto de toxicidad, o permiten mejorar los parámetros catalíticos a comparación de la WT, y por tanto permite mejorar la actividad enzimática que se ve reflejada en la productividad de ácido láctico.

Gráfica 13.- Actividad específica de 5 mutantes, tres de ellas con mejor actividad específica que la WT, bajo inducción con IPTG en condiciones de anaerobiosis.



Comparación de los parámetros cinéticos microbianos de las variantes 6T3 y 2P*

La Tabla 7 resume los parámetros cinéticos de dos variantes de interés la 6T3 y la 2P* en comparación a la WT, la 6T3 con una μ de 0.11 h^{-1} como hemos observado desarrolla una velocidad crecimiento superior a la WT con tan sólo 0.04 h^{-1} , la mayor velocidad específica de formación de lactato se observa en la variante 2P* con $5.52 \text{ g lactato/g}_{\text{cel}} \text{ h}$ a comparación de los $2.21 \text{ g lactato/g}_{\text{cel}} \text{ h}$ de la WT, de igual forma se observa una concentración máxima de lactato en la variante 2P* con 10.5 g/l , sin embargo la actividad específica de la 2P* es de $4.3 \text{ UI/mg}_{\text{prot cel}}$ en comparación a los $6.5 \text{ UI/mg}_{\text{prot cel}}$ de la variante 6T3, así mismo los niveles de expresión de la variante 6T3 y WT son similares, sin embargo los niveles de expresión de la variante 2P* se mantienen varios niveles de magnitud por abajo en comparación a estas dos variantes, esto podría disminuir la demanda energética en la formación de proteína de la 2P* que es necesaria para alcanzar los niveles de expresión en la variante 6T3, proporcionando una ventaja sobre la 6T3 y la WT en la canalización de la fuente de carbono a la producción de lactato, sin embargo la velocidad de crecimiento de la variante 6T3 es superior a la 2P*, esto podría ser

debido a que la actividad específica de la enzima también es superior en 2.2 unidades, lo que proporciona una mejor regeneración NAD⁺ y el equilibrio redox mantiene un crecimiento proporcional a la velocidad de regeneración NAD⁺.

Tabla 7- Parámetros cinéticos de *E. coli* VAL 23 de algunas variantes LDH seleccionadas mediante evolución dirigida.

Enzima	μ (h ⁻¹) ^{1*}	Q _p (g lactato/g _{cel} h) ^{**}	Concentración máxima de lactato (g/l)	LDH actividad UI/mg prot cel ^{***}
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

Ambiente microaerobio, pH controlado, cultivado en M9 suplementado con 40 g glucosa/l y 0.1 mM IPTG

*Velocidad específica de crecimiento celular

**Velocidad específica de formación de lactato

***Actividad específica medida de extracto crudo celular en la fase exponencial, ajustado a 1 OD antes de lisar las células.

Análisis estructural de las variantes L-LDH de *B. subtilis*.

Los sustituciones de aminoácidos de todas las variantes fueron alineadas con la secuencia de L-LDH de *B. stearothermophilus* (24), y mapeadas en la estructura cuaternaria(1ldn [1.1.1.27]) (28), encontrando que la mayoría de las mutaciones se encuentran en la superficie de la proteína expuestas al solvente, lo cual indica que se eliminan efectos indeseables de agregación, por lo tanto los niveles de proteína activa se incrementan, así como la productividad de ácido láctico; algunas modificaciones de las variantes 6T3 (N3D, A22T, D141E, A145V, K230R, Y235F) y 2P* (K87N, L120I, D270E, L311F) se muestran en las Figuras 20 y 21.

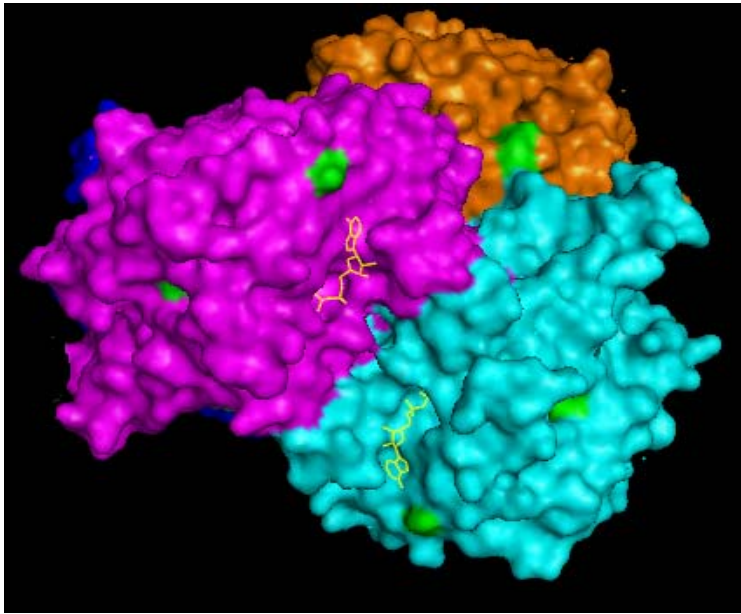


Figura 20.- Mapeo de las sustituciones de aminoácidos de la variante 6T3 en la estructura cuaternaria de la L-LDH de *B. stearothermophilus* (1ldn).

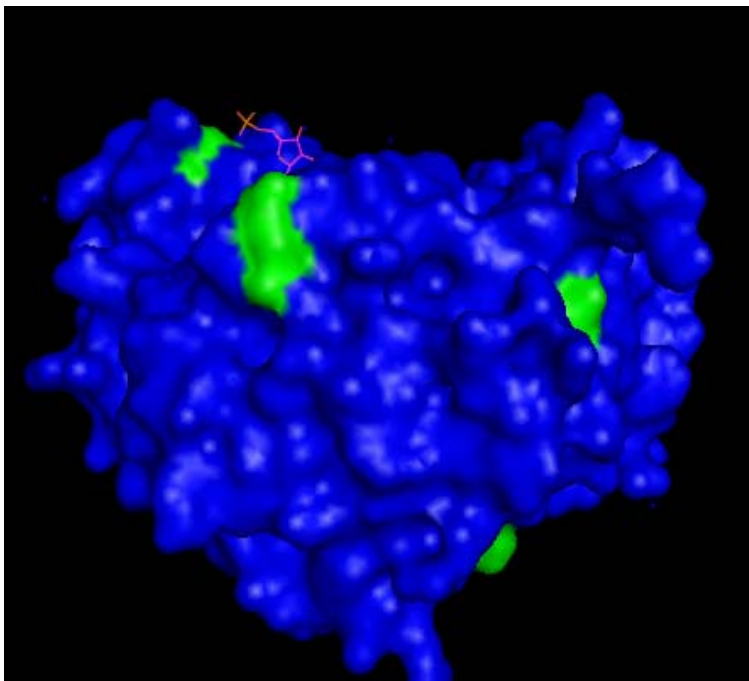


Figura 21.- Mapeo de las sustituciones de aminoácidos de la variante 6T3 en la estructura monomérica de la L-LDH de *B. stearothermophilus*.

Aumento de actividad específica.

Los datos proporcionados de la cinética de crecimiento arrojan información interesante, ya que nos acerca a dilucidar con mayor claridad el método de selección en la regeneración de NAD⁺, lo cual resulta atractivo, ya que construyendo un plásmido con un “Shine-Dalgarno” (25) de baja afinidad a ribosoma, se bajaría la cantidad de proteína traducida en el medio intracelular, por tanto una baja concentración de proteína tendría que regenerar suficiente NAD⁺ para permitir que la cepa sea viable, generando por lo tanto presión selectiva para que después de un ciclo mutagénico se generen mutaciones que incidan directamente en los parámetros catalíticos, cambiando afinidad o catálisis de la LDH. Nosotros iniciamos el diseño de la construcción de un plásmido pTrcSDwT colocando un sitio de restricción justo después del codón de inicio. Para insertar la sección “Shine-Dalgarno” adecuada, colocamos un sitio de restricción EcoRI (Figura 22), lo que desencadena un cambio de aminoácido (K4S) (Figura 23); por lo tanto hicimos algunas pruebas para determinar si la función de la proteína no estaba afectada, en primera instancia decidimos ver si complementaba en condiciones de anaerobiosis. En la Figura 24, se observa la presencia de unidades formadoras de colonias, sin embargo aun no es un dato que garantice la función completa de la proteína, ya que pudo haber complementado con un 50 o 60% de actividad.

Por lo tanto decidimos determinar la actividad específica de Eco's (Variantes del gen *lctE* con un sitio de restricción cerca del codón de inicio) en primer lugar estandarizamos la cantidad de proteína presente por unidad de volumen mediante la Figura 25, conociendo la razón volumen/concentración determinamos actividad específica de EcoII y EcoIII como se observa en la Gráfica 14, finalmente observamos que la mutación (K4S) no afecta la funcionalidad de la proteína LDH, este sitio de restricción será utilizado en posteriores experimentos para completar el diseño de un “Shine-Dalgarno” débil con la intención de encontrar nuevas variantes que resulten de interés para la industria del láctico.

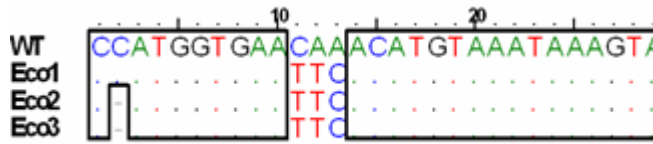


Figura 22.- Sitio de restricción *EcoRI* de tres secuencias

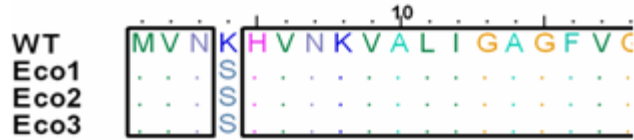


Figura 23.- Cambio de aminoácido (K-S)

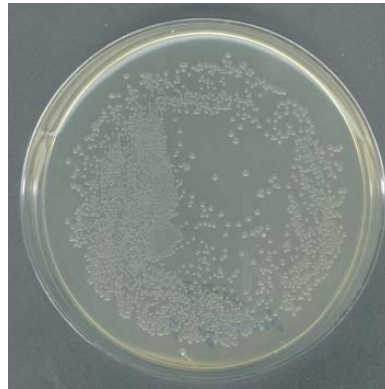


Figura 24.- Complementación en anaerobiosis

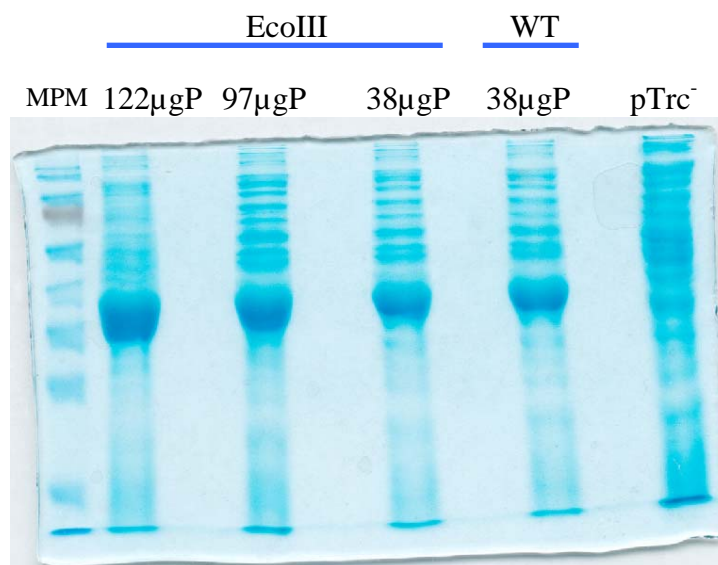
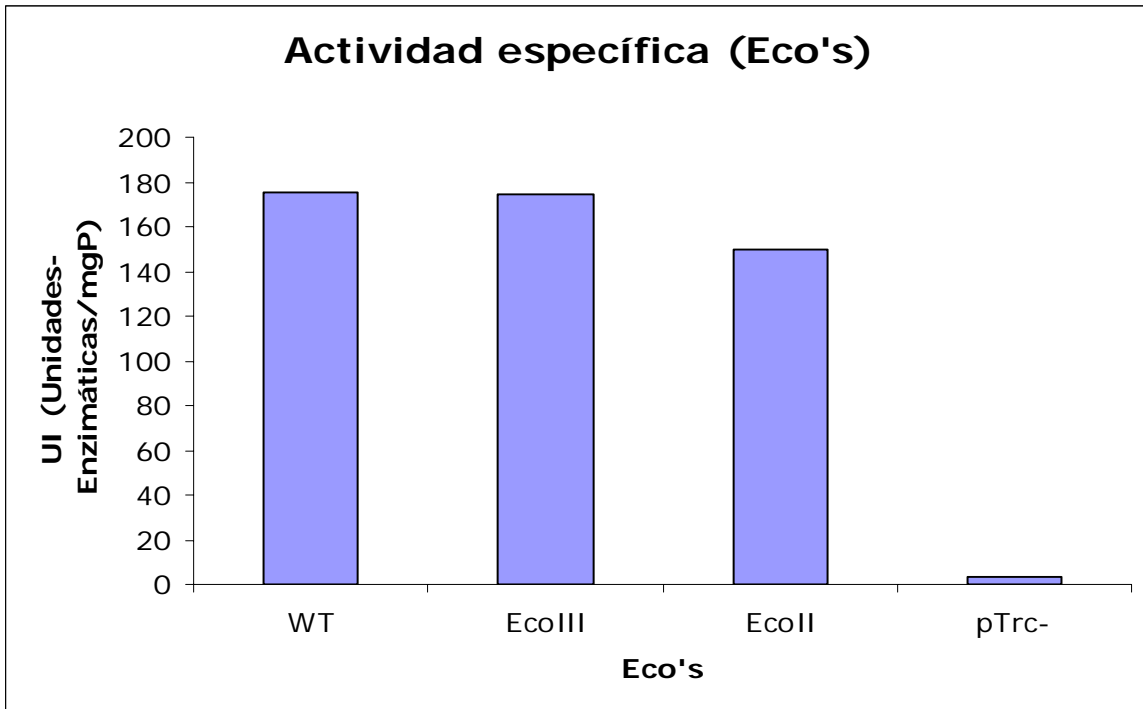


Figura 25.- Gel SDS-Page para estandarizar las concentraciones de proteína y cantidad y volumen.

Gráfica 14.- Actividad de EcoII y EcoIII en comparación con la WT para determinar si la mutación (K-S) afecta la funcionalidad de la proteína.



CONCLUSIONES.

De las 12 variantes analizadas, dos resultaron de particular interés, la 2P* y la 6T3. Por un lado la 2P* aumentaba la velocidad específica de formación de ácido láctico y por el otro la 6T3 mejoraba su actividad específica, lo que se veía reflejado en el aumento de la velocidad específica de crecimiento en comparación a la WT bajo inducción con IPTG.

Algunas variantes como la 1A y la 6B tienen un aumento en la velocidad específica de formación de ácido láctico en comparación con la WT sin inducción con IPTG. Sin embargo el aumento no es significativo, por lo que se sugiere realizar un ciclo más de mutagénesis bajo la misma estrategia de selección.

Existe un efecto de toxicidad cuando se sobre expresa la LDH de *Bacillus subtilis* el cual logra ser abatido mediante evolución dirigida, como en el caso de la variante 2P* que disminuye sus niveles de expresión pero a la vez mantiene una actividad específica ligeramente por arriba de la WT, o como en el caso de la variante 6T3 que mantiene un nivel de expresión similar a la WT, pero la mayoría de las mutaciones se encuentran expuestas al solvente, y posiblemente logra disminuir la formación de agregados con lo cual la actividad específica se ve ampliamente mejorada a comparación de la WT.

En resumen nuestros resultados sugieren que el método de selección de regeneración de NAD⁺ aplicado a disminuir un efecto de toxicidad presente en una proteína tal como la LDH, podría ser útil para seleccionar variantes de enzimas fermentativas con mejoras en sus propiedades catalíticas, así mismo el método de selección podría ser útil para remover propiedades no requeridas en proteínas que podrían tener un impacto importante en la producción de metabolitos tales como el L-lactato.

PERSPECTIVAS.

- Determinar parámetros catalíticos de las variantes 2P* y 6T3.
- Evolucionar las variantes 2P* y 6T3 mediante “ADN *shuffling*” o mediante otro ciclo de evolución.
- Seguir la misma estrategia de selección para aumentar la producción de L-láctico con fines industriales hasta la medida de lo posible.
- Hacer un estudio de dinámica molecular de la proteína para comprender de una manera más racional el comportamiento en cuanto a las modificaciones de los aminoácidos que se encuentran expuestos al solvente.
- Obtener una explicación racional de las variantes 6T3 y 2P* haciendo variaciones de las mutaciones presentes en ambas mutantes.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- **Hideto Tsuji.** 2005 Review. Poly(lactide) Stereocomplexes: Formation, Structure, Properties, Degradation, and Applications, *Molecular Bioscience*, **5**:569-597.
- 2.- **Chotani, G., T. Dodge, A. Hsu, M. Kumar, R. LaDuca, D. Trimbur, W. Weyler, and K. Sanford.** 2000. The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**:434-455.
- 3.- **Ohara, H., H. Okuyama, S. Sawa, Y. Fujii, and K. Hiyama.** 2001. Development of industrial production of high molecular weight poly-L-lactate from renewable resources. *Nippon Kagaku Kaishi* **6**:323-331.
- 4.- **Tsuji, F.** 2002. Autocatalytic hydrolysis of amorphous-made polylactides: effects of L-lactide content, tacticity, and enantiomeric polymer blending. *Polymer* **43**:1789-1796.
- 5.- **Hofvendahl, K., and B. Hahn-Hagerdal.** 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* **26**:87-107.
- 6.- **Shengde Zhou, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram.** 2003. Functional Replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhA*) with the L-(+)-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 2237-2244.
- 7.- **Chang, D. E., S. Shin, J. Rhee, and J. Pan.** 1999. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1384-1389.
- 8.- **Zhou, S., T. B. Causey, A. Hasona, K. T., Shanmugam, and L. O. Ingram.** 2002. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:399-407.
- 9.- **Clark, D. P.** 1989. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**:223-234.
- 10.- **Garmyn, D., T. Ferain, N. Bernard, P. Hols, and J. Delcour.** 1994. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *Pediococcus acidilactici* L-(+)-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:266-272.
- 11.- **Segovia L, Horwitz J, Gasser R, Wistow G.** (1997). Two roles for mu-crystallin: a lens structural protein in diurnal marsupials and a possible enzyme in mammalian retinas. *Mol Vis.* Sep **9**:3:9.
- 12.- **Guo HH, Choe J, Loeb LA.** (2005). Protein tolerance to random amino acid change. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9205-9210.
- 13.- **Bloom JD, Silberg JJ, Wilke CO, Drummond DA, Adami C, Arnold FH.** (2005) Thermodynamic prediction of protein neutrality. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**:606-611.

- 14.- Bloom JD, Meyer MM, Meinhold P, Otey CR, MacMillan D, Arnold FH. (2005) Evolving strategies for enzyme engineering. *Curr Opin Struct Biol.* **15**(4):447-52.
- 15.- Cristescu ME, Innes DJ, Stillman JH, Crease TJ. (2008). D- and L-lactate dehydrogenases during invertebrate evolution. *BMC Evol Biol.* Oct **1**:8:268.
- 16.- Mat-Jan, F., K. Y. Alam, and D. P. Clark. 1989. Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **171**:342-348.
- 17.- Bernard, N., T. Ferain, D. Garmyn, P. Hols, and J. Delcour. 1991. Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **290**:61-64.
- 18.- Delcour, J., N. Bernard, D. Garmyn, T. Ferain, and P. Hols. 1993. Molecular genetics of lactate dehydrogenases from lactic acid bacteria. *LAIT* **73**:127-131.
- 19.- 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.
- 20.- Altaras NE, Cameron DC (2000) Enhanced production of (R)-1,2-propanediol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **16**: 940-946.
- 21.- Vázquez-Limón C, Vega-Badillo J, Martínez A, Espinosa-Molina G, Gosset G, Soberón X, López-Munguía A, Osuna J. (2007). Growth rate of a non-fermentative *Escherichia coli* strain is influenced by NAD⁺ regeneration. *Biotechnol Lett.* Dec; **29**(12):1857-63.
- 22.- Flores H, Ellington AD. (2005) A modified consensus approach to mutagenesis inverts the cofactor specificity of *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase. *Protein Eng Des Sel*, **18**(8):369-77.
- 23.- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 24.- Schär HP, Zuber H, Rossmann MG.(1982). Crystallization of lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Mol Biol.* Jan **15**; **154**(2):349-53.
- 25.- Shine J, Dalgarno L (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci.* **71**(4):1342-6.
- 26.- Steitz JA, Jakes K. (1975) How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**(12):4734-8.
- 27.- Robert Luis Vellanoweth and Jesse C. Rabinowitz. (1992). The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. *Molecular Microbiology* **6** (9) 1105-114.
- 28.- Wigley, D.B., Gamblin, S.J., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Piontek, K., Muirhead, H., Holbrook, J.J. (1992). Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.5 Å resolution. *J.Mol.Biol.* Jan **5**; **223**(1):317-35.

APENDICE

LB

10 g triptona.
5 g extracto de levadura.
5 g NaCl.
1 ml NaOH 1 N.
Antibióticos.
H₂O cuanto baste para 1 litro.
Para LB sólido, añadir 15 g de agar.

M9

6g NaHPO₄
3g KH₂PO₄
1 g NH₄Cl
1 ml MgSO₄·7H₂O
10 ml glucosa 20%
0.1 ml vitamina B1 (tiamina) 0.5%
5 ml casaminoácidos 20%
Antibióticos.
Para M9 sólido, añadir 15 g de agar.

Técnicas de Biología Molecular.

PCR (reacción)

Buffer de amplificación 10X (Gibco)
500 mM KCl
100 mM Tris pH 8.3
15 mM MgCl₂
0.1 % gelatina

Mezcla de 4 dNTPs Biolabs (c/u a 2.5 mM)	5 µl
Oligonucleótido 1	10 pmoles
Oligonucleótido 2	10 pmoles
ADN templado	5 µg
<i>Taq</i> polimerasa (invitrogen).	2.5 unidades
H ₂ O	Para volumen final 50 µl

PCR Mutagénica (reacción)

Buffer de amplificación 10X (Gibco)	5µl
500 mM KCl	
100 mM Tris pH 8.3	
70 Mm MgCl ₂	

0.1 % gelatina

Mezcla 10X de 4 dNTPs Biolabs	5 μ l
2 mM dGTP	
2 mM dATP	
10 mM dCTP	
10 mM dTTP	
Oligonucleótido 1	10 pmoles
Oligonucleótido 2	10 pmoles
ADN templado	5 μ l
MnCl ₂ 5mM	5 μ l
<i>Taq</i> polimerasa (invitrogen).	2.5 unidades
H ₂ O	Para volumen final 50 μ l
Uso Dimetil sulfóxido (DMSO) dependiendo de la reacción.	

PCR mutagénica.

Condiciones de amplificación del gen *lctE*.

Segmento	Número de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	95 °C	2 minutos
2	30	95 °C	1 minuto
		55 °C	1 minuto
		72 °C	1 minuto
3	1	72°C	10 minutos

Ligación en Vectores (reacción).

Buffer para ADN ligasa T4 10X (Roche)	2 μ l
660 mM Tris-Hcl	
50 mM MgCl ₂	
50 mM DTT	
10 mM ATP	
pH 7.5	
AND Ligasa T4 (Roche)	1 μ l
Vector digerido	20 fentomoles
Inserto digerido	60 fentomoles
H ₂ O	Para volumen final 20 μ l
Temperatura de incubación, 16°C toda la noche.	

Digestión con Enzimas de reacción (reacción).

Buffers 10X (Amersham's) dependiendo enzima	1 µl
ADN (vector/producto de PCR)	5 µl
Enzima 1 (Amersham)	3 µl
Enzima 2 (Amersham)	3 µl
H ₂ O	para volumen final 10 µl

* Temperatura de reacción dependiendo de la enzima.

** Uso de BSA (Amersham) dependiendo la enzima.

Purificación de producto de PCR (Roche).

1. Identificar y cortar la banda de ADN del gel de agarosa para introducirla a un tubo de 1.5 ml de microcentrifuga.
2. Adicionar 30 µl de buffer de unión por cada 100 mg de agarosa.
3. Disolver la agarosa agitando el tubo e incubar a 56° C por min.
4. Adicionar 150 µl de isopropanol por cada 100 mg de agarosa disuelta y agitar fuertemente.
5. Pasar por la columna el contenido del tubo y centrifugar a 14 000 rpm 1 min.
6. Eliminar el líquido y adicionar 200 µl de buffere de lavado para centrifugar a 14 000 rpm 1 min.
7. Eliminar el líquido y adicionar 200 µl de buffer de lavado para centrifugar a 14 000 rpm 1 min.
8. Eliminar el líquido y adicionar 60 µl de buffer de elusión a la columna para centrifugar a 14 000 rpm 1 min.
9. Almacenar la solución eluida que contiene el ADN purificado

Purificación de plásmido (Roche).

1. Centrifugar el cultivo de toda la noche a 9 000 rpm 30 seg y resuspender el pellet en 250 µl de buffer de suspensión +RNasa.
2. Mezclar suavemente con 250 ml de buffer de lisis e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
3. Mezclar suavemente con 350 ml de buffer de unión e incubar en hielo por 5 min.
4. Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min.
5. Pasar por columna el sobrenadante y centrifugar a 14 000 rpm 1 min.
6. Eliminar el líquido y adicionar a la columna 700 µl de buffer de lavado par centrifugar a 14 000 rpm 1min.
7. Eliminar los restos del líquido por centrifugación a 14 000 rpm 1min.
8. Adicionar 60 µl de buffer de elusión a la columna y centrifugar a 14 000 rpm 1 min.
9. Almacenar la solución eluida que contiene al ADN purificado.

Buffers.

Buffer Z

16.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5.5 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.75 G KCl

0.246g g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2.7 ml β -mercaptoetanol

H_2O para volumen final de 1 000 ml

Ajustar pH a 7.0

Análisis por “western-blot” (“semi dry transfer”)

1. Preparar el gel de acrilamida al 13% (SDS-Page).
2. Correr a 150 volts por aproximadamente 2 h. Tener cuidado de que no baje el “buffer” nunca de nivel.
3. Antes de que las muestras salgan del gel preparar la cámara de transferencia
4. Retirar el gel, siempre humectando con agua y depositarlo en una bandeja con agua.
5. Cortar de 6 papeles filtro y una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel. Remojar los papeles y la membrana en “buffer” de transferencia por 5 minutos.
6. Colocar 3 papeles filtro en el ánodo de la cámara, luego poner el gel con SDS y posteriormente la membrana de nitrocelulosa y encima los tres papeles filtro restantes. Cerrar la cámara y colocar un peso fuerte para asegurar contacto. Correr una hora y media a 80mA.
7. Después de la transferencia tomar la membrana y ponerla en un recipiente.
8. Bloquear la membrana con 20 ml de TBST + 1mg de leche (leche Svelties Nestlé). Dejar por 12 h a 4°C
9. Lavar 3 veces con TBST por 10 minutos cada vez.
10. Incubar con el primer anticuerpo anti-CAT por una 1 h. Este anticuerpo está en relación 1:3000 en “buffer” TBST con 0.1% de leche. Incubar por 1 h en agitación constante.

11. Lavar 3 veces con TBST por 10 minutos cada vez.
12. Incubar con el segundo anticuerpo (anti-Dig) acoplado a fosfatasa alcalina. Este anticuerpo esta en relación 1:5000 en "buffer" TBST con 0.1% de leche. Incubar por una 1 h en agitación constante.
13. Lavar dos veces con TBST.
14. Reveler con aproximadamente un mililitro de BCIP/NBT- blue (SIGMA).
15. Parar la reacción de revelado con EDTA/agua 0.005 molar
16. Enjuagar con agua grado milliQ
17. Secar en medio de papel absorbente y digitalizarlo para su análisis.

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 (*pdh*, *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 (*pdc*) and alcohol dehydrogenase (*adhB*) 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*⁻, *pfkB*⁻ 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*⁻, *pfkB*⁻), 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. *pdc* (pyruvate decarboxylase) and *adhB* (alcohol dehydrogenase) from *Zymomonas mobilis*. Plasmid pTrc99A (Pharmacia Biotech) was used for cloning *pdc*, *adhB* 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 *pdc*, and *pdc-adhB* 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 *pdc* was eliminated using the quick-change site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The oligonucleotides used for *pdc* amplification were BpdcNco: 5'-GGAGTAAGCCATGGGTTACTGTCGGTACC, and EpdcBm: 5'-CGCGCGGATCCC TATTAGTGGTGGTGGTGGTGGAGGAGCTTGTTAAC; for *adhB*, BadhBm: 5'-GCCGCGGATCCCTAGTATGTAGGGTGAGGTTATAG and

EadhHd: 5'-CCCAAGCTTCTATTAGTGGTGGTG
GTGGTGGTGGAAAGCGCTCAGGAA.

pTrcIctE 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
GTGGTGGTGGTTGACTTTTTGTTCTGC.

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
TTATTACACCAATGACCACAAGCTCA (mutation is boldfaced) and (2) 36LDH2 5'-GAGC
TTGTGGTCATTGGTGTAAATAAAGAAAAAG
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
CGCGCTACTGCCGCCAGG. This library was inserted into pTrc99A as described for pTrcIctE.

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

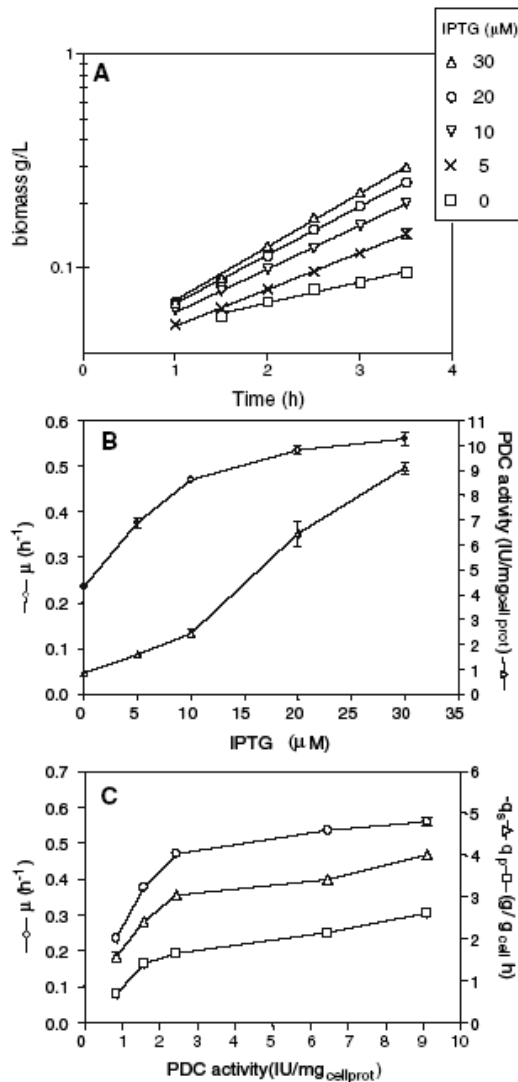


Fig. 1 *E. coli* VAL23/pTrecPET grown on LB, 2 g glucose/l at different IPTG concentrations. *Note:* Standard error was calculated from three independent experiments, however, symbols are greater than error bars in most of the reported values. (A) Exponential phase of anaerobic growth kinetics. (B) Specific 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 ($-q_g$) 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-pTrecpd 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* (pTrecpd). 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 the k_{cat} , resulting in a two orders of magnitude decreased k_{cat}/K_m . We constructed the

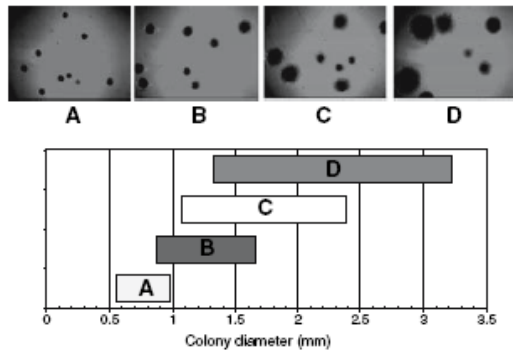


Fig. 2 Colony size distribution of *E. coli* VAL23 pTrcPET on anaerobic solid media LB, 20 g glucose/l, at different concentrations of IPTG, 48 h on anaerobic jar. IPTG concentration (μM): A, 0; B, 10; C, 20 and D, 30. Lower part: colony diameters (Note: Colony diameter was measured from images obtained 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.

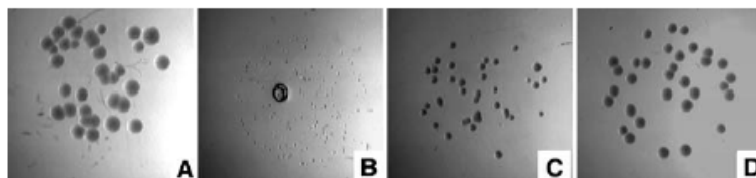


Fig. 3 *E. coli* VAL23 containing LDH G38 variants individually cultured on anaerobic solid LB media supplemented with 4 g $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{l}$ and 2 g glucose/l. (A) LDH wild type, (B) LDH G38, (C) LDH G38A, (D) LDH G38C

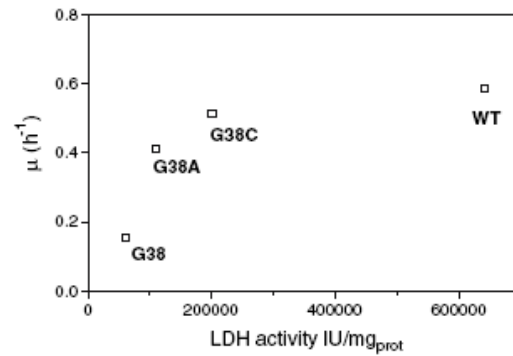


Fig. 4 Relationship of activity and growth rate of the *E. coli* VAL23 containing LDH G38 variants. LDH specific activity from the purified enzymes versus anaerobic maximum growth rate

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 pTrcIctE was grown

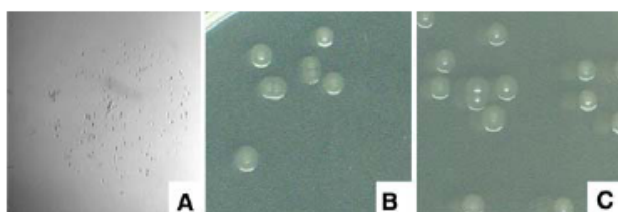


Fig. 5 Anaerobic selection of the *E. coli* VAL23 containing LDH variants obtained by directed evolution, cultured on solid LB, 4 g Na₂CO₃/l, 20 g glucose/l and 0.1 mM IPTG. (A) WT (2X stereoscope amplification), (B) 6T3, (C) 2P

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. stearrowophilus* (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
- Boemke 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 (*pdh*, *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, Rossman 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