

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA**

**DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA**

**Producción de aldolasas
recombinantes: de la biología
molecular al desarrollo
de procesos**

**Memoria para optar al grado de doctor por
la Universitat Autònoma de Barcelona**

**Luis Vidal Conde
Marzo, 2006**

Título: Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos

Realizado por: Luis Vidal Conde

Dirigido por: Gloria Caminal S.
Pau Ferrer A.

Programa de Doctorado en Biotecnología
Departament d'Enginyeria Química
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria
Universitat Autònoma de Barcelona

PAU FERRER ALEGRE, como contratado por el programa "Ramon y Cajal" en el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona y GLORIA CAMINAL SAPERAS Científico Titular del CSIC en la Unidad de Biocatálisis Aplicada asociada al IIQAB en el Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICAMOS:

Que Luis Vidal Conde, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo que con el título: "**Producción de aldolasas recombinantes: de la biología molecular al desarrollo de procesos**", presenta en esta memoria, i que constituye su Tesis para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos a L'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona la mencionada Tesis, firmando el presente certificado a

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 3 de febrero de 2006

Pau Ferrer Alegre

Gloria Caminal Saperas

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar, deseo agradecer a dos personas claves que sin su ayuda, no habría entrado dentro del mundo de la Biotecnología y mucho menos, hacer un doctorado. Por un lado, a Nereida Coello, quien me abrió las puertas de su laboratorio en el IBB, permitiendo tocar por primera vez “eso” tan curioso y llamativo llamado Biotecnología. Y en segundo lugar, y no por debajo, a Josep Lopez Santín por haberme brindado la posibilidad entrar en su grupo de investigación. A pesar de que al principio pensaba que las aldolasas eran algún tipo de comida exótica, logré interesarme tanto en el tema que mi concepción sobre ellas cambió radicalmente. Ahora se que no se deben comer! Gracias a ambos, ya que sin su apoyo inicial, no hubiera dado el salto desde Caracas hasta Barcelona.

No menos importantes han sido mis tutores: Gloria Caminal y Dolors Benaiges con mi Tesina, y Pau Ferrer y nuevamente Gloria con mi Tesis. Gracias por vuestro apoyo, interés y asesoramiento durante todo este tiempo y, para los que lean estas líneas, debo recalcar que son personas con una profunda calidad humana, cosas que actualmente no son frecuentes de encontrar y cuyo valor es intangible.... Así que no tengáis miedo si les tocan como tutores! Los recomiendo a todos con los ojos cerrados!

Al grupo de aldolasas en general: Olga y Trinitat, a quienes conocí cuando llegué y me enseñaron donde estaba todo y como funcionaban las cosas. Ello se agradece mucho, sobre todo cuando eres nuevo y te sientes perdido. Gracias, Jaume, por sacarme de apuros con los modelos matemáticos y poner orden en el fermentador. Estoy seguro que ahora funciona mil veces mejor que cuando lo dejé! Al resto del grupo de aldolasas: Carles, Gloria G., Goyo, Inés, Arnau, Miguel y Sergio: gracias yuffff espero no haber obviado a nadie, pero ya se sabe que casa grande es difícil de cuidar!

Lorena: no me olvido de ti! Muchísimas gracias por la ayuda en muchos de los análisis, purificaciones y por la simpatía que me has dado!

Y claro, no voy a dejar de lado a muchas otras personas que me han apoyado y brindado su amistad desde mi llegada al departamento:

Cristel: gracias por enseñarme que se pasa mejor las frías noches del departamento juntando las sillas de la oficina a manera de cama. Pero, creo que la estrategia de Jordi Cairó era mucho mejor: gracias Jordi, no solo por darme mi primer colchón para descansar durante las largas jornadas nocturnas de fermentación, sino por tu amistad y apoyo durante estos cinco años!

Rossi: Sé que me echarás de menos porque ya no llegaré temprano por las mañanas. Yo también, porque reconforta ver gente alegre y con una sonrisa desde que llegas a trabajar...

Cristina y Sandra M.: no se que hubiese hecho sin vuestra ayuda para dar clases de EQQ. Los problemas me sonaban a chino, y gracias a vosotras, y especialmente a Cristina, ahora me suenan en catalán!

Manuel Plaza: no se que hubiese hecho sin tu ayuda en los análisis de HPLC! Gracias!

El otro Manuel (Alarcón) y Oscar: que buenos momentos hemos pasado en la oficina y como nos hemos reído... gracias por vuestra amistad!

A los compañeros y amigos que comenzamos juntos esta aventura que se llama postgrado: David (léase "Deivid"), Ramooooooooon, Albert,, Martí, Sandra J ... y los que vinieron después... sois muchos, pero la amistad no tiene nombres... gracias a todos y todas!!!

A todo el resto del personal del Departamento de Ingeniería Química: gracias por vuestra amistad y apoyo!

Y hay muchas más personas no menos importantes a las que quiero agradecer!

Empezando por mis padres, que sin su ayuda, apoyo, generosidad y cariño, nunca hubiese podido llegar a donde he llegado...por eso les dedico la tesis. Es lo menos que puedo hacer para que sepan cuanto los aprecio y cuanto reconozco todo el esfuerzo que han hecho para criar este hijo "obstinado". Gracias....

Sandra... sabemos de sobras todo lo que has hecho por tu hermano... sobran las palabras...

Y muchas otras personas más: Raunel: gracias por tenerme paciencia. Luis (Jein) y Hugo: como hecho de menos los almuerzos en la plaza Cívica! Rodrigo: espero que pronto dejes la dieta vegetariana para invitarte a comer una buen pata de cordero! No sabes lo que te pierdes! Juan Marcos: beeeeeee! Jesús: han sido cinco años inolvidables como compañero de piso y amigo.

Gracias a todos lo que directa e indirectamente han hecho posible esta tesis....

1 ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
Capítulo I. Introducción general	3
1. Introducción	4
1.1. Estrategias para la obtención de compuestos con estereoquímica definida	6
1.2. Papel de las enzimas en síntesis asimétrica	8
1.3. Las aldolasas: definición, mecanismo catalítico y función	9
1.4. Clasificación de las aldolasas	11
1.4.1. Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP)	12
1.4.2. Aldolasas dependientes de acetaldehído	16
1.4.3. Aldolasas dependientes de glicina	16
1.4.4. Aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenolpiruvato (PEP)	17
1.5. Generalidades de la producción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	18
1.6. Disponibilidad comercial de las aldolasas	23
1.7. Objetivo general del proyecto de investigación	24
1.8. Marco del proyecto de investigación	25
1.9. Bibliografía	26
Capítulo II. Objetivos	30
2.1. Objetivo general	31
2.2. Objetivos específicos	31
Capítulo III. Materiales y métodos	32
3.1. Material biológico	33
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF'	33
3.1.2. <i>Escherichia coli</i> M15	33
3.1.3. <i>Escherichia coli</i> DH5 α	33
3.1.4. <i>Streptococcus thermophilus</i> YKA-184	34
3.2. Plásmidos utilizados para clonación y expresión	34
3.2.1. Plásmido pTrcHisA	34
3.2.2. Plásmido pQE-40	35
3.2.3. Plásmido pREP-4	36
3.2.4. Plásmido pBR322	37
3.2.5. Plásmido pUC18	37
3.3. Plásmidos utilizados para <i>knockout</i> dirigido de genes en <i>E. coli</i>	38
3.3.1. Plásmido pKD46 (<i>Red helper plasmid</i>) y sistema <i>Red</i> .	38
3.3.2. Plásmido pKD32	38

3.3.3. Plásmido pCP20 (<i>FLP helper plasmid</i>)	39
3.4. Conservación y manipulación de las cepas	39
3.5. Cultivos a partir de glicerizados	39
3.5.1. Preparación de glicerizados	40
3.6. Técnicas de biología molecular	40
3.6.1. Extracción de DNA plasmídico	40
3.6.1.1. Técnica de Miniprep (QIA prep [®] Miniprep Kit, QIAGEN)	40
3.6.2. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	41
3.6.3. Extracción de las bandas de DNA de los geles de agarosa	43
3.6.4. Modificaciones enzimáticas del DNA	43
3.6.5. Transformación por electroporación	44
3.6.6. Verificación de genes clonados en pQE-40	46
3.6.7. Verificación de la capacidad de expresión del plásmido recombinante	46
3.6.8. Amplificación de plásmidos	46
3.6.9. Amplificación del DNA mediante la técnica del PCR	47
3.6.10. Amplificación de genes por PCR	48
3.6.11. Secuenciación del DNA	48
3.7. <i>Knockout</i> dirigido mediante productos de pcr	49
3.7.1. Amplificación del fragmento P1P4 por PCR	49
3.7.2. Transformación de células M15 con el fragmento P1P4 e inserción en el cromosoma bacteriano	51
3.7.3. Delección del <i>cassette</i> cromosómico FRT	51
3.8. Medios de cultivo y suplementos	52
3.8.1. Medio complejo de Luria-Bertoni (LB)	52
3.8.2. Medio Definido (MD)	53
3.8.3. Suplementos	54
3.8.4. Preparación de MD para ensayos en Erlenmeyer	54
3.8.5. Preparación del MD para ensayos en Fermentador. Etapa discontinua de crecimiento	55
3.8.6. Preparación del MD (alimento) para ensayos en Fermentador. Etapa semicontinua de crecimiento	56
3.9. Sistemas de cultivo de <i>E. coli</i>	56
3.9.1. Crecimiento en Erlenmeyers	56
3.9.2. Crecimiento en Fermentador	57
3.9.2.1. Accesorios para la implementación y control de la estrategia semicontinua	58
3.9.2.2. Condiciones de operación	59

3.9.2.3.	Preparación del reactor	59
3.9.2.4.	Preparación del inóculo	59
3.9.2.5.	Procedimiento para inocular	61
3.9.2.6.	Procedimiento para toma de muestras	61
3.9.2.7.	Esterilización química de la microbureta	62
3.9.2.8.	Etapas de cultivo semicontinuo (<i>fed-batch</i>)	62
3.9.2.9.	Finalización de la fermentación	62
3.10.	Implementación de la estrategia de alimentación exponencial para el crecimiento de <i>E. coli</i>	63
3.10.1.	Programa de control de la fermentación y de la microbureta	68
3.11.	Métodos analíticos para el seguimiento de los cultivos	69
3.11.1.	Determinación de la biomasa	69
3.11.2.	Determinación de sustratos y metabolitos	70
3.11.2.1.	Análisis de glucosa y ácidos orgánicos	70
3.11.2.2.	Análisis de amonio	71
3.11.2.3.	Análisis de fosfatos	71
3.11.2.4.	Determinación de zinc	71
3.12.	Microscopía electrónica	71
3.13.	Cálculos	72
3.13.1.	Cálculo de la velocidad de crecimiento (μ)	72
3.13.2.	Calculo de la velocidad de producción de RhuA (q_p)	74
3.13.3.	Rendimientos	74
3.13.4.	Producción	75
3.13.5.	Productividad	75
3.14.	Métodos de análisis de proteínas	76
3.14.1.	Electroforesis en gel disociante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	76
3.14.1.1.	Preparación de las muestras	76
3.14.1.2.	Ruptura de células	77
3.14.1.3.	Materiales y reactivos para electroforesis	77
3.14.2.	Determinación de proteína total por el método de Bradford	79
3.15.	Ensayos enzimáticos para la determinación de las actividades aldolásicas	80
3.15.1.	Determinación de la actividad de ramnulosa 1-fosfato aldolasa (RhuA)	80
3.15.2.	Determinación de la actividad de fuculosa 1-fosfato aldolasa (FucA)	82
3.15.3.	Determinación de la actividad fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (FruA)	82
3.15.4.	Determinación de la actividad treonina aldolasa	84

3.15.5. Determinación de la actividad 2-desoxiribosa 5-fosfato aldolasa (DERA)	85
3.16. Purificación de aldolasas recombinantes	86
3.16.1. Procesamiento de la muestra para cromatografía: obtención de extractos crudos	86
3.16.2. Columnas	87
3.16.3. Equipo	87
3.16.4. Reactivos	87
3.16.5. Procedimiento	88
3.16.6. Procesamiento post-purificación por columna de afinidad	89
3.16.6.1. Cromatografía de gel filtración (exclusión molecular)	89
3.16.6.2. Precipitación por sales	89
3.16.6.3. Diálisis - Liofilización	90
3.17. Síntesis de ramnulosa 1-fosfato	90
3.17.1. Síntesis de L-lactaldehído	90
3.17.2. Síntesis de dihidroxiacetona fosfato (DHAP)	91
3.17.3. Síntesis de la sal de ciclohexilamina de L-ramnulosa 1-fosfato	92
3.18. Métodos analíticos para el seguimiento y valoración de la síntesis de sustratos	93
3.18.1. Determinación de la concentración de L-lactaldehído	93
3.18.2. Determinación de la concentración de DHAP	94
3.18.3. Seguimiento y control de la pureza en la síntesis de ramulosa 1-fosfato	95
3.18.3.1. Cromatografía en capa fina	95
3.18.3.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	96
3.18.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)	97
3.19. Bibliografía	97
Capítulo IV. Resultados y Discusión	99
4.1. Introducción. Clonación y expresión de aldolasas recombinantes en <i>E. coli</i>	100
4.2. Clonación del gen de la ramnulosa 1-fosfato aldolasa (<i>rhaD</i>) de <i>E. coli</i> K-12 en el vector pQE-40 (QUIAGEN)	106
4.3. Clonación del gen de la fuculosa 1-fosfato aldolasa (<i>fucA</i>) de <i>E. coli</i> K-12	109
4.4. Clonación del gen de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (<i>fda</i>) de <i>E. coli</i> K-12	112
4.5. Clonación del gen de la tagatosa 1,6-bifosfato aldolasa (<i>lacD</i>) de clase I de <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> MG1820	114

4.6. Clonación del gen de la 2-desoxiribosa 5-fosfate aldolasa (deoC) de <i>E. coli</i> K-12	118
4.6.1. Clonación del fragmento deoc2 en pBR322	121
4.7. Clonación de treoninas aldolasas	125
4.7.1. Clonación del gen <i>ItaE</i> de <i>E. coli</i> K-12	127
4.7.2. Clonación del gen <i>glyA</i> de <i>S. thermophilus</i> YKA-184	129
4.8. Conclusiones	133
4.9. Bibliografía	133
5. Purificación de aldolasas recombinantes producidas en <i>E. coli</i>	136
5.1. Primera Etapa: Cromatografía de Afinidad de Metales Inmovilizados (IMAC)	138
5.2. Purificación de aldolasas dependientes de DHAP (RhuA, FucA, FruA)	142
5.2.1. Purificación de RhuA	142
5.2.2. Purificación de FucA	144
5.2.3. Purificación de FruA	145
5.3. Purificación de aldolasas dependientes de glicina (SHMT, LTA)	145
5.3.1. Purificación de SHMT	145
5.3.2. Purificación de LTA	147
5.4. Purificación de aldolasas dependientes de acetaldehído (DERA)	149
5.4.1. Purificación de DERA	149
5.5. Conclusiones	150
5.6. Bibliografía	151
6. Caracterización bioquímica parcial de aldolasas recombinantes	151
6.1. Aldolasas dependientes de DHAP: RhuA, FucA, FruA	151
6.1.1. Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de RhuA	151
6.1.2. Ensayo enzimático para cuantificación de la actividad fructosa 1,6 bifosfato aldolasa	158
6.1.3. Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de FucA	159
6.2. Aldolasas dependientes de glicina: SHMT, LTA	159
6.2.1. Ensayo enzimático para cuantificación de la actividad treonina aldolasa	159
6.3. Aldolasas dependientes de acetaldehído: DERA	163
6.3.1. Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de DERA	163
6.4. Conclusiones	165
6.5. Bibliografía	166
7. Introducción a la producción de aldolasas recombinantes.	168
7.1. Estudios preliminares de los niveles de expresión de RhuA en <i>E. coli</i> M15 (pQErham) y <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' (pTrcrham)	169

7.2. Determinación del factor de conversión DO _{600nm} /Biomasa para células inducidas y no inducidas de <i>E. coli</i> M15 (pQErham)	171
7.3. Estudios de los niveles de expresión de RhuA en <i>E. coli</i> M15 (pQErham) en medio complejo (LB) y medio definido (MD) en Erlenmeyers	174
7.4. Estudio preliminar de la optimización de la concentración del inductor químico IPTG	177
7.5. Ensayos en bioreactor. Operación en discontinuo.	178
7.5.1. Estudio del efecto del tiempo de inducción sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> M15 (pQErham) y la expresión de RhuA	179
7.5.2. Efecto del tiempo de inducción (fase temprana y tardía de crecimiento exponencial)	179
7.5.3. Comparación de la composición elemental de Zn ²⁺ entre células inducidas y no inducidas	182
7.5.4. Estudio del efecto de la temperatura sobre la expresión de RhuA	183
7.5.5. Comparación de la velocidad de crecimiento y rendimiento aparente de los cultivos en bioreactor	185
7.6. Conclusiones	186
7.7. Bibliografía	187
8. Selección de una estrategia operacional para la producción de RhuA en <i>E. coli</i> M15 (pQErham)	188
8.1. Introducción	188
8.1.1. Estrategias para la obtención de CADC	188
8.1.2. Desarrollo de medios de cultivo para estrategia semicontinuas de cultivo de <i>E. coli</i>	189
8.1.3. Estrategias de alimentación para procesos semicontinuos de cultivos de <i>E. coli</i>	193
8.1.3.1. Métodos sin control retroalimentado	193
8.1.3.2. Métodos con control retroalimentado	194
8.2. Elección e implementación de una estrategia operacional para el cultivo de <i>E. coli</i> M15 (pQErham)	197
8.2.1. Modificaciones realizadas al medio MD de O. Durany.	197
8.2.2. Estudio y optimización del crecimiento de <i>E. coli</i> M15 (pQErham) en estrategias semicontinuas exponenciales sin inducción.	198
8.2.3. Cálculo del rendimiento intrínseco y coeficiente de mantenimiento de <i>E. coli</i> M15 (pQErham)	208
8.3. Estudio de la producción de RhuA recombinante usando estrategias semicontinuas exponenciales	211
8.3.1. Criterios para la implementación de un cultivo semicontinuo de <i>E. coli</i> M15 (pQErham)	211
8.3.2. Diseño de una estrategia de adición de pulsos de antibiótico para incrementar la estabilidad plasmídica en cultivos semicontinuos	215
8.3.3. Resultados del cultivo semicontinuo inducido (F15)	215

8.3.4. Efecto de adición de casaminoácidos y LB sobre la expresión de RhuA	219
8.3.4.1. Efecto de la adición de casaminoácidos (F17)	220
8.3.4.2. Efecto de la adición de LB (F18)	222
8.3.5. Efecto de la concentración de IPTG sobre la actividad específica final de RhuA	224
8.3.5.1. Experimento F13: inducción con 1110 μ moles IPTG	224
8.3.5.2. Experimento F20: inducción con 200 μ moles IPTG	226
8.4. Comparación de la producción de RhuA en cultivos en discontinuo y semicontinuo	232
8.5. Variación de la relación Biomasa/DO _{600nm} en función de la actividad específica	233
8.6. Conclusiones	234
8.7. Bibliografía	236
9. Diseño de un sistema pQE de alta estabilidad plasmídica basado en un marcador genético de auxotrofia para glicina	239
9.1. Introducción	239
9.2. Diseño de un sistema de complementación génica para regular la segregación plasmídica	240
9.3. Construcción de la cepa mutante <i>E. coli</i> M15 Δ glyA (auxotrófica para glicina) mediante recombinación con fragmentos de PCR	242
9.3.1. Transformación de la cepa <i>E. coli</i> M15 con el plásmido pKD46 e inducción del sistema <i>Red</i> .	243
9.3.2. Amplificación del fragmento P1P4 a partir del plásmido pKD32	243
9.3.3. Transformación de células <i>E. coli</i> M15 con el fragmento P1P4 e inserción en el cromosoma bacteriano por recombinación.	244
9.3.4. Delección del <i>cassette</i> cromosómico FRT de <i>E. coli</i> M15 Δ glyA::P1P4	246
9.3.5. Comprobación del fenotipo mutante gly ⁻ de la cepa <i>E. coli</i> M15 Δ glyA	248
9.4. Construcción del plásmido de complementación de la auxotrofia en glicina	250
9.4.1. Basado en las regiones regulatorias de <i>glyA</i>	250
9.4.1.1. Estudio del crecimiento de la cepa M15 Δ glyA (pQE γ rham) en medio definido	253
9.4.2. Basado en la utilización de un promotor constitutivo débil (P3)	257
9.4.2.1. Construcción del plásmido pQE $\alpha\beta$ rham	257
9.4.2.2. Estudio preliminar del crecimiento de la cepa M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) en medio definido	260
9.5. Estudio de la expresión de RhuA en la cepa recombinante <i>E. coli</i> M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham)	261
9.5.1. Valoración de la cepa <i>E. coli</i> M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) en un	265

cultivo a $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$	
9.5.2. Valoración de la cepa <i>E. coli</i> M15 Δ glyA (pQE α β rham) en un cultivo a $\mu_{\text{set}} = 0.2 \text{ h}^{-1}$	268
9.6. Conclusiones y perspectivas futuras de trabajo	277
9.7. Bibliografía	279
10. Anexos	282
11. Publicaciones	292

RESUMEN

La utilización de aldolasas como biocatalizadores para la formación de enlaces C-C con estereoquímica definida depende esencialmente del descubrimiento de nuevas aldolasas y de la capacidad de disponerlas en el mercado para demostrar su poder en la síntesis de sintones quirales.

El presente trabajo de tesis doctoral es una aportación al campo de las síntesis asimétricas basadas en el uso de enzimas a través de la clonación de nuevas aldolasas naturales, así como del desarrollo de procesos de obtención de aldolasas recombinantes dependientes de DHAP, de glicina y de acetaldehído para su utilización en la síntesis de compuestos complejos con dos nuevos centros quirales de estereoquímica definida y complementaria.

Las enzimas objetivo de este trabajo son las cuatro aldolasas dependientes de DHAP (ramnulosa 1-fosfato aldolasa, fuculosa 1-fosfato aldolasa, fructosa 1,6 bifosfato aldolasa, tagatosa 1,6 bifosfato aldolasa), dos aldolasas dependientes de glicina (treonina aldolasas) y aldolasas dependientes de acetaldehído (desoxiribosa 1- fosfato aldolasa). En concreto, este trabajo se resume en cinco puntos básicos:

Primero, se han clonado siete aldolasas procariontas de diversas fuentes microbianas, aunque principalmente de *E. coli*, en una plataforma homogénea, sencilla y versátil que permite la sobreexpresión soluble intracelular de estas enzimas como proteínas de fusión a una cola de hexahistidinas.

Segundo, se ha desarrollado una estrategia general de purificación que permite obtener el producto funcional en un mínimo número de etapas con un alto rendimiento y estabilidad.

Tercero, se han puesto a punto las metodologías necesarias para la determinación de las actividades aldolásicas específicas en base a ensayos enzimáticos espectrofotométricos fundamentados en la reacción con el sustrato natural de cada una.

Cuarto, se ha seleccionado el sistema de producción de ramnulosa 1-fosfato aldolasa (RhuA) como modelo para definir un proceso reproducible a escala productiva, optimizando los aspectos básicos que condicionan la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Quinto, se ha trabajado en el desarrollo de una estrategia de cultivo semicontinuo adecuado para la obtención de cultivos de alta densidad celular, optimizando los criterios de inducción de la expresión de la proteína recombinante para maximizar la producción y productividad de RhuA.

Finalmente, utilizando técnicas de biología molecular, se ha trabajado en la mejora de la plataforma de expresión para prescindir del uso de antibióticos como marcadores de selección, siempre pensando en su aplicación a escala industrial. En concreto, se ha desarrollado un plásmido de complementación de una auxotrofia para glicina que permite el crecimiento de *E. coli* en medios definidos sin necesidad del uso de antibióticos. Este nuevo sistema permitirá diseñar futuras estrategias de cultivo más económicas para la producción de proteínas recombinantes con un menor impacto ambiental.

CAPÍTULO I

Introducción general

1. Introducción

Hoy por hoy, dentro de la Química Orgánica sintética, una de las líneas de investigación que genera más interés es la preparación de compuestos enantioméricamente puros con actividad biológica. Este proviene, sin duda, del conocimiento general de que los sistemas vivos, que a su vez están formados por componentes quirales, interaccionan con dos enantiómeros de forma diferente, como resultado de relaciones diastereoisoméricas. Por ejemplo, un enantiómero de una sustancia quiral puede ser un potente inhibidor enzimático, mientras que su imagen especular puede ser esencialmente inactiva.

El ejemplo más antiguo de este campo de investigación data de 1858 cuando Pasteur realizó la resolución cinética del racemato del ácido tartárico, comprobando que si éste se suministraba como medio de cultivo al hongo *Penicillium glaucum*, la fermentación cesaba tan pronto como el enantiómero (R,R) se había consumido. De esta forma el ácido (S,S)-(-)-tartárico pudo ser aislado del medio (figura 1.1).

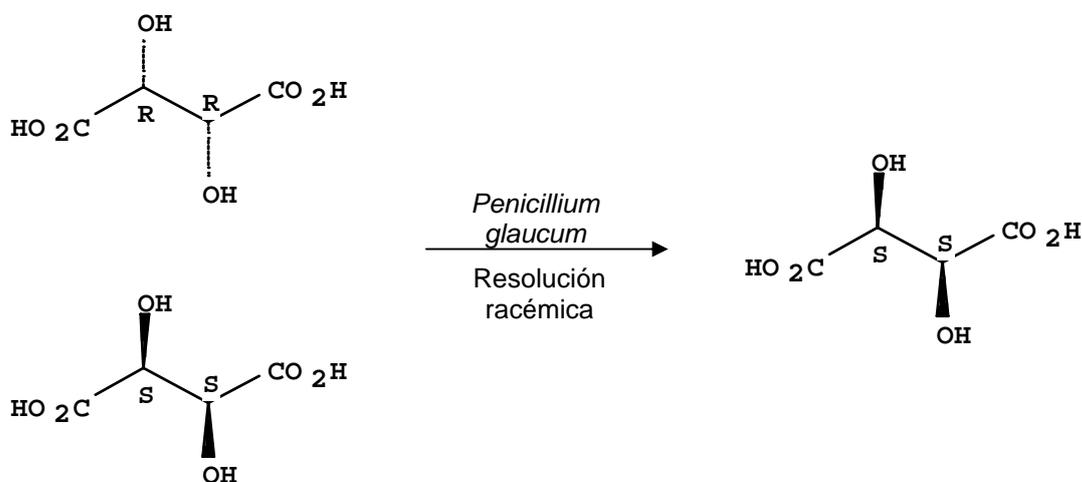
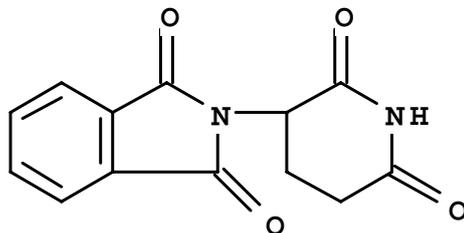


Figura 1.1. Resolución racémica del ácido tartárico.

Sin embargo, la magnitud de la importancia de esta diferenciación por parte de los seres vivos hacia un determinado enantiómero, no era imaginable hace años hasta ver los efectos dramáticos producidos por la administración de algunos fármacos en su forma racémica. Un buen ejemplo de la marcada diferencia de la acción de las dos formas enantioméricas de un compuesto dado es la talidomida, que se utilizó como sedante en

su forma racémica, comprobándose más tarde que el enantiomero (-) causaba, además, deformaciones fetales importantes (Decamp 1989).



(-) -Talidomida

El hecho de que exista diferencia en actividad y reactividad de los estereoisómeros *in vivo* ha incrementado la vigilancia por las autoridades sanitarias, hasta el punto que las nuevas sustancias para uso clínico deben ser homoquirales para evitar la posibilidad de efectos secundarios no deseados. Ello ha forzado a la industria, ya no solo farmacéutica sino química en general, a focalizar más sus objetivos sintéticos: ya no basta obtener productos con una conectividad atómica concreta, sino que además, se necesitan con una estereoquímica definida.

Desde el punto de vista legal, la legislación actual para el registro de productos racémicos es mucho más rigurosa que para los productos enantioméricamente puros (Stinson 1992; Stinson 1998). La mezcla racémica de un fármaco quiral es considerada una combinación de fármacos y, consecuentemente, las pruebas clínicas y toxicológicas han de realizarse para cada enantiómero por separado.

También, desde el punto de vista medioambiental, la obtención de compuestos de estereoquímica definida tiene importancia. Por ejemplo, el uso de mezclas racémicas en insecticidas para el control de plagas puede tener, además del efecto deseado sobre la agricultura, otros efectos colaterales no deseables, tal como la acumulación en la naturaleza de uno de los enantiómeros, resistente a ser biodegradado, creando un problema de contaminación ambiental.

El interés por la obtención de sustancias enantioméricamente puras es un área prioritaria de la industria de la industria química fina y en la que constantemente se trabaja en la investigación y desarrollo de nuevas metodologías que faciliten la obtención de compuestos óptimamente puros (Stinson 2001).

1.1 ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ESTEREOQUÍMICA DEFINIDA

Para lograr este fin, es decir, la obtención de productos en forma no racémica, se utilizan diferentes métodos que se pueden clasificar en tres grandes grupos:

a) Resolución de mezclas racémicas.

Se puede considerar el método clásico de obtención de productos enantioméricamente puros. El procedimiento consiste en la reacción de un compuesto quiral en su forma racémica con un agente de resolución homoquiral para dar dos diastereoisómeros separables, que se tratan después de forma independiente liberando los dos enantiómeros iniciales. El agente de resolución se puede recuperar al final del proceso.

Algunas enzimas (lipasas, esterasas y proteasas) han sido empleadas en la industria como agentes de resolución para mezclas racémicas (Sih, 1989). Por ejemplo, se puede obtener L-lisina a partir de los isómeros DL- α -amino- ϵ -caprolactano por medio de la hidrólisis del isómero L empleando células de *Candida humicola*, las cuales contienen una α -amino- ϵ -caprolactamasa L específica (figura 1.2). El principal inconveniente de esta estrategia es su rendimiento teórico (50 %), además de ser necesario incluir etapas de reciclaje del enantiómero no deseado.

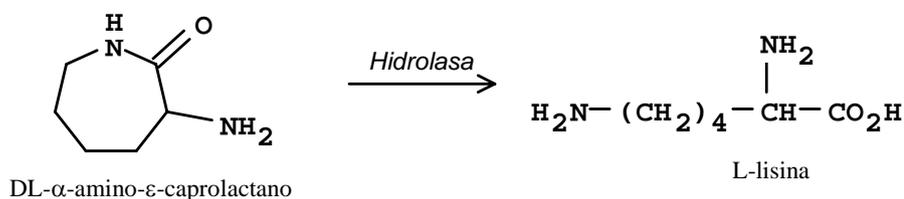


Figura 1.2. Obtención de L-lisina a partir de DL- α -amino- ϵ -caprolactano por medio de la hidrólisis del isómero L, empleando células de *Candida humicola*, las cuales contienen una α -amino- ϵ -caprolactamasa L específica

b) Interconversión de grupos funcionales presentes en moléculas ópticamente activas.

En segundo lugar se han clasificado aquellos métodos en los que se utilizan materiales de partida quirales y además, ópticamente activos, obtenidos de fuentes naturales y sobre los que se llevan a cabo transformaciones de grupos funcionales presentes en la molécula hasta llegar al material deseado, pero sin alterar ninguna de las unidades estereogénicas iniciales.

Por ejemplo, se pueden obtener mediante este procedimiento aminoácidos no naturales (dependiendo del residuo R) a partir de otros que si lo son. Por ejemplo, las secuencias de reacción para la obtención de aminoácidos no naturales a partir de la (S)-serina suponen la protección del grupo amino, seguida de una esterificación intramolecular, apertura del anillo de la β -lactona formada y la desprotección final del grupo amino (figura 1.3). En este caso, se puede apreciar que el sustrato y el producto mantienen la misma disposición espacial en torno al centro asimétrico.

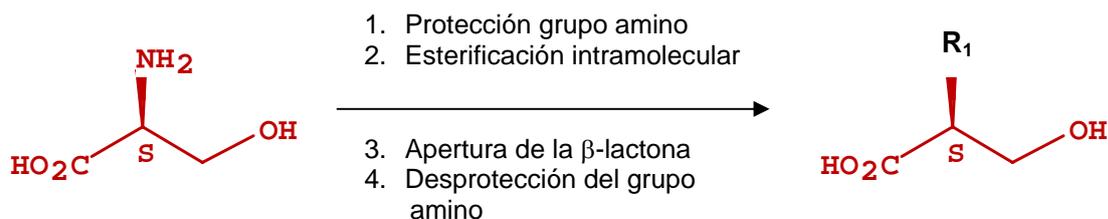


Figura 1.3. Síntesis de aminoácidos no naturales a partir de (S)-serina mediante la interconversión de grupos funcionales.

A pesar de que se puede obtener aminoácidos no naturales en un 99 % de exceso enantiomérico, es laborioso, incluye múltiples etapas y está limitado a la disponibilidad del sustrato natural.

c) Síntesis asimétrica.

Por último, el tercer gran grupo de métodos desarrollados para la obtención de compuestos enantioméricamente puros, y especialmente de gran relevancia, es el de síntesis asimétrica, ya sea enantio o diastereoselectiva. Una síntesis asimétrica se puede definir como una transformación en la cual una unidad aquiral, en un conjunto de moléculas de sustrato, se convierte en una unidad quiral de forma que los posibles estereoisómeros se obtienen en cantidades desiguales. En los últimos años, esta estrategia ha sido desarrollada ampliamente en el ámbito industrial y científico, siendo la más importante a nivel de aplicación en síntesis química.

Existen varios métodos para llevar a cabo síntesis asimétricas, sin embargo en la actualidad, se ha dado gran relevancia a aquellos procedimientos donde la asimetría es controlada por un biocatalizador (enzimas) para la obtención de productos enantioméricamente puros.

1.2 PAPEL DE LAS ENZIMAS EN SÍNTESIS ASIMÉTRICA

El uso de enzimas para promover transformaciones específicas tiene diversas ventajas sobre otras metodologías químicas; por ejemplo, son de gran utilidad para aquellas reacciones que son difíciles de llevar a cabo por su complejidad usando la química orgánica asimétrica, además de que pueden ser conducidas bajo condiciones moderadas de temperatura, presión y pH. Otra ventaja consiste en que, generalmente, los productos se obtienen con un buen rendimiento químico y una gran pureza óptica (Davies et al. 1990). Por ello, el empleo de biocatalizadores (enzimas) para síntesis asimétrica está siendo objeto de intensas investigaciones, sobre todo en el ámbito industrial, generando un nuevo campo con múltiples aplicaciones y potencialidades.

Un área en la cual las enzimas han demostrado ser especialmente útiles es en la síntesis de carbohidratos (Wong 1995), donde la síntesis química convencional generalmente requiere múltiples y complejas secuencias de protección/desprotección y enfrenta dificultades en el control de la estereoespecificidad del producto. La alta regio y estereoselectividad que poseen las reacciones catalizadas por enzimas proporcionan nuevas oportunidades para resolver muchos problemas sintéticos encontrados en la síntesis de carbohidratos

A medida que se evidencia que los carbohidratos juegan roles importantes en la definición de estructuras y de los procesos biológicos (metabolismo, respuesta inmune, inflamación, metástasis y otros eventos de reconocimiento celular), el acceso a este tipo de compuestos se hace cada vez más importante. Consecuentemente, los métodos sintéticos que permitan obtener las estructuras naturales, así como los análogos de carbohidratos con actividad metabólica, tienen carácter prioritario.

En términos amplios, la síntesis química de carbohidratos involucra dos disciplinas diferentes: i) la síntesis de monosacáridos y sus derivados, y ii) la construcción de oligosacáridos y compuestos análogos. La primera depende esencialmente de la capacidad de formar eficientemente enlaces carbono-carbono con estereoquímica definida. La segunda, requiere principalmente de estrategias estereoespecíficas de alto rendimiento para la formación de enlaces glicosídicos y acetal mediante el uso de glicosidasas y glicosil transferasas (Wymer and Toone 2000).

Se han utilizado principalmente dos tipos de enzimas para sintetizar monosacáridos naturales y no-naturales, sus análogos y otros compuesto relacionados: trancetolasas y aldolasas. Ambas catalizan la transferencia reversible de compuestos con grupos

carbonilo (donadores) a aldehídos (aceptores). Aunque estas enzimas son bastante específicas para el donador (nucleófilo), un amplio rango de aldehídos pueden ser utilizados como aceptores (electrófilo), lo cual permite producir una gran variedad de monosacáridos naturales y no naturales (Toone et al. 1989).

1.3 LAS ALDOLASAS: DEFINICIÓN, MECANISMO CATALÍTICO Y FUNCIÓN

Son enzimas que catalizan la formación de enlaces carbono-carbono mediante el ataque de un átomo de carbono α desprotonado de un aldehído o cetona sobre el carbono carbonilo de otro aldehído o cetona, generando un β -hidroxialdehído o una β -hidroxicetona, según el siguiente esquema de reacción (figura 1.4)

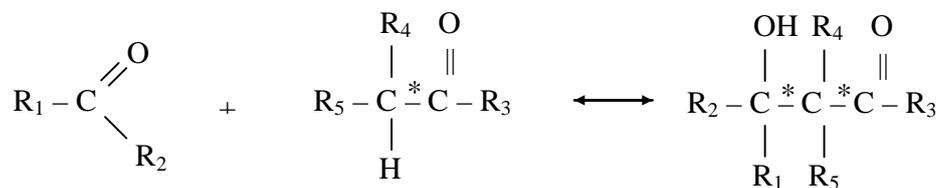
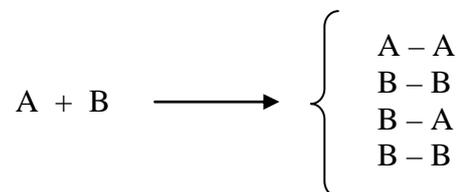


Figura 1.4. Reacción general de condensación aldólica.

Esta misma reacción puede llevarse a cabo mediante la química orgánica convencional. En este caso, la reacción progresa en medio básico, fundamentándose en el mismo esquema antes presentado, con la diferencia de que queda limitada a dos problemas básicos:

- A excepción de determinados casos de impedimento estérico, la reacción no es estereoespecífica, obteniéndose el producto racémico del carbono quiral formado en la reacción
- Por cada par inicial de aldehídos o cetonas diferentes, se pueden obtener hasta cuatro posibles productos de adición de difícil separación:



Estos inconvenientes son solventados cuando se emplean enzimas como catalizador de la reacción aldólica, ya que permite obtener el producto de adición deseado gracias a su gran especificidad por el donador aldol. Además, la estereoselectividad de la reacción aldólica catalizada por aldolasas es, en general, controlada por la enzima y no depende de la estructura o estereoquímica del sustrato, lo que hace que la estereoquímica del producto, a veces, sea muy predecible.

Mientras que la reacción catalizada en medio básico solo es enantioselectiva cuando se trabaja con cantidades estequiométricas de sustratos quirales puros, la aplicación de las adolasas como biocatalizadores de la misma reacción puede rendir productos enantioméricamente puros a partir de sustratos no quirales. También, cuando la reacción aldólica se cataliza en medio básico, resulta complicado trabajar con aldehídos o cetonas con grupos hidroxilos u otros grupos activos para la reacción, siendo necesario recurrir a pasos de protección y desprotección selectivos. Las aldolasas, al contrario, pueden ser totalmente regioselectivas, reduciendo la química de protección al mínimo.

Aunque termodinámicamente el equilibrio de la reacción aldólica se encuentra desplazado hacia la formación del producto de condensación, la función *in vivo* de las aldolasas esta a menudo relacionada con la ruptura degradativa de metabolitos. Así, entre sus funciones, se encuentra que están involucradas en la degradación y transformación de azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos. Sin embargo, las reacciones catalizadas por éstas son reversibles y, seleccionando las condiciones adecuadas, se puede desplazar el equilibrio hacia la formación de enlaces C-C. En este proceso, el agua no interviene ni como reactante ni como producto, por lo que en la mayoría de las reacciones catalizadas por estas enzimas *in vitro* se llevan a cabo en medios predominantemente acuosos. Este aspecto es importante, ya que no es necesario el uso de bases fuertes ni solventes orgánicos para llevar a cabo la reacción.

La capacidad de estas enzimas para producir azúcares inusuales, aprovechando su estereoespecificidad y estereoselectividad, además de todos los aspectos relacionados con las condiciones de reacción, las hacen especialmente atractivas para los químicos orgánicos, los cuales cuentan con herramientas limitadas para la obtención de estos productos a través de la síntesis convencional.

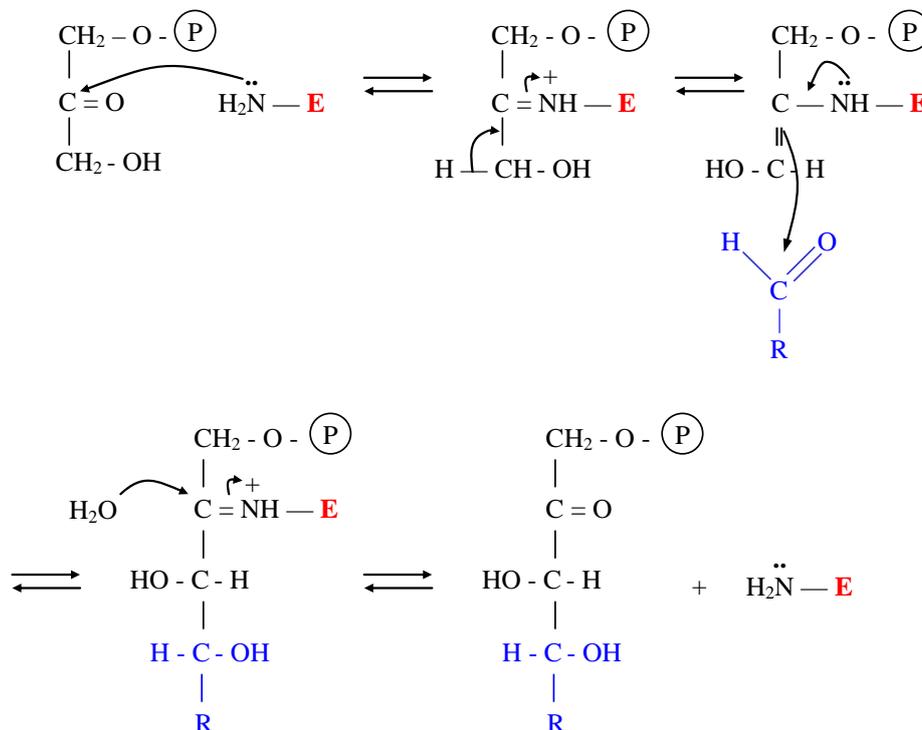
La obtención de nuevos carbohidratos resulta atractivo desde el punto de vista de su utilidad. Cada vez es más evidente su importancia en procesos de comunicación celular y molecular, así como su implicación en procesos de crecimiento, respuestas inmunológicas, inflamación, metástasis, etc. En virtud de su amplio abanico de funciones biológicas, cada vez existe más interés por parte de la industria farmacéutica en disponer de técnicas sintéticas que permitan acceder tanto a carbohidratos naturales como a sus análogos estructurales que puedan funcionar como agonistas o antagonistas de funciones biológicas.

1.4 CLASIFICACIÓN DE LAS ALDOLASAS

Hasta el momento, se han identificado y aislado más de 30 aldolasas, las cuales se han clasificado según su mecanismo de acción en dos grandes grupos (Takayama (Takayama et al. 1997):

- Tipo I: para este grupo de aldolasas, el sustrato donador forma un compuesto intermediario (base de Schiff) con un residuo lisina en el centro activo de la enzima, añadiéndose después al aceptor (figura 1.5A y 1.5B). Se encuentran predominantemente en animales superiores y plantas y son inactivadas por borohidruro (reductor de bases de Schiff)
- Tipo II: a diferencia del grupo I, requieren de un catión divalente como cofactor (generalmente Zn^{2+}), el cual actúa como un ácido de Lewis para facilitar la desprotonización (figura 1.5C). Se encuentran principalmente en bacteria y hongos y son inactivadas por agentes quelantes, tal como EDTA.

(A)



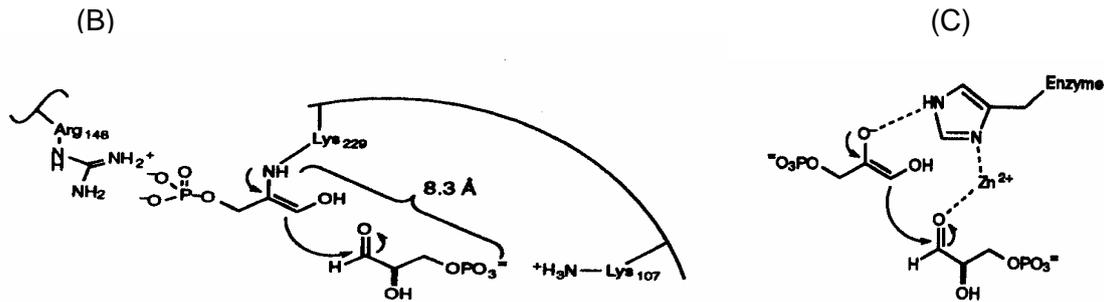


Figura 1.5. (A) Esquema general de reacción de condensación aldólica catalizada por aldolasas de tipo I. Tanto la reacción de condensación como de ruptura involucra la formación de una base de Schiff. (B) Mecanismo catalítico de las aldolasas tipo I en el centro activo de la enzima (Rasor 1995). (C) Mecanismo catalítico de una aldolasa de tipo II (Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa) en el centro activo de la enzima (Henderson 1994).

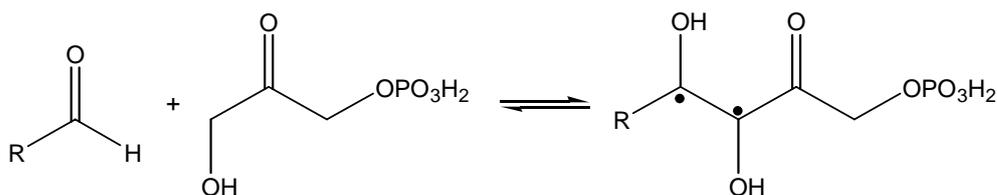
Por otro lado, las aldolasas que han sido investigadas para estudiar su potencialidad en síntesis asimétrica, se pueden clasificar sobre la base de la estructura del sustrato donador, constituyendo cuatro grupos principales (Takayama et al. 1997):

- Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP).
- Aldolasas dependientes de acetaldehído.
- Aldolasas dependientes de glicina.
- Aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenolpiruvato (PEP).

A continuación se detallan algunas características de los grupos de aldolasas:

1.4.1. Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP)

Utilizan DHAP como sustrato donador, generando cetosas 1-fosfato después de reaccionar con un aldehído, según se muestra en la siguiente reacción general:



In vivo, se conocen cuatro aldolasas que catalizan la adición reversible de DHAP a D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P) o L-lactaldehído, generando cada una un producto único cuya esterequímica en C-3 y C-4 resulta complementaria (figura 1.6). Estas son:

- | | |
|--------------------------------------|---------------------|
| a. D-fructosa1,6-bifosfato aldolasa | (FruA; EC 4.1.2.13) |
| b. D-tagatosa 1,6-bifosfato aldolasa | (TagA, EC 4.1.2.40) |
| c. L-fuculosa 1-fosfato aldolasa | (FucA; EC 4.1.2.17) |
| d. L-ramnulosa 1-fosfato aldolasa | (RhuA; EC 4.1.2.19) |

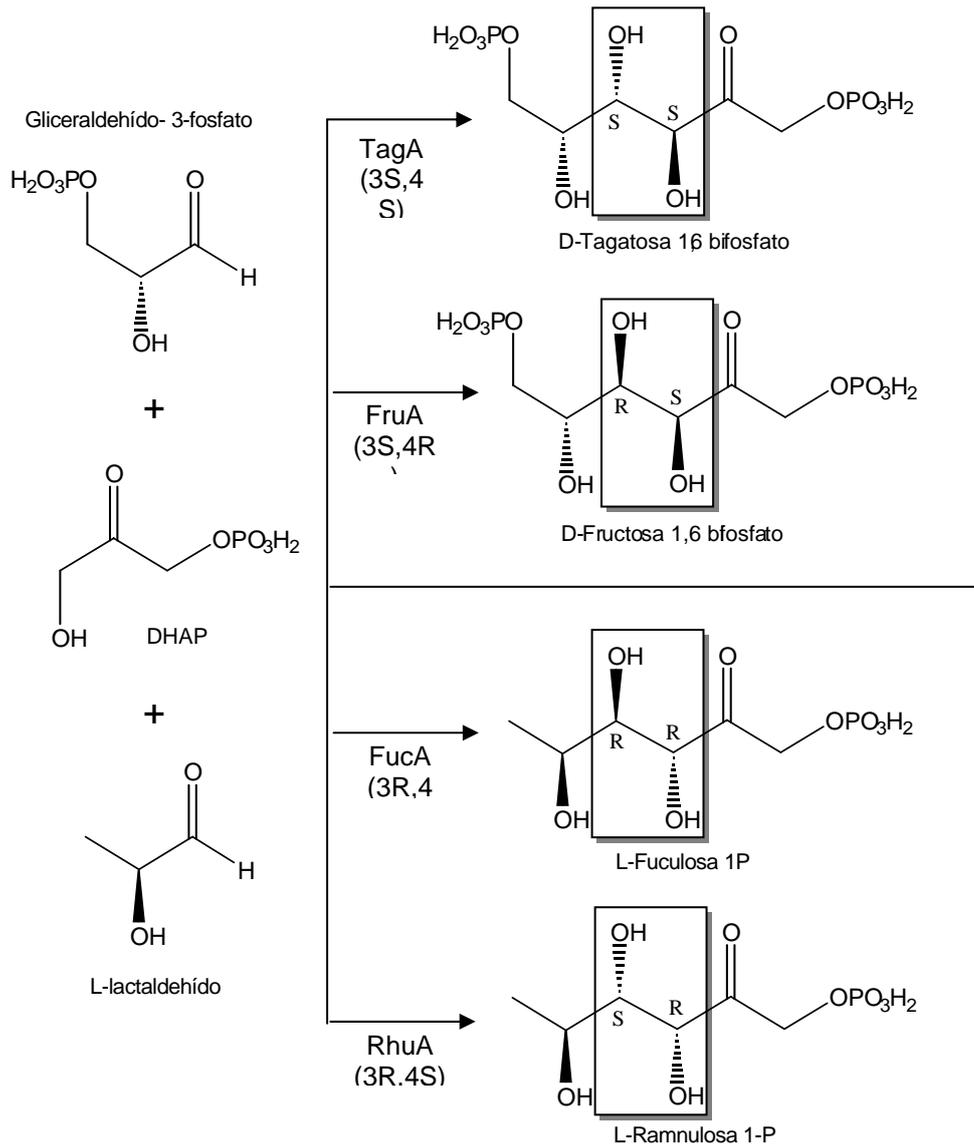


Figura 1.6. Estereoquímica de los productos generados por las cuatro diferentes aldolasas DHAP dependientes.

D-Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa

Ha sido aislada a partir mamíferos y diversos microorganismos, siendo la enzima purificada a partir de músculo de conejo, (RAMA o *rabbit muscle aldolase*) la más estudiada hasta el momento en síntesis orgánica. La enzima cataliza la condensación aldólica estereoespecífica de DHAP con su sustrato natural, D-gliceraldehído 3-fosfato, para dar D-fructosa 1,6-bisfosfato, aunque se ha determinado su capacidad de reaccionar con diversos aldehídos para dar azúcares aminados, deoxiazúcares, fluoroazúcares y azúcares de 8 – 9 átomos de carbono. (Bednarski et al. 1986; Durrwachter et al. 1986; Liu et al. 1991b). La enzima clase II de *E. coli* ha sido clonada, sobreexpresada y determinada su estructura por cristalización con análogos de su sustrato natural unido al centro activo de la enzima. Además, se ha realizado mutagénesis dirigida y estudiado las

enzimas mutantes con la finalidad de comprender el rol que juegan los diferentes residuos en la unión del sustrato a la enzima y su mecanismo catalítico (Zgiby et al. 2002).

D-Tagatosa 1,6-bifosfato aldolasa

In vivo, la enzima está involucrada en el metabolismo microbiano de lactosa, D-galactosa y galactitol. Ha sido aislada a partir de *Streptococcus lactis* (Crow and Thomas 1982), *S. aureus* (Bissett and Anderson 1980), y *E. coli* (Eyrisch et al. 1993). Su utilidad en síntesis orgánica es limitada debido a su carencia de estereoselectividad cuando se utilizan otros aldehídos diferentes a su sustrato natural (Rasor, 1995). Sin embargo, el desarrollo de la ingeniería de proteínas podría introducir modificaciones en esta enzima con el fin de mejorar su estereoselectividad, permitiendo su utilización en la síntesis de carbohidratos y análogos.

L-Fuculosa 1-fosfato aldolasa

Cataliza la ruptura reversible de L-fuculosa 1 fosfato (Fuc1P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y L-lactaldehído, constituyendo el paso central en el metabolismo de la L-fucosa (figura 1.7). Además, posee una amplia especificidad por el sustrato aceptor (aldehído), por lo que su utilidad en síntesis orgánica ha sido muy estudiada (Fessner et al. 1991). La fuculosa 1-fosfato aldolasa es una enzima homotetramérica. Cada subunidad consta de 215 aminoácidos con un peso molecular de 34.8 kDa y un sitio de unión a zinc. Tiene un margen de actuación de pH entre 6 y 9, con un óptimo de 7.2. Al igual que la D-fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, la enzima clase II de *E. coli* ha sido clonada, sobreexpresada y determinada su estructura por cristalización con análogos de su sustrato natural unido al centro activo de la enzima (Dreyer and Schulz 1993).

L-Ramnulosa 1-fosfato aldolasa

Cataliza la ruptura reversible de L-ramnulosa 1-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y L-lactaldehído (figura 1.8), constituyendo el paso central en el metabolismo de la L-ramnosa (figura 1.7) (Boronat and Aguilar 1981).

El gen que codifica esta enzima (RhuA) en *E. coli* está localizado en un regulón. Este último, posee 4 genes estructurales relacionados con el metabolismo de la ramnosa: *rhaA*, que codifica la ramnosa isomerasa; *rhaB*, que codifica la ramnulosa kinasa; la *rhaD*, que codifica la ramnulosa 1 fosfato aldolasa y *rhaT*, que codifica para el sistema de transporte de ramnosa. Las secuencias de todos ellos han sido estudiadas y elucidadas (Badia et al. 1989; Moralejo et al. 1993; Tate et al. 1992)

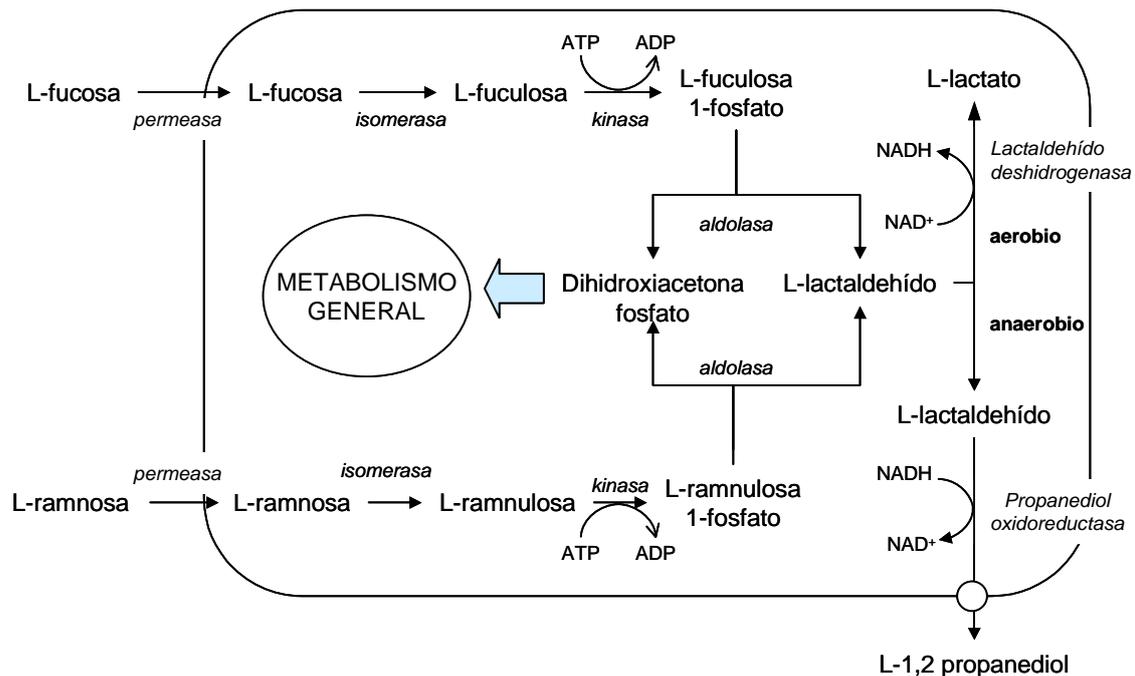


Figura 1.7. Esquema del catabolismo de L-fucosa y L-ramnosa en *E. coli*.

La enzima RhuA de *E. coli* es una aldolasa clase II (dependiente de Zn^{2+}) y posee una amplia especificidad por el aldehído aceptor, generando dioles con configuración 3R,4S, lo que la hace atractiva para procesos sintéticos (Fessner et al. 1992).

Esta enzima fue purificada y cristalizada (Chiu and Feingold 1969) a partir de *E. coli*, estudiando luego sus propiedades catalíticas y de especificidad. Los resultados obtenidos por este grupo de investigación revelaron que la holoenzima de RhuA posee un peso molecular entre 130 -140 kDa (determinado por centrifugación por gradiente de densidad y cromatografía de gel-filtración) y es activada por cationes monovalentes: Na^+ , Cs^+ , NH_4^+ , Rb^+ , o K^+ , siendo este último el activador más eficiente, mientras que el Li^+ actúa como inhibidor. Posee un pH óptimo de 7.5 y, una K_m para ramnulosa 1-fosfato, L-lactaldehído y dihidroxiacetona fosfato de 0.3, 6.0, 3.0 mM respectivamente, con una K_{eq} para la reacción:



de 8.3×10^{-5} M. Además, la enzima muestra que es específica para cetosas 1-fosfato con la configuración D en C-3 y L en C-4 según la fórmula de proyección de Fisher. Schwartz (Schwartz et al. 1974) encontró mediante microscopía electrónica de la enzima purificada y cristalizada de *E. coli* que la forma activa esta formada por cuatro subunidades

dispuestas en una cuadrícula, conteniendo 2 gramos de átomo de zinc por mol de enzima.

Fessner (Fessner et al. 1991) demostró que RhuA acepta una gran cantidad de aldehídos como análogos de su sustrato natural para la síntesis estereoespecífica de carbohidratos y otros derivados hidroxilados y fosforilados. Liu (Liu et al. 1991a) utilizó varias aldolasas dependientes de DHAP (incluyendo RhuA) en combinación con modificaciones químicas (remoción del grupo fosfato y aminación reductiva) como una ruta efectiva para la síntesis de varios tipos de azoazúcares y desoxiazúcares, los cuales pudieran ser potenciales agentes antimicrobianos, herbicidas e inhibidores de glicosidasas. Morís-Varas (MorisVaras et al. 1996) ha combinado el uso de aldolasas (RhuA, FucA, FruA y RAMA) e isomerasas para sintetizar iminociclitolos y estudiar su potencial como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas.

1.4.2. Aldolasas dependientes de acetaldehído

Utilizan acetaldehído como donador para producir 2-desoxialdehídos como productos. Solo incluye la 2-desoxiribosa 5-fosfato aldolasa (DERA) como miembro único de este grupo, la cual cataliza *in vivo* la condensación aldólica reversible de acetaldehído y D-gliceraldehído 3-fosfato para formar D-2-desoxyribosa 5-fosfato (figura 1.8), el cual es el carbohidrato base constituyente de la molécula de DNA. Esta aldolasa tipo I esta ampliamente distribuida en la naturaleza y es la única aldolasa que acepta dos aldehídos como sustratos. Su interés en síntesis radica en que no necesita sustratos fosforilados, en contraste con la mayoría de las otras aldolasas. La DERA de *E. coli* ha sido clonada, producida a gran escala y utilizada para la síntesis de una gran variedad de análogos de azúcares (Wong et al. 1995).

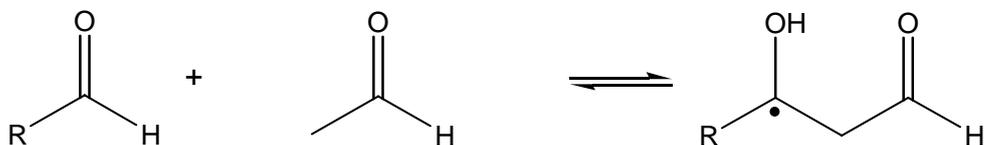


Figura 1.8. Reacción general de condensación aldólica entre acetaldehído y D-gliceraldehído

1.4.3. Aldolasas dependientes de glicina

Catalizan la reacción aldólica reversible de glicina (donador) con un aldehído aceptor para formar β -hidroxi- α -aminoácidos (figura 1.9), siendo la treonina aldolasa la más estudiada hasta el momento. Estos compuestos se pueden encontrar en la naturaleza (treonina, serina) así como en componentes de muchos productos naturales complejos,

tales como antibióticos e inmunosupresores (mycestericina D, vancomicina, ciclosporina, etc.). Sobre estas aldolasas específicamente se discutirá más ampliamente en el capítulo de clonación.

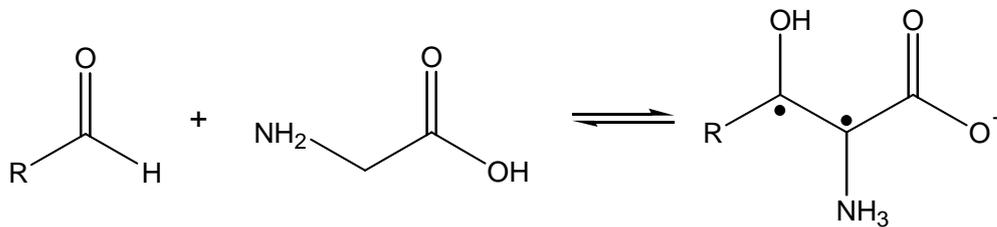


Figura 1.9. Reacción general de condensación aldólica catalizada por las treoninas aldolasas

1.4.4. Aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenolpiruvato (PEP)

Utilizan piruvato o PEP como donadores para formar 3-desoxi 2-ceto ácidos como productos (figura 1.10). Las aldolasas dependientes de piruvato poseen funciones catabólicas *in vivo*, mientras que las que utilizan fosfoenolpiruvato como sustrato donador están involucradas en la biosíntesis de cetoácidos. Por ejemplo, la *N*-acetylneuraminato aldolasa (NeuAc) o ácido siálico aldolasa cataliza la reacción de condensación irreversible de *N*-acetil D-manosamina (ManNAc) y piruvato para formar *N*-acetil D-neuraminato (Neu5Ac). Los ácidos siálicos se encuentran en las superficies celulares de mamíferos formando parte de glicoconjugados y juegan un rol importante en procesos biológicos de reconocimiento celular, siendo el Neu5Ac el miembro más conocido de esta clase especial de aminoazúcares. Por otro lado, se ha encontrado que los derivados de Neu5Ac pueden actuar como inhibidores de sialidasas (Schreiner et al. 1991).

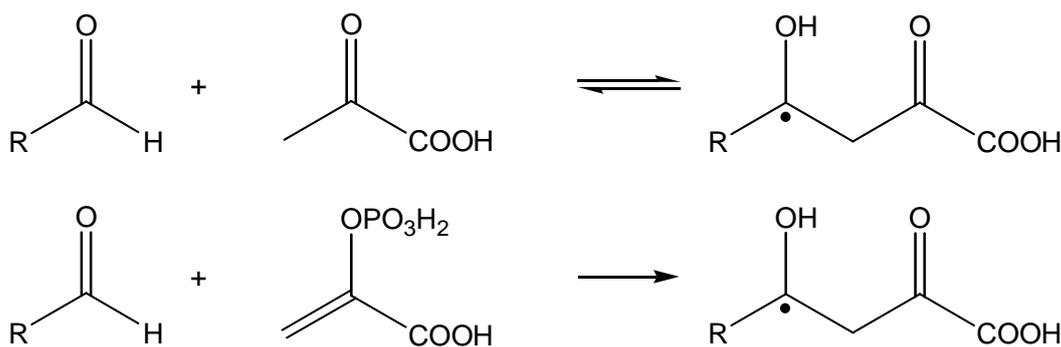


Figura 1.10. Reacción general de condensación aldólica catalizada por las aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenolpiruvato.

Es importante resaltar que, además de los cuatro grupos presentados, existen otras aldolasas, las cuales no han sido muy investigadas en términos de sus aplicaciones en síntesis o de su especificidad de sustrato. Estas aldolasas representaran nuevos retos

para futuros trabajos de investigación y desarrollo para los investigadores del área de biocatálisis.

1.5. GENERALIDADES DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli*

En las últimas décadas, la expresión de proteínas recombinantes en varios organismos hospederos ha demostrado ser una herramienta importante en la producción de proteínas de interés industrial.

Se han utilizado diversos modelos tanto en células procariotas como eucariotas, siendo los primeros los más estudiados. En este sentido, *E. coli* ha sido uno de los modelos de células hospederas más empleados. Su uso radica en la ventaja de la gran disponibilidad de herramientas de genética molecular, del gran número de cepas y mutantes y, del extenso conocimiento sobre su fisiología, vectores de expresión, estabilidad y plegamiento de proteínas, estabilidad genética de las construcciones y de los efectos de la producción de proteínas recombinantes sobre la célula.

La producción de proteínas extrañas (heterólogas) en *E. coli*, correctamente plegadas y biológicamente activas, es un proceso dinámico complejo que involucra muchos retos, ya que *E. coli* no realiza procesamientos post-transduccionales, tiene un citoplasma reducido que impide la correcta formación de puentes disulfuro y posee múltiples genes cuyos productos pueden degradar polipéptidos no plegados o formar cuerpos de inclusión. Además, la sobreexpresión de proteínas recombinantes produce un estrés que se traduce en un incremento de la actividad de las proteasas intracelulares (Harcum and Bentley 1999).

Para el caso de proteínas homólogas, el panorama se presenta con menores dificultades. Sin embargo, se debe tener en cuenta que pueden aparecer problemas de stress metabólico, expresión de proteasas, plegamiento inadecuado de proteínas y formación de cuerpos de inclusión que afecten la concentración final de la proteína recombinante y el crecimiento celular.

Teniendo en cuenta estos aspectos, las proteínas recombinantes pueden ser dirigidas a diferentes compartimientos de *E. coli*: citoplasma, espacio periplasmático y medio extracelular. La mayoría de las proteínas recombinantes expresadas son almacenadas en el citoplasma; sin embargo, el espacio periplasmático, la superficie celular e incluso, la secreción al medio extracelular pueden ser consideradas estrategias alternativas

importantes cuando las proteínas expresadas representan elementos tóxicos para la célula. Actualmente, existen vectores de expresión que permiten dirigir los productos de expresión hacia cada uno de los compartimientos señalados.

Cabe resaltar la todas las aldolasas con las que se ha trabajado son de origen procariota, lo que implica que no es necesario un procesamiento pos-transduccional de la enzima, tales como glicosilaciones, los cuales solo se pueden llevar a cabo en organismo eucariotas. A excepción de la serina hidroximetil transferasa (*Streptococcus thermophilus*) y la tagatosa 1,6 bifosfato aldolasa (*Lactococcus lactis*), el resto de las aldolasas utilizadas en este trabajo tiene como origen *E. coli*.

En este sentido, se ha seleccionado como primera opción *E. coli* para tratar de expresar en el compartimiento citosólico las aldolasas. Entre las principales ventajas de *E. coli* frente a otro hospederos son el hecho de que sea el microorganismo mejor caracterizado a nivel fisiológico, que se haya desarrollado un amplio conocimiento de tecnología de procesos para su cultivo que permiten obtener grandes cantidades de la enzima sobreexpresada y además, que se disponga de un gran número de herramientas de genética molecular que han permitido desarrollar un gran número de cepas y vectores especialmente diseñados para su aplicación en este campo.

El general, para un proceso de producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, hay que considerar los siguientes aspectos:

a) Selección del vector

Un punto importante en relación con la selección del vector, además de la elección del compartimiento celular donde se produzca el almacenamiento de las proteínas recombinantes, es su capacidad expresión, la cual está asociada directamente con la productividad específica de la célula. Esto último depende de varios factores, tales como: i) la estabilidad del vector, que se define como la capacidad de la célula hospedera de mantener la estructura integral del plásmido y permitir su segregación, ii) la carga génica (número de copias del gen recombinante por genoma), y iii) la tasa de transcripción (producción de RNA_m).

La idea general que se persigue en el diseño de sistemas de expresión es que la sobreproducción de una proteína se vea favorecida incrementando la expresión génica de la proteína empleando plásmidos multicopia y/o maximizando la producción de RNA_m mediante el empleo de promotores inducibles potentes en el vector de expresión.

La dirección http://www.embl-hamburg.de/~geerlof/webPP/vectordb/bact_vectors/ corresponde a una base de datos de los diferentes vectores de expresión comerciales disponibles actualmente para *E. coli*. Cada uno de estos sistemas tiene características particulares, tanto en el diseño del vector, como del hospedero. Entre los sistemas más comunes utilizados se citan:

Vector	Promotor	Hospedero	Origen replicación	Casa comercial
pBAD	araBAD	TOP10 LMG194	pUC	Invitrogen
pET	T7	BL21 (DE3)	pBR322	Novagen
pGEX	tac	BL21	pBR322	Pharmacia
pTrc	trc/lac	BL21	pUC	Invitrogen
pQE	T5/lac	M15 [pREP4]; SG13009 [pREP4]	ColE1	QIAGEN

b) Estrategias de cultivo

Paralelamente a la selección de un sistema de expresión adecuado, la selección, diseño y optimización de una estrategia de cultivo también puede ser determinante para la disminución de costos, residuos e incrementar la productividad de un proceso.

Las estrategias de cultivos básicas descritas para *E. coli* se pueden resumir en (figura 1.11):

- Cultivos en discontinuo (*batch*)
- Cultivos en semicontinuo o por lote alimentado (*fed-batch*)
- Cultivos en continuo

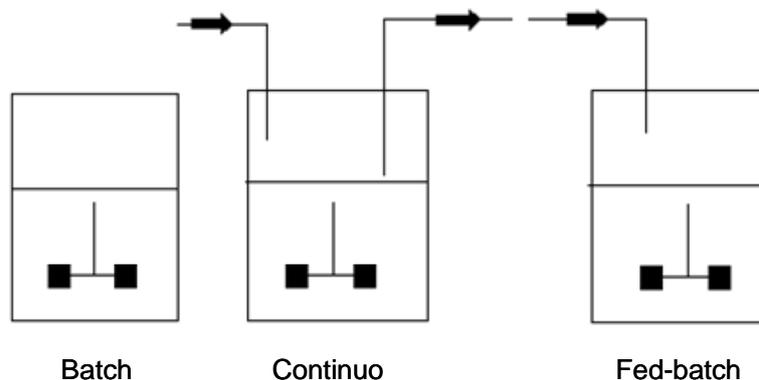


Figura 1.11. Esquema general de las diferentes estrategias de cultivo de células

El cultivo discontinuo es un sistema cerrado en el que todos los nutrientes necesarios para el crecimiento se cargan al tanque de fermentación al inicio del proceso. Durante todo el proceso no se adiciona ningún otro nutriente al margen de la aereación y las soluciones para el control de pH y espuma, y se recupera el producto cuando el cultivo se da por finalizado.

En este modo de operación, las condiciones de crecimiento cambian continuamente con el tiempo: a medida que las células van creciendo consumen los nutrientes presentes en el medio de cultivo y excretan subproductos. Generalmente, el crecimiento celular se detiene por agotamiento de un sustrato o por la acumulación de un subproducto tóxico mucho antes que el cultivo se encuentre limitado por la transferencia de oxígeno. El principal inconveniente del proceso discontinuo es el elevado tiempo muerto de operación (carga, esterilización, descarga y limpieza), así como las concentraciones de biomasa que se pueden obtener, las cuales oscilan entre 5 – 15 g_{PS} l⁻¹ al final del proceso.

El cultivo continuo es un proceso donde continuamente se alimenta medio fresco al fermentador que contiene las células en crecimiento, y se extrae el mismo caudal de cultivo homogeneizado con células. Se caracteriza porque es posible conseguir situaciones de régimen estacionario en que las propiedades del cultivo permanecen constantes en el tiempo, permitiendo relacionar el comportamiento del microorganismo con las condiciones ambientales a las cuales se somete.

Numerosos aspectos en relación con la fisiología de *E. coli* y la optimización de medios de cultivos han sido posibles gracias a esta técnica. Por ejemplo, se han determinado velocidades de crecimiento críticas para la producción de acetato (Han et al. 1992; Suarez and Kilikian 2000) y se han determinado los coeficientes de rendimiento de muchos nutrientes según la velocidad específica de crecimiento con el objetivo de diseñar medios definidos de composición equilibrada (Yee and Blanch 1993a; Yee and Blanch 1993b).

El cultivo semicontinuo parte de una etapa de crecimiento discontinua con una determinada concentración de nutrientes en el vaso de fermentación. En esta etapa, el microorganismo crece a su máxima velocidad específica de crecimiento y, antes de entrar en fase estacionaria por agotamiento de nutrientes, se inicia una segunda etapa de fermentación en la que se va adicionando los nutrientes necesarios para mantener el crecimiento del cultivo.

Escogiendo la composición del medio de cultivo, del medio alimentado y la estrategia de alimentación adecuadas, es posible minimizar la acumulación de nutrientes y la formación de productos tóxicos del metabolismo de *E. coli*, alargando su crecimiento hasta obtener cultivos de alta densidad celular (CADC), y alcanzando valores de concentración de biomasa entre 50 – 150 g_{PS} l⁻¹ (Curless et al. 1990; Mendozavega et al. 1995; Yee and Blanch 1992).

Los principales problemas para la obtención de CADC de *E. coli* son básicamente dos: i) limitación del crecimiento debido a problemas de transferencia de oxígeno y ii) acumulación de ácido acético en el medio de cultivo, el cual puede inhibir no solo el crecimiento de *E. coli* por encima de un valor crítico (5 g l⁻¹) sino también, afectar la síntesis de la proteína recombinante (Jensen and Carlsen 1990; San et al. 1994; Yee and Blanch 1993b)

c) Medio de cultivo

Otro aspecto que la mayoría de los autores consideran de vital importancia en relación con la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* es la composición del medio de cultivo. Ya que algunos nutrientes pueden presentar efectos inhibitorios sobre el crecimiento cuando se encuentran por encima de un valor crítico en el medio de cultivo (Riesenberg 1991; Riesenberg et al. 1991), es necesario diseñar un medio equilibrado que permita el crecimiento pero que evite acumulaciones indeseables.

Existen tres alternativas en relación con los medios de cultivo:

Medios complejos: formulados a base de extracto de levadura, peptonas, tristonas, etc. La utilización de medios complejos hace menos reproducible y controlable el proceso. Además, la acumulación de ácido acético se intensifica en este tipo de medios (Pan et al. 1987)

Medios definidos: formulados a partir de sales y generalmente, una única fuente de carbono. Los medios definidos presentan la ventaja de conocer exactamente la composición, permitiendo un control del proceso basado en el seguimiento analítico (Riesenberg and Guthke 1999).

Medios semicomplejos: son medios definidos enriquecidos parcialmente con una fuente compleja, tal como extracto de levadura, peptona, tristona, etc. Este tipo de medios presentan una combinación de las ventajas y desventajas de los medios definidos y

complejos. Generalmente se consiguen mayores velocidades específicas de crecimiento, pero es más difícil controlar la concentración de los diversos nutrientes presentes en el medio, de manera que el control del proceso se hace más complicado.

Finalmente, cabe resaltar que existen otras alternativas para superar las dificultades relacionadas con la sobreexpresión de proteínas y mejorar el comportamiento de los microorganismos recombinantes, tales la ingeniería metabólica, que pretende manipular el metabolismo a través de modificaciones genéticas dirigidas.

1.6. DISPONIBILIDAD COMERCIAL DE LAS ALDOLASAS

Algunas de las aldolasas descritas anteriormente han sido purificadas a partir de diferentes organismos, clonadas y sobreexpresadas en *E. coli*. Por ejemplo, en la ATCC (*American Type Culture Collection*) se pueden encontrar depositadas cepas de *E. coli* transformadas con vectores de expresión que incluyen genes de aldolasas para su sobreexpresión (tabla 1.1)

Enzima	Microorganismo	Vector	Depositario
D-fructosa 1,6-bifosfato aldolasa	<i>E. coli</i> ATCC 77472	pKEN2 (fagémido)	C. Wong
L-fuculosa 1-fosfato aldolasa	<i>E. coli</i> ATCC 86984	pTrcHis C (plásmido)	Scripps Clinic and Research Foundation
L-ramnulosa 1-fosfato aldolasa	<i>E. coli</i> ATCC 86983	pTrcHis A (plásmido)	C. Wong
D-tagatosa 1,6-bifosfato aldolasa	<i>E. coli</i> ATCC 87025	Pret (fagémido)	C. Wong
2-desoxiribosa 5-fosfato aldolasa	<i>E. coli</i> ATCC 86963	pBR322 (plásmido)	C. Wong

Tabla 1.1. Catálogo 2002 de la *American Type Culture Collection* (ATCC)

Como se muestra en la tabla 1.1, varias adolasas se encuentran disponibles siempre y cuando se adquiera el microorganismo recombinante con el vector de expresión. A simple vista, tener en el laboratorio un sistema que permita producir adolasas se resume a la adquisición de alguno de los sistemas de expresión depositados en una colección de microorganismos, tales como la ATCC, buscar información sobre la cepa de *E. coli* y del vector de expresión, y cultivarla para inducir la síntesis de la proteína.

Esto parece muy sencillo, pero la realidad, a veces, no es tan simple. Cada microorganismo tiene sus características de genotipo y fenotipo, que en gran parte determinan sus requerimientos nutricionales y su comportamiento en un cultivo

(auxotrofías, rendimientos sustrato-biomasa, mantenimiento celular, velocidades específicas de crecimiento, etc.). Por otro lado, cada sistema de expresión tiene su mecanismo de regulación, y la señal para indicar la transcripción de los genes deseados puede variar de un caso a otro.

Otra opción para acceder a las aldolasas es comprarlas directamente. El problema radica en la mayoría no son comerciales, y su disponibilidad, en el caso serlo, está limitada a escala analítica. Por ejemplo, Boehringer Mannheim Biochemicals introdujo un kit de reacciones aldólicas (CHIRAZYME®) que incluía FruA (obtenida a partir de *Staphylococcus carnosus*), FucA y RhuA (obtenidas a partir de *E. coli*). El kit de reacción contenía todos los reactivos necesarios para conducir los experimentos: la aldolasa específica, L-glicerol 3-fosfato y una mezcla de GPO y catalasa, éstas últimas desarrolladas especialmente para aplicaciones sintéticas. Sin embargo, la distribución de este sistema estaba restringida para las aplicaciones en el ámbito de laboratorio y a un costo muy elevado, siendo inviable su utilización a escala industrial. Actualmente, esta empresa no continúa su comercialización. La empresa ThermoGen, Inc., subsidiaria de MediChem Life Sciences ofrecía a través de internet las aldolasas mencionadas obtenidas a partir de *E. coli* recombinantes. Sin embargo, la información sobre esta empresa ya no está disponible en Internet.

1.7. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACION

En virtud de que la disponibilidad comercial de las aldolasas es limitada, o inexistente en algunos casos, y que existe una heterogeneidad en cuanto a los microorganismos y los sistemas de expresión asociados, se ha plantado trabajar en dirección a la generalización de un sistema de expresión uniforme y homogéneo de aldolasas, que incluya tanto el vector como el hospedero, que permita la elaboración de protocolos de operación que puedan utilizarse para cualquier aldolasa que se desee producir.

El objetivo es minimizar y sistematizar la información necesaria para desarrollar estrategias de operación en producción de proteínas recombinantes en *E. coli* en función de un único sistema de expresión, que permitan obtener elevadas productividades y que resulten económicamente rentables y sostenibles, de forma de disponer de las aldolasas en cantidades suficientes para evaluar su potencialidad en síntesis quiral.

En este sentido, lograr este objetivo implica

- Buscar las fuentes de genes que codifican las aldolasas: procariotas o eucariotas
- Clonar los genes en sistemas de expresión que permitan su utilización a escala industrial, así como seleccionar un hospedero adecuado.
- Estudiar las condiciones de cultivo y expresión de la aldolasa para optimizar su producción.
- Definir, optimizar y evaluar una estrategia operacional para cultivar el hospedero y producir la aldolasa en función de la productividad del sistema
- Diseñar una estrategia de recuperación de la enzima que permita obtener altos rendimientos y sea económicamente viable.
- Estudiar las características de cada aldolasa: especificidad por sustratos, condiciones de reacción, inmovilización, rendimientos estereoméricos, etc.
- Estudiar los aspectos termodinámicos y cinéticos del proceso de síntesis, medios de reacción, etc., para llegar al diseño y operación de reactores enzimáticos de síntesis.

En concreto, se pretende poder presentar a las aldolasas como una alternativa verdadera, factible y económicamente competitiva a la síntesis orgánica convencional, que en muchos casos, es incapaz de aportar soluciones en la producción de muchos compuestos de interés terapéutico y alimentario.

1.8. MARCO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo se ha enmarca dentro del proyecto de investigación “Proceso para la obtención de aldolasas recombinantes y su aplicación a la síntesis de sintones quirales”, el cual fue llevado a cabo entre el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y el Departamento de Química de Péptidos y Proteínas del IIQAB (CSIC) y la continuación del mismo, titulado “Nuevos desarrollos en ingeniería bioquímica: optimización de procesos de producción de proteínas recombinantes y de síntesis enzimática”, el cual plantea como objetivo principal, la obtención de una batería de biocatalizadores útiles para la síntesis asimétrica de moléculas polifuncionales complejas.

Los primeros esfuerzos del grupo de investigación de aldolasas del Departamento de Ingeniería Química de la UAB, coordinado por el Dr. Lopez-Santín, se centraron en la producción de aldolasas dependientes de DHAP, específicamente con la fuculosa 1-fosfato aldolasa y ramnulosa 1-fosfato aldolasa, a partir de las cepas *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) y *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) cedida por García-Junceda (García-Junceda et al. 1995). A partir de estos estudios, se dispuso incluir otras aldolasas dentro

de los objetivos de los proyectos de investigación de forma de abarcar un abanico mayor de biocatalizadores y estudiar sus potencialidades sintéticas.

En concreto, las aldolasas dependientes de DHAP, así como las dependientes de acetaldehído y glicina han sido objeto del presente trabajo de investigación. Cada grupo posee características especiales en lo que se refiere a sus aplicaciones, encontrándose en la bibliografía diferentes trabajos orientados hacia su aplicación como biocatalizadores específicos en síntesis quirales.

Uno de los principales inconvenientes de este proyecto ha sido la cuantificación de la actividad ramnulosa 1-fosfato y fuculosa 1-fosfato aldolasa, ya que los sustratos específicos no son comerciales. En este sentido, la estrategia para solventar este problema se orientó hacia la síntesis orgánica de DHAP y L-lactaldehído, para posteriormente, sintetizar enzimáticamente el carbohidrato específico de cada aldolasa.

Una vez que se obtenga un sistema que permita la obtención de grandes cantidades de aldolasas, éstas serán utilizadas para estudiar su aplicación como catalizadores quirales en síntesis asimétrica a partir de sus sustratos naturales y análogos, tomando en cuenta aspectos como el mejoramiento de los medios de reacción, inmovilización de la enzima, cambios de especificidad de sustrato por ingeniería de proteínas y la viabilidad del escalado del proceso de cara a la producción.

1.9. BIBLIOGRAFÍA

- Badia J, Baldoma L, Aguilar J, Boronat A. 1989. Identification of the *rhaA*, *rhaB* and *rhaD* Gene-Products from *Escherichia coli* K-12. FEMS Microbiol. Lett. 65(3):253-258.
- Bednarski MD, Waldmann HJ, Whitesides GM. 1986. Aldolase-Catalyzed Synthesis of Complex C-8 and C-9 Monosaccharides. Tetrahedron Lett. 27(48):5807-5810.
- Bissett DL, Anderson RL. 1980. Lactose and D-Galactose Metabolism in *Staphylococcus aureus* .4. Isolation and Properties of a Class I D-Ketohexose-1,6-Diphosphate Aldolase That Catalyzes the Cleavage of D-Tagatose 1,6-Diphosphate. J. Biol. Chem. 255(18):8750-8755.
- Boronat A, Aguilar J. 1981. Metabolism of L-Fucose and L-Rhamnose in *Escherichia coli* - Differences in Induction of Propanediol Oxidoreductase. J. Bacteriol. 147(1):181-185.
- Crow VL, Thomas TD. 1982. D-Tagatose 1,6-Diphosphate Aldolase from Lactic Streptococci - Purification, Properties, and Use in Measuring Intracellular Tagatose 1,6-Diphosphate. J. Bacteriol. 151(2):600-608.

- Curless C, Pope J, Tsai L. 1990. Effect of Preinduction Specific Growth-Rate on Recombinant Alpha-Consensus Interferon Synthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 6(2):149-152.
- Chiu TH, Feingold DS. 1969. L-Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase from *Escherichia coli* Crystallization and Properties. *Biochemistry* 8(1):98-&.
- Davies HG, Green RH, Kelly DR, Roberts SM. 1990. Recent Advances in the Generation of Chiral Intermediates Using Enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 10(2):129-153.
- Decamp WH. 1989. The Fda Perspective on the Development of Stereoisomers. *Chirality* 1(1):2-6.
- Dreyer MK, Schulz GE. 1993. The Spatial Structure of the Class-ii L-Fuculose-1-Phosphate Aldolase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 231(3):549-553.
- Durrwachter JR, Sweers HM, Nozaki K, Wong CH. 1986. Enzymatic Aldol Reaction Isomerization as a Route to Unusual Sugars. *Tetrahedron Lett.* 27(11):1261-1264.
- Eyrisch O, Sinerius G, Fessner WD. 1993. Facile Enzymatic Denovo Synthesis and Nmr Spectroscopic Characterization of D-Tagatose 1,6-Bisphosphate. *Carbohydr. Res.* 238:287-306.
- Fessner WD, Badia J, Eyrisch O, Schneider A, Sinerius G. 1992. Enzymes in Organic-Synthesis .5. Enzymatic Syntheses of Rare Ketose 1-Phosphates. *Tetrahedron Lett.* 33(36):5231-5234.
- Fessner WD, Sinerius G, Schneider A, Dreyer M, Schulz GE, Badia J, Aguilar J. 1991. Enzymes in Organic-Synthesis .1. Diastereoselective Enzymatic Aldol Additions - L-Rhamnulose and L-Fuculose 1-Phosphate Aldolases from *Escherichia coli*. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 30(5):555-558.
- Garcia-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong CH. 1995. A New Strategy for the Cloning, Overexpression and One-Step Purification of 3 DHAP-Dependent Aldolases - Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* 3(7):945-953.
- Han K, Lim HC, Hong J. 1992. Acetic-Acid Formation in *Escherichia coli* Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 39(6):663-671.
- Harcum SW, Bentley WE. 1999. Heat-shock and stringent responses have overlapping protease activity in *Escherichia coli* - Implications for heterologous protein yield. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80(1):23-37.
- Henderson IG-J, E.; Liu, K. K. C.; Chen, Y.-L.; Shen, G.-J.; Wong, C.-H. 1994. Cloning, overexpression and isolation of the Type II FDP aldolase from *E. coli* for specificity study and synthetic application. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2(8):837-843.

- Jensen EB, Carlsen S. 1990. Production of Recombinant Human Growth-Hormone in *Escherichia coli* - Expression of Different Precursors and Physiological-Effects of Glucose, Acetate, and Salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36(1):1-11.
- Liu KKC, Kajimoto T, Chen LR, Zhong ZY, Ichikawa Y, Wong CH. 1991a. Use of Dihydroxyacetone Phosphate Dependent Aldolases in the Synthesis of Deoxyazasugars. *J. Org. Chem.* 56(22):6280-6289.
- Liu KKC, Pederson RL, Wong CH. 1991b. Fructose 1,6-Diphosphate Aldolase-Catalyzed Stereoselective C-C Bond Formation. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*(11):2669-2673.
- Mendozavega O, Buri E, Speck D. 1995. Enhancement of Recombinant Cholera-Toxin B-Subunit Production in *Escherichia coli* by Applying a Fed-Batch Control Strategy. *Biotechnol. Lett.* 17(10):1037-1042.
- Moralejo P, Egan SM, Hidalgo E, Aguilar J. 1993. Sequencing and Characterization of a Gene-Cluster Encoding the Enzymes for L-Rhamnose Metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175(17):5585-5594.
- MorisVaras F, Qian XH, Wong CH. 1996. Enzymatic/chemical synthesis and biological evaluation of seven-membered iminocyclitols. *J. Am. Chem. Soc.* 118(33):7647-7652.
- Pan JG, Rhee JS, Lebeault JM. 1987. Physiological Constraints in Increasing Biomass Concentration of *Escherichia coli* B in Fed-Batch Culture. *Biotechnol. Lett.* 9(2):89-94.
- Rasor JP. 1995. Enzymes in asymmetric synthesis: Formation of C-C bonds by aldolases. *Chimica Oggi-Chemistry Today* 13(11-12):9-13.
- Riesenberg D. 1991. High-Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2(3):380-384.
- Riesenberg D, Guthke R. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(4):422-430.
- Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Ross A, Deckwer WD. 1991. High Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli* at Controlled Specific Growth-Rate. *J. Biotechnol.* 20(1):17-28.
- San KY, Bennett GN, Aristidou AA, Chou CH. 1994. Strategies in High-Level Expression of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Recombinant DNA Technology* li. p 257-267.
- Schreiner E, Zbiral E, Kleineidam RG, Schauer R. 1991. Structural Variations on N-Acetylneuraminic Acid .21. 2,3-Didehydro-2-Deoxysialic Acids Structurally Varied at C-5 and Their Behavior Towards the Sialidase from *Vibrio cholerae*. *Carbohydr. Res.* 216:61-66.

- Schwartz NB, Abram D, Feingold DS. 1974. L-Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase of *Escherichia coli* - Role of Metal in Enzyme Structure. *Biochemistry* 13(8):1726-1730.
- Stinson SC. 1992. Chiral Drugs. *Chem. Eng. News* 70(39):46-&.
- Stinson SC. 1998. Counting on chiral drugs. *Chem. Eng. News* 76(38):83-+.
- Stinson SC. 2001. Chiral catalysis riding high. *Chem. Eng. News* 79(44):23-26.
- Suarez DC, Kilikian BV. 2000. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 35(9):1051-1055.
- Takayama S, McGarvey GJ, Wong CH. 1997. Microbial aldolases and transketolases: New biocatalytic approaches to simple and complex sugars. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:285-310.
- Tate CG, Muiry JAR, Henderson PJF. 1992. Mapping, Cloning, Expression, and Sequencing of the *rhat* Gene, Which Encodes a Novel L-Rhamnose-H⁺ Transport Protein in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267(10):6923-6932.
- Toone EJ, Simon ES, Bednarski MD, Whitesides GM. 1989. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Carbohydrates. *Tetrahedron* 45(17):5365-5422.
- Wong CH. 1995. Enzymatic and Chemoenzymatic Synthesis of Carbohydrates. *Pure Appl. Chem.* 67(10):1609-1616.
- Wong CH, Garciajunceda E, Chen LR, Blanco O, Gijzen HJM, Steensma DH. 1995. Recombinant 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase in Organic-Synthesis - Use of Sequential 2-Substrate and 3-Substrate Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 117(12):3333-3339.
- Wymer N, Toone EJ. 2000. Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4(1):110-119.
- Yee L, Blanch HW. 1992. Recombinant Protein Expression in High Cell-Density Fed-Batch Cultures of *Escherichia coli*. *Bio-Technology* 10(12):1550-1556.
- Yee L, Blanch HW. 1993a. Defined Media Optimization for Growth of Recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol. Bioeng.*:221-230.
- Yee L, Blanch HW. 1993b. Recombinant Trypsin Production in High Cell-Density Fed-Batch Cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 41(8):781-790.
- Zgiby S, Plater AR, Bates MA, Thomson GJ, Berry A. 2002. A functional role for a flexible loop containing Glu182 in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 315(2):131-140.

CAPÍTULO II

Objetivos

2.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un proceso biotecnológico para la obtención de aldolasas recombinantes en *E. coli* que permitan obtener elevadas productividades y que resulten económicamente rentables y sostenibles.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar los genes que codifican las aldolasas dependientes de DHAP (FucA, RhuA, FruA, TagA), de glicina (LTA y SHMT) y de acetaldehído (DERA), a partir de fuentes procariotas, en una plataforma homogénea que permita producir aldolasas de diferentes características de manera eficiente
- Purificar las aldolasas recombinantes a partir de células de *E. coli* M15 inducidas con IPTG mediante la selección de una estrategia basada en la afinidad por colas de histidinas que permita obtener altos rendimientos y sea económicamente viable.
- Definir ensayos enzimáticos reproducibles y exactos para cuantificar las actividades de las aldolasas recombinantes, estudiando los diferentes aspectos necesarios para su validación.
- Caracterizar las condiciones de cultivo y expresión *E. coli* M15 (pQErham) como plataforma modelo para optimizar la producción de aldolasas recombinantes.
- Desarrollar una estrategia semicontinua de cultivo (*fed-batch*) para alcanzar cultivos de alta densidad de *E. coli* M15 (pQErham).
- Optimizar las condiciones de inducción de *E. coli* M15 (pQErham) en cultivos semicontinuos que permita maximizar la producción ($U\ l^{-1}$) y productividad ($U\ l^{-1}\ h^{-1}$) de RhuA.
- Evaluar la posibilidad de mejorar el proceso de producción obtenido mediante el diseño de un sistema que permita una segregación plásmídica adecuada sin la necesidad de la utilización de antibióticos como marcadores de selección.

CAPÍTULO III

Materiales y Métodos

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo se utilizaron básicamente cepas de *E. coli* tanto para la clonación como para la producción de aldolasas. Además, se utilizó una cepa de *Streptococcus thermophilus* para la clonación de una aldolasa dependiente de glicina involucrada en el metabolismo de treonina. A continuación se detallan los diferentes microorganismos utilizados:

3.1.1 *Escherichia coli* XL1 Blue MRF'

Genotipo: Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15Tn10(Tet^r)]

Esta cepa, cedida por García-Junceda (García-Junceda et al. 1995), tiene como características: a) posee auxotrofia en los genes que codifican las enzimas para la síntesis de tiamina (vitamina B₁) b) contiene un episoma F': el episoma F' es un plásmido que contiene el factor que codifica el pili sexual a través del cual el bacteriofago M13 puede infectar la célula y además, los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de prolina.

3.1.2 *Escherichia coli* M15

Genotipo: mal^s, str^s, rif^s, thi⁻, lac⁻, ara⁺, gal⁺, mtl⁻, F⁻, recA⁺, uvr⁺, lon⁺

Cepa comercial (QIAGEN) derivada de *E. coli* K12 (Villarej.Mr and Zabin 1974; Zamenhof and Villarej.M 1972). La cepa se utilizó para la clonación y expresión de diferentes aldolasas.

Características principales:

- Las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos corresponden a aquellas presentes en el tipo salvaje.
- Posee una delección M15 en el gen *lacZ* (*lacZM15*).

3.1.3 *Escherichia coli* DH5 α

Cepa comercial (Invitrogen) empleada para propagación de vectores, clonación y expresión de genes.

Genotipo: F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻,m_k⁺), supE44, thi⁻¹, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169, λ ⁻

3.1.4 *Streptococcus thermophilus* YKA-184

Cepa hiperproductora de acetaldehído. Cedida por Nikolaos Tzanetakis, Aristotle University of Thessaloniki, Departamento de Agricultura, Grecia. No se dispone de ninguna referencia bibliográfica.

3.2 PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA CLONACIÓN Y EXPRESIÓN

3.2.1 Plásmido pTrcHisA

(Invitrogen; San Diego, CA); se utiliza para la expresión regulada de altos niveles de proteínas no tóxicas en *E.coli* bajo el control del promotor de expresión *trc* (figura 3.1). Este promotor es un híbrido derivado de los promotores *trp* y *lac* y es regulado por el operador *lac O* y el producto de expresión del gen *lacI^R*. La presencia del análogo estructural de lactosa isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG) activan la transcripción al desplazar del sitio operador (*lac O*) la proteína represora, permitiendo que se transcriban los genes incluidos en el MCS (sitio de clonaje múltiple o *multiple cloning site*). Entre sus características más resaltantes destacan:

- Origen de replicación (colE1).
- Marcador de selección: *bla* (resistencia a ampicilina - amp^r).
- Posee un epítipo Xpress™ para el fácil reconocimiento de la proteína expresada mediante anticuerpos.
- Secuencia 6xHis-tag junto al MCS (5') que codifica para una cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína, de manera de facilitar su purificación mediante una columna de afinidad.
- Un sitio de ruptura para la enterokinasa (EK) en caso de que se necesite eliminar la cola de fusión.
- Cepa receptora: *Escherichia coli* XL1 Blue MRF'.

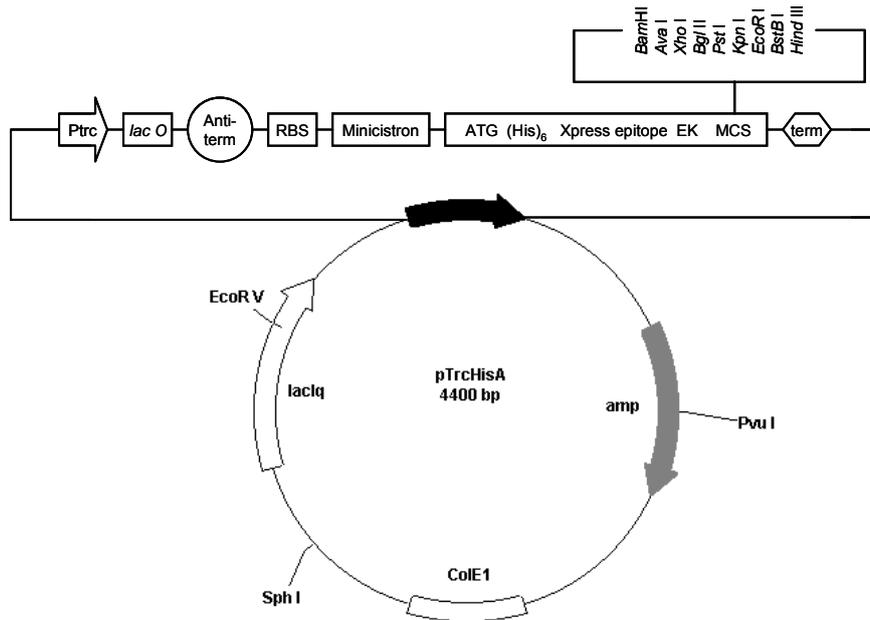


Figura 3.1 Plásmido pTrcHisA

3.2.2 Plásmido pQE-40

Plásmido comercial de bajo número de copias (*low copy plasmid*) de QIAGEN (figura 3.2). Éste plásmido fue extraído a partir de una cepa de *E. coli* XL1 Blue, la cual se utilizaba para propagarlo. Entre sus características más resaltantes destacan:

- Posee el promotor del fago T5 (reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli*) y dos secuencias operadoras *lac* para una mayor superficie de unión del represor y así, asegurar una represión eficiente de la transcripción.
- Un sitio de unión a ribosomas RBSII de alta tasa de traducción.
- Una secuencia 6xHis-tag en el extremo 5' del sitio de clonaje múltiple (MCS).
- Dos terminadores de transcripción fuertes: t_0 del fago lambda y T1 del operón *rrnB* de *E. coli*.
- Un gen *bla* (β -lactamasa) que le confiere resistencia a ampicilina.
- Un origen de replicación ColE1.
- Cepa receptora: *E. coli* M15.

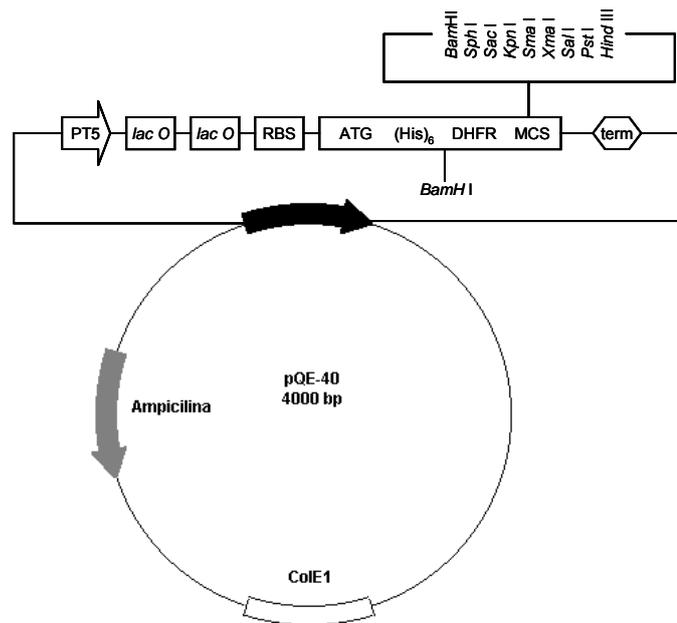


Figura 3.2 Plásmido pQE-40

3.2.3 Plásmido pREP-4

Contiene el gen represor *lacI^q*, el cual produce altos niveles del represor *lac*, y un gen de resistencia a kanamicina. Utilizado para reprimir la transcripción del plásmido pQE-40:

- Contiene el gen represor *lacI^q*, el cual produce altos niveles del represor *lac*, y un gen de resistencia a kanamicina.
- Utilizado para reprimir la transcripción de genes clonados en el plásmido pQE-40.
- Cepa receptora: *E. coli* M15.

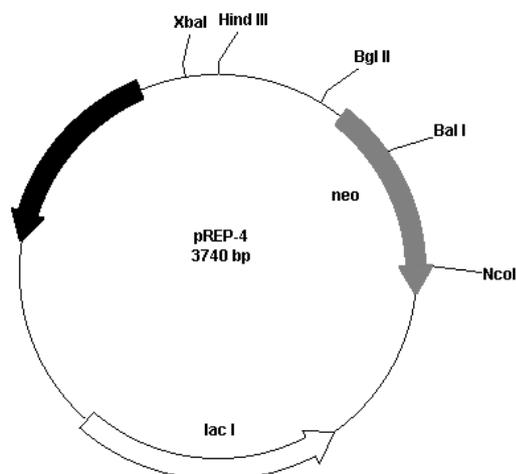


Figura 3.3. Plásmido pREP-4

3.2.4 Plásmido pBR322

Vector de clonación que contiene (figura 3.4):

- Replicón *rep* responsable para la replicación del plásmido en *E. coli*.
- Gen *rop*: codifica para la proteína Rop, la cual promueve la conversión de complejo inestable RNAI – RNAII en un complejo estable. Sirve también para disminuir el número de copias.
- Genes de resistencia a antibióticos (*bla* – *tet*).

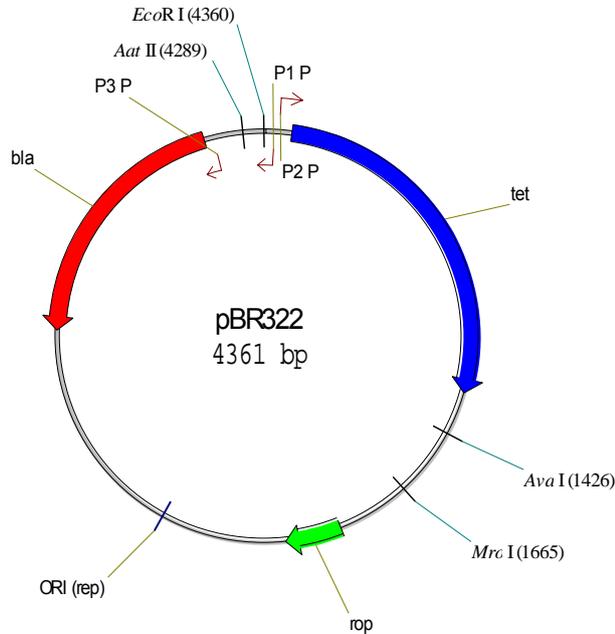


Figura 3.4. Plásmido pBR322

3.2.5 Plásmido pUC18

Plásmido artificial derivado del plásmido pBR322. Se utiliza en experimentos de clonación para transformar células DH5 α de *E. coli*. Características (figura 3.5):

- Marcador de selección: *lacZ* y *bla*.
- *Polylinker* artificial dentro del gen *lacZ*.

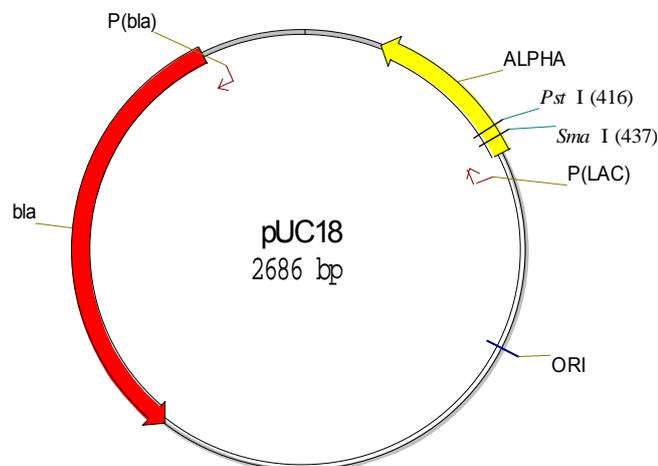


Figura 3.5. Plásmido pUC18

3.3 PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA *KNOCKOUT* DIRIGIDO DE GENES EN *E. coli*

3.3.1 Plásmido pKD46 (*Red helper plasmid*) y sistema *Red*.

Plásmido de bajo número de copias construido por Datsenko (Datsenko and Wanner 2000). Se caracteriza por poseer un replicón sensible a temperatura (para permitir su posterior eliminación de las cepas transformantes) y tener clonado el sistema *Red* bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (P_{araB}), de forma de prevenir recombinación en condiciones de no inducción. El sistema *Red* incluye tres genes: γ , β , *exo* cuyos productos son *Gam*, *Bet* y *Exo* respectivamente. *Gam* inhibe la exonucleasa V del complejo de recombinación RecBCD del hospedero, de forma que *Bet* y *Exo* puedan acceder a los extremos del DNA para promover la recombinación. Además, este sistema incluye el terminador nativo tL3 *downstream* de *exo*.

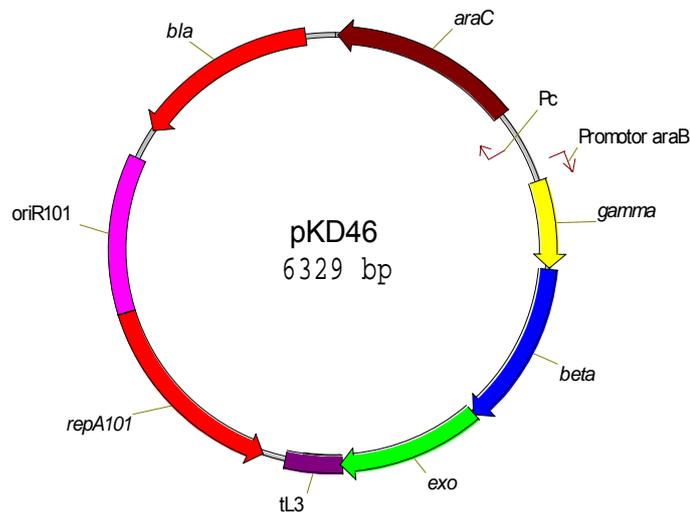


Figura 3.6. Plásmido pKD46

3.3.2 Plásmido pKD32

Plásmido molde utilizado para generar por PCR el fragmento P1P4. Posee un gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por sitios FRT (*FLP Recognition Target*), los cuales serán reconocidos por la FLP recombinasa para la posterior escisión del cromosoma bacteriano (figura 3.7).

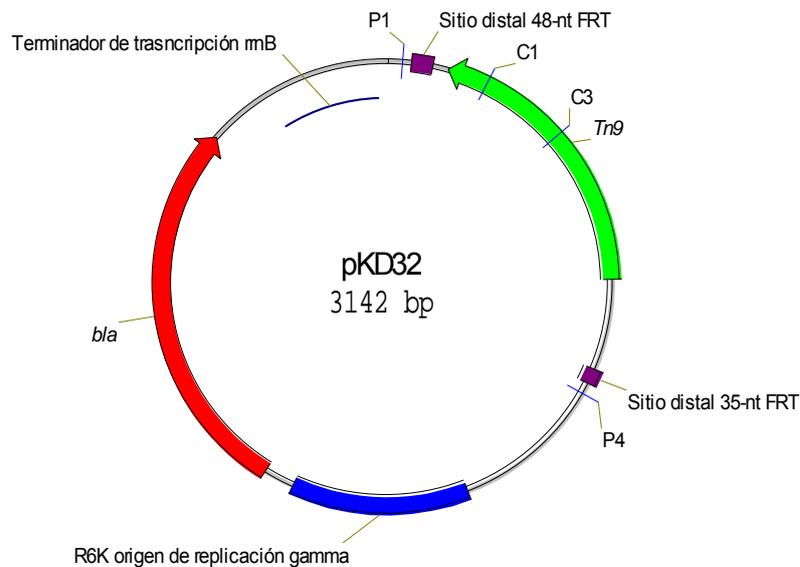


Figura 3.7. Plásmido pKD32

3.3.3 Plásmido pCP20 (*FLP helper plasmid*)

Plásmido resistente a ampicilina y cloramfenicol ($Amp^r - Cm^r$) construido por Cherepanov (Cherepanov and Wackernagel 1995). Este plásmido posee un replicón sensible a temperatura y además, un gen que codifica la enzima FLP recombinasa bajo el control de un promotor inducible por temperatura. La secuencia de este plásmido no se encuentra introducida en ninguna base de datos, de forma que no se conoce su estructura concreta.

3.4 CONSERVACIÓN Y MANIPULACIÓN DE LAS CEPAS

Para asegurar la integridad de las cepas se mantienen glicerizadas (*Cryo-billes*, Ref: AEB400100; AES Laboratoire – Francia) a $-80^{\circ}C$. Éstos se renuevan periódicamente en la medida que se necesiten a partir del glicerinado original realizando un único cultivo en medio LB con los antibióticos correspondientes según el protocolo descrito en el punto 3.5

3.5 CULTIVOS A PARTIR DE GLICERINADOS

- En condiciones estériles, se transfiere un disco del glicerinado conservado a $-80^{\circ}C$ a un Erlenmeyer de 100 ml de capacidad que contenga 15 ml de medio LB suplementado con antibióticos.
- Se incuba el cultivo a $37^{\circ}C$, 250 rpm durante 18 h aproximadamente.

- c. El cultivo obtenido se utiliza como pre-inóculo para los estudios de crecimiento y expresión, o bien, para la preparación de nuevos glicerizados.

3.5.1 Preparación de glicerizados

- a. En condiciones estériles, se adicionan 500 µl de un cultivo obtenido como se describió en el punto anterior a un tubo de *Cryo-billes*.
- b. Se homogeniza por inversión suave y se descarta el máximo de la solución sobrenadante.
- c. Se conserva a -80°C .

3.6 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

En este trabajo se han empleado algunas técnicas básicas de la tecnología del DNA recombinante. Los protocolos se encuentran descritos en manuales de laboratorio (Sambrook et al. 1989) y en las instrucciones de las casas comerciales de kits específicos. A continuación se exponen los procedimientos y métodos empleados.

3.6.1 Extracción de DNA plasmídico

3.6.1.1. Técnica de Miniprep (QIA prep[®] Miniprep Kit, QIAGEN)

El aislamiento del DNA plasmídico es una técnica esencial para la construcción de nuevos clones, así como para el análisis de clones recombinantes. En el presente trabajo se ha utilizado un kit comercial que se fundamenta en la lisis alcalina de células bacterianas, seguido de una adsorción del DNA a la sílica en presencia de una alta concentración de sales. El procedimiento consta de 2 etapas:

a) *Lisis alcalina de las bacterias*

Las bacterias son lisadas bajo condiciones alcalinas con una solución que posee dodecil sulfato sódico (SDS) y NaOH en presencia de RNAsa A. El SDS solubiliza los fosfolípidos y componentes proteicos de la membrana celular, conduciendo a la lisis y liberación de los componentes celulares, mientras que las condiciones alcalinas desnaturalizan el cromosoma y los plásmidos, así como de las proteínas. El tiempo de lisis optimizado permite una liberación máxima del DNA plasmídico sin liberar el DNA cromosómico. El lisado es subsecuentemente neutralizado con una solución de acetato de potasio y ajustado a condiciones de unión de alta fuerza iónica. En este paso, el DNA plasmídico vuelve a renaturalizarse rápidamente y permanece en solución, mientras que la mayor

parte del DNA cromosómico, restos celulares y proteínas precipitan junto con el SDS, el cual forma una sal insoluble con el potasio.

b) Adsorción y elución del DNA plasmídico.

Después de la lisis alcalina, los lisados crudos centrifugados son cargados a tubos-filtros conteniendo membranas de sílica gel que permiten la adsorción selectiva del DNA plasmídico a una elevada concentración de sales. Los componentes celulares desnaturalizados son eliminados por filtración, mientras que el DNA plasmídico es posteriormente recuperado eluyéndose con una solución tampón baja en sales.

Se siguió el procedimiento descrito por la casa comercial.

3.6.2. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se basa en la separación de fragmentos de DNA sometidos a un campo eléctrico en presencia de una malla (polímero de agarosa) que dificulta la migración hacia el ánodo.

La técnica de separación de moléculas o fragmentos por electroforesis en geles de agarosa permite no solo identificar fragmentos de DNA, sino también obtenerlos para posteriores operaciones. La separación del DNA depende de varios parámetros, tales como la longitud de DNA, su conformación estructural, el tamaño del poro del gel y la intensidad de la corriente aplicada. La carga neta negativa del DNA permite su migración en un campo eléctrico hacia el ánodo a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Así, mientras más pequeña es una molécula de DNA, más fácilmente migrará a través del gel. La separación simultánea de un marcador de peso molecular conocido permite establecer, por comparación del patrón de bandas, el peso molecular de una muestra. Una misma molécula de DNA puede presentarse en tres formas diferentes: circular enrollada, circular relajada y lineal. La forma relajada es la más lenta en velocidad de migración y la superenrollada, la más rápida.

Materiales

- Agarosa (grado electroforesis, Gibco BRL ref.: 15510-019)
- Tampón de electroforesis TAE (1X), pH 8.1. Almacenado a temperatura ambiente.

Componente	Concentración
Tris base	40 mM
Acido acético	20 mM
EDTA	1 mM

- Bromuro de etidio (Bioprobe): 10 mg ml⁻¹ almacenado a 4 °C y envuelto en papel plata para protegerlo de la luz. El bromuro de etidio es un agente mutágeno y conviene manipular los geles y las soluciones que lo contengan con guantes, así como recoger los residuos y tratarlos adecuadamente.
- Marcador de peso molecular de DNA: 1 Kb DNA Ladder (GIBCO). Para fragmentos de DNA lineales de doble hebra entre 500 bp y 12 Kb.
- Tampón de carga:

Componente	Concentración
Glicerol	30 % (v/v)
Azul de bromofenol	0.25 % (p/v)
Xilen cianol FF	0.25 % (p/v)

Procedimiento

- a. Pesar 0.4 g de agarosa y disolverla en 50 ml de tampón TAE (1X). El gel al 0.8 % permite separar fragmentos de DNA lineales entre 0.5 y 7 kb.
- b. Fundir la agarosa en un horno de microondas, agitando varias veces, evitando que llegue la mezcla a burbujear.
- c. Añadir bromuro de etidio en la proporción 1 µl: 5 ml de solución de agarosa.
- d. Preparar el molde y los espaciadores para el gel de agarosa. Cuando la solución se encuentra a 50°C, agregarlo al molde y esperar a que gelifique.
- e. Retirar el espaciador para dejar libres los bolsillos donde se cargarán las muestras.
- f. Añadir tampón TAE (1X) hasta cubrir toda la superficie del gel y agregar bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg ml⁻¹
- g. Cargar las muestras y marcadores de peso molecular en los bolsillos del gel. Para preparar las muestras y marcadores, se diluyen 1:6 con tampón de carga. Antes de cargar las muestras, se recomienda hacer un pulso de 1 seg. de centrifugación para homogeneizar los componentes.
- h. Una vez cargadas las muestras en el gel, se aplica un voltaje constante. Se deja correr la electroforesis hasta que el colorante del tampón de carga haya recorrido 2/3 del gel.
- i. Las bandas de DNA se pueden visualizar mediante un transiluminador UV (302 nm) empleando protecciones oculares adecuadas.

3.6.3 Extracción de las bandas de DNA de los geles de agarosa

Para recuperar un fragmento de DNA separado electroforéticamente, se ha empleado el kit comercial QIAquick™ Gel Extraction de QIAGEN. Esta técnica posee 4 etapas, las cuales incluyen:

- Solubilización del fragmento del gel que contiene el DNA de interés en una solución tampón.
- Filtración y eliminación de contaminantes. En esta etapa, el DNA es absorbido a la membrana de sílica en presencia de alta concentración de sales, mientras que el resto de los contaminantes pasan a través de la columna
- Lavado de la columna para eliminar eficientemente las impurezas.
- Elución de DNA con una solución tampón Tris.HCl 10 mM, pH 8.5 o con agua.

Procedimiento

Se siguió el procedimiento descrito por la casa comercial.

3.6.4 Modificaciones enzimáticas del DNA

a) Restricción enzimática

Las endonucleasas de restricción son enzimas que hidrolizan el DNA de doble hélice en posiciones específicas de su secuencia. Las concentraciones de enzima, DNA, tampón, fuerza iónica, temperatura y tiempo de reacción dependen en cada caso de la enzima y de la aplicación específica. Una unidad de enzima de restricción se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir completamente 1 µg de DNA en 60 min en condiciones óptimas.

En este trabajo se han empleado endonucleasas de restricción comerciales de la casa Fermentas, y que se detallan en la siguiente tabla:

Enzima	Especificidad de corte 5' – 3'
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Aat</i> II	GACGT↓C
<i>Ava</i> I (<i>Eco</i> 88I)	C↓PyCGPuG
<i>Mro</i> I (<i>Kpn</i> 2L)	T↓CCGGA
<i>Sma</i> I	CCC↓GGG
<i>Sa</i> I	G↓TCGAC

Protocolo general de digestión

Componente	Volumen
DNA	8.5 μ l
Tampón de restricción (10X)	1.0 μ l
Enzima	0.5 μ l

- Se incuba la mezcla de reacción durante una hora a la temperatura recomendada para la enzima específica.
- El DNA digerido se emplea luego para electroforesis en gel de agarosa.

b) Ligación del DNA

La ligación de fragmentos de DNA es una técnica utilizada para unir fragmento de DNA (insertos) a plásmidos. La enzima empleada para esta reacción es la T4 DNA ligasa de Fermentas, la cual cataliza la unión de extremos cohesivos o romos de DNA de doble hebra con los grupos 3'-hidroxi y 5'-fosfato libres.

Materiales

- Tampón de ligación 10X: 400 mM Tris.HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 100 mM DTT. Almacenado en alícuotas a -20°C.
- Ligasa T4: 20 mM Tris.HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50 % (p/v) glicerol, 0.1 mM EDTA.

Procedimiento para extremos cohesivos

Componente	Volumen (10 μ l)
Plásmido	50 – 400 ng
Inserto/vector	3:1
Tampón de ligación (10X)	1 μ l
T4 DNA ligasa	0.5 μ l

- Incubar toda la noche a 16°C.
- Inactivar por calor (65°C x 10 min)
- Transformar directamente células competentes.

3.6.5 Transformación por electroporación

Método de transformación bacteriana que consiste en la administración de pulsos rápidos de una corriente eléctrica de gran voltaje a fin de producir poros transitorios en la membrana plasmática y volverla permeable al ingreso de un DNA recombinado.

Preparación de *E. coli* competentes para electrotransformación

- a. Se inocula una colonia aislada del microorganismo en 100 ml de medio LB. Se incuba a 37°C y 200 rpm hasta que la $DO_{600\text{ nm}}$ llegue a 1.0 (aproximadamente 6-7 horas).
- b. Trasvasar el cultivo a un tubo estéril de polipropileno y centrifugar a 7000 rpm por 5 min a 4°C.
- c. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de glicerol 10 % (v/v) frío y estéril. Trasvasar la suspensión a un tubo Eppendorf estéril. Es importante que la solución de glicerol sea preparada con agua calidad MiliQ.
- d. Centrifugar a 12000 rpm por 1 min a 4°C.
- e. Descartar el sobrenadante y lavar nuevamente las células con glicerol frío. Repetir esta operación 5 veces. Para la suspensión final, agregar 0.5 ml de glicerol frío para incrementar la concentración de células final.
- f. Almacenar la suspensión anterior en alícuotas de 50 μ l en tubos Eppendorfs estériles y congelar a -70°C. Bajo estas condiciones, las células se mantienen competentes, aunque la eficiencia de la transformación decae ligeramente con el tiempo.

Transformación

- a. En un tubo Eppendorf estéril con células competentes se inocula entre 0.5 – 1.5 μ l de la mezcla de ligación inactivada y se deja 1 min en hielo.
- b. Transferir la mezcla anterior a una cubeta de electroporación (fría) y trasladarla a la cámara de electroporación.
- c. Condiciones del electroporador y descarga: $V = 2500\text{ v}$; $C = 25\ \mu\text{F}$; $R = 200\ \Omega$.
- d. Se añaden inmediatamente 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incuba a 37 °C por 1 h.
- e. Se siembran diferentes cantidades del cultivo en placas de Petri con medio selectivo para el plásmido en cuestión y se incuban invertidas a 37°C por 18 h. Es importante no dejar las placas más de 18 h en la estufa, ya que pueden aparecer pequeñas colonias satélites alrededor de las colonias transformadas. Esto es debido a que el antibiótico se agota, permitiendo el crecimiento de bacterias que no hayan incorporado la resistencia al antibiótico.

3.6.6 Verificación de genes clonados en pQE-40

Una vez que el gen de interés, amplificado por PCR, se encuentra clonado en el vector pQE-40, se transforman directamente células de *E. coli* M15 (pREP-4) con el producto de ligación por electroporación (apartado 3.6.6). Las células se siembran en placas con medio LB con ampicilina y kanamicina para seleccionar los transformantes. Luego, se extraen los plásmidos de los clones positivos y se digieren con endonucleasas de restricción específicas para comprobar la incorporación del gen. El plásmido, una vez verificado la presencia del inserto, se envía al servicio de secuenciación de DNA para ser secuenciado, de forma de verificar que no haya habido errores durante la amplificación del DNA. Una vez secuenciado, el gen clonado en pQE-40 se compara mediante el programa CLUSTAL W (1.82) con la secuencia fuente obtenida a partir de GeneBank para determinar el porcentaje de homología.

3.6.7 Verificación de la capacidad de expresión del plásmido recombinante

Para comprobar la eficiencia de expresión de la proteína recombinante, la cepa *E. coli* M15 transformada con el vector de expresión, se cultiva en medio LB con antibióticos (ampicilina y kanamicina). Para la inducción, se agrega IPTG (concentración final 50 μ M) a las dos horas de incubación ($DO_{600nm} = 1,5$) y se baja la temperatura de incubación a 30 °C para minimizar la posibilidad de formación de cuerpos de inclusión. Después de 6 horas de inducción ($DO_{600nm} = 4$) las células se procesan según el protocolo descrito en el punto 3.14.1.1 para estudiar las proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE. Se deben incluir cultivos controles sin adición de IPTG y se deben procesar de la misma manera que la cepa en estudio.

3.6.8 Amplificación de plásmidos

Para aquellos plásmidos cuya replicación es lenta y su concentración intracelular es baja (*low copy plasmid*), tal como el pQE-40, se emplea la técnica de amplificación para poder luego purificarlos en grandes cantidades.

Reactivos:

- Cloramfenicol 37 mg ml⁻¹

Procedimiento:

- a. Se hace crecer un cultivo de la célula con el plásmido a utilizar en medio LB con los antibióticos de resistencia correspondientes, a 37 °C, hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente $DO = 2.0$).

- b. Se agrega cloramfenicol a una concentración final de $170 \mu\text{g ml}^{-1}$. Ello tiene como objetivo impedir el crecimiento celular (por inhibición de la síntesis proteica) pero no la replicación del plásmido.
- c. Se incuba durante una noche a 37°C , 250 rpm y luego se procede a extraer el DNA plasmídico según el protocolo descrito.

3.6.9 Amplificación del DNA mediante la técnica del PCR

Para la amplificación de DNA se utilizó la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la cual consta de 3 etapas básicas:

- a) Desnaturalización del DNA molde en hebras simples por calor.
- b) Hibridación de los *primers* sobre DNA molde.
- c) Extensión del nuevo DNA.

Para ello, se siguió el protocolo estándar descrito por la casa comercial suministradora de la DNA polimerasa termoestable. En este trabajo, se utilizó la KOD HiFi DNA polimerasa de Novagen (Japón), la cual es una DNA polimerasa termoestable recombinante de *Thermococcus kodakaraensis* con actividad correctora 3'-5' exonucleasa y de alta velocidad de síntesis.

Protocolo

Para $50 \mu\text{l}$ de reacción, se adicionan a aun tubo de PCR en hielo los siguientes reactivos:

Componente	Vol (μl)
Agua milliQ	32.5
Tampón 10X	5
dNTP's 2 mM*	5
MgCl ₂ 25 mM	2
DNA molde	1
5' Primer 10 μM	2
3' Primer 10 μM	2
KOD pol (2.5 U/ μL)	0.5

*dNTP's: dATP, dTTP, dCTP, dGTP

Programa estándar del termociclador

x29	95°C	5 min	Hot Start
	95°C	15 seg	Desnaturalización
	50 - 55°C	30 seg	Hibridación ¹
	72°C	20 seg	Elongación ²
	72°C	5 min	Elongación final
	4°C	99 h	Enfriamiento

¹ La temperatura de hibridación depende de los primers diseñados. Se procura que se encuentre en el intervalo de 50 – 55°C

² El tiempo de elongación depende del tamaño del fragmento a amplificar. Para fragmentos entre 1 – 2 kb, se recomiendan 20 segundos. Para fragmentos mayores, incrementar el tiempo a 60 seg.

3.6.10 Amplificación de genes por PCR

La siguiente tabla muestra los primers diseñados para amplificar diferentes genes, así como fragmentos de DNA empleados para la construcción de plásmidos recombinantes. Las secuencias subrayadas corresponden a las dianas de restricción específicas.

Enzima (gen)	Oligo	Secuencia (5'-3')	Diana	nt	%GC
FruA (fda)	5fda	ACTTCAGGATCCATGTCTAAGATTTTTGATTTTCG	<i>Bam</i> HI	34	35.3
	3fda	ATTCATGTCGACTTACAGAACGTCGATCGC	<i>Sal</i> I	30	46.7
TagA (lacD)	5lacD	ATATTCGGATCCGTA CTTACAGAACAGAAACG	<i>Bam</i> HI	32	46.6
	3lacD	TAAGTAGTCGACCTATACTTTATCAGTCCATGGAC	<i>Sal</i> I	35	40
FucA (fucA)	5fucA	TGACGGATCCATGGAACGAAATAAACTTGCTCG	<i>Bam</i> HI	33	45.5
	3fucA	TGACAAGCTTTTACTCTTCAATTCGTAACCCATAGG	<i>Hind</i> III	36	38.9
DERA (deoC)	5deoC	ATCGTCGGATCCATGACTGATCTGAAAGCAAGCAGCC	<i>Bam</i> HI	37	51.4
	3deoC	ATGGATAAGCTTAGTAGCTGCTGGCGCTCTTACCG	<i>Hind</i> III	35	51.4
LTA (ItaE)	5ItaE	GTACGGATCCATGATTGATTTACGCAGTGA	<i>Bam</i> HI	30	43.3
	3ItaE	ATACAAGCTT TTAACGCGCCAGGAATGCAC	<i>Hind</i> III	30	46.7
SHMT (glyA)	5glyA1	ATCGAGGATCCATGATTTTTGATAAAGAAG	<i>Bam</i> HI	30	43.3
	3glyA1	AATGTGTCGACTTAATAGAGTGGGAAAGCA	<i>Sal</i> I	30	46.7

3.6.11 Secuenciación del DNA

Los genes de obtenidos por PCR se secuenciaron a través del Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC). El método utiliza el secuenciador ABI 377 de Perkin Elmer empleando los siguientes pares de primers de secuenciación:

Para genes clonados en pQE-40

Forward primer 5PT5 (reconoce 66 - 87 bp - promotor T5)

5' GAGCGGATAACAATTTTCACACA 3'

Longitud: 22 bp

%GC = 40.9

GC Tm = 46.0°C

Term Tm = 52.0°C

Reverse primer 3PQEHindIII (reconoce 773-792 bp - *upstream HindIII* del MCS)

5' CTATCAACAGGAGTCCAAGC 3'

Longitud: 20

%GC = 50.0

GC Tm = 46.7°C

Term Tm = 46.2°C

Para genes clonados en pUC-18 entre las dianas PstI y SmaI

Forward primer 5PUC18 (reconoce 377-396 bp del pUC18)

5' TTGTAAAACGACGGCCAGTG3'

Longitud: 20

%GC = 50

GC Tm = 46.7°C

Term Tm = 53.6°C

Reverse primer 3PUC18 (reconoce 455-474 bp del pUC18)

5' CAGCTATGACCATGATTACG 3'

Longitud: 20

%GC = 45

GC Tm = 44.6°C

Term Tm = 45.5°C

Los resultados se analizaron mediante el programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

3.7 KNOCKOUT DIRIGIDO MEDIANTE PRODUCTOS DE PCR

Se empleó el método publicado por Datsenko (Datsenko and Wanner 2000), el cual consta de varias etapas:

3.7.1 Amplificación del fragmento P1P4 por PCR

El fragmento P1P4 con el gen de resistencia a cloramfenicol flanqueado por sitios FRT se generó a partir del plásmido molde pKD32 empleando un par de *primers* específicos (P1-P4):

Forward primer P1 ([H1](#) + *priming site 1*)

Contiene la secuencia de homología **H1** (48 nt) del gen *glyA* de *E. coli* K-12

(H1:c2683527) y otra secuencia **P1** (20 nt) homóloga del plásmido pKD32.

5'-**ATGTTAAAGCGTGAAATGAACATTGCCGATTATGATGCCGA**ACTGTGG**GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**-3'

Reverse primer P4 (H2 + priming site 4)

Contiene la secuencia de homología **H2** (48 nt) del gen *glyA* de *E. coli* K-12 (H2: 2682274) y otra secuencia **P4** (20 nt) homóloga del plásmido pKD32.

5'-**TTATGCGTAAACCGGGTAACGTGCGCAGATGTCGAGAACTTTACCTTT**ATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'

PCR de 50 µl de reacción

Componente	Vol (µl)
Agua	32.5
Tampón 10x	5
MgCl ₂	2
dNTP's (2 mM)	5
pKD32	1
Forward primer P1 (10 pmol/µL)	2
Reverse primer P4 (10 pmol/µL)	2
KOD pol	0.5

Programa termociclador

x29	95°C	5 min	Hot Start
	95°C	15 seg	Desnaturalización
	55°C	5 seg	Hibridación
	72°C	20 seg	Elongación
	72°C	5 min	Elongación final
	4°C	99 h	Enfriamiento

- Comprobar el producto de PCR en gel de agarosa 1 %
- Purificar por columna (QIAQuick PCR purification kit) y eluir con 30 µl de tampón 10 mM Tris.HCl pH 8.0.
- Digerir la solución anterior con *DpnI* por 30 min a 37 °C. El DNA plasmídico (metilado) proveniente de *E. coli* se degradará por *DpnI*, mientras que el DNA lineal de PCR permanecerá inalterado.

Alternativamente, se pueden realizar 1-3 reacciones de PCR y combinarlas en una sola purificación por columna para incrementar la cantidad de DNA.

3.7.2 Transformación de células M15 con el fragmento P1P4 e inserción en el cromosoma bacteriano

Debido a que esta técnica requiere hacer electroporación y recombinación de DNA lineal en un solo paso, el número de colonias es generalmente bajo. Por ello, se recomienda obtener una alta densidad de células competentes.

Las cepas M15 competentes se transformaron con el plásmido PKD46 por electroporación y se sembraron en placas con medio LB con ampicilina. Se replicó una transformante en medio SOB con ampicilina y L-arabinosa (1 mM) incubándose a 30°C hasta una DO_{600nm} entre 0.6 – 1.0. Luego se concentraron por centrifugación y se lavaron 4 veces con agua MilliQ fría estéril, utilizándose inmediatamente para la transformación.

La electroporación se realiza empleando 25 μ l de P1P4 (aproximadamente 1.5 – 2 μ g DNA) y 60 μ l de células de *E. coli* M15 (pKD46) competentes frescas e inducidas. Las condiciones de electroporación son: $V = 2500$, $C = 25 \mu F$, $R = 200\Omega$, $t = 5.0$ ms. A las células electroporadas se añade 1 ml de LB inmediatamente y se incuban 1 h a 37°C con agitación. Se siembran en placas de LB con cloramfenicol (25 μ g ml^{-1}) y se seleccionan las transformantes Cm^r .

Primers de verificación de la delección del gen glyA

Los siguientes primers se utilizaron para verificar por PCR la inserción del fragmento P1P4 en el cromosoma de *E. coli* M15.

Oligo	Secuencia (5'-3')	Diana	nt	%GC
C1	TTATACGCAAGGCGACAAGG	<i>Bam</i> HI	34	35.3
C3	GTAGAAACTGCCGAAATCG	<i>Sal</i> I	30	46.7
5PglyA	ATCTTCCGGAGCCCTGCAATGTAAATGGTT	<i>Mro</i> (<i>Kpn</i> 2I)	30	46.7
3TglyA	TCGGTCTAGATGGCGCGATAACGTAGAAAG	<i>Xba</i>	30	50

3.7.3 Delección del cassette cromosómico FRT

Para la de eliminación del casete FRT (contenido en el fragmento P1P4) en el cromosoma bacteriano, se realizan los siguientes pasos:

- Se elimina el plásmido pKD46 sembrando la cepa recombinante en placas con medio LB con cloranfenicol a 40°C (el replicón de pKD46 es termosensible).

- Una vez eliminado el plásmido pKD46, se procede a eliminar el casete FRT del cromosoma bacteriano mediante recombinación sitio-específica entre los sitios FRT empleando la Flp recombinasa del plásmido pCP20. Éste es un plásmido resistente a ampicilina y cloramfenicol y posee un replicón sensible a temperatura. Además, posee el gen *flp* (Flp recombinasa) bajo el control de un promotor inducible por temperatura. La escisión del *casete* FRT, catalizada por la Flp recombinasa, se lleva a cabo transformando los clones con el plásmido pCP20, seleccionando los clones resistentes a ampicilina a 30°C, y resembrando diferentes colonias en medio LB no selectivo (sin antibióticos) a 42°C.
- Finalmente, se verifica la escisión del casete FRT en los clones que pierden la resistencia a antibióticos (cm y amp) por PCR.

3.8 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Los medios o sus soluciones componentes se esterilizaron por calor húmedo a 121°C durante 30 min. Solo en el caso de soluciones concentradas de glucosa, el tiempo de esterilización se redujo a 20 min para minimizar la caramelización de la glucosa (McNeil and Harvey 1990). Para soluciones termolábiles (antibióticos y vitaminas) y soluciones concentradas de microelementos, se empleó la esterilización por filtración con filtros de 0.22 µm (Milex-GS, Millipore).

3.8.1 Medio complejo de Luria-Bertoni (LB)

Es un medio de cultivo apto para un gran número de bacterias sin requerimientos especiales. Su composición se detalla en la siguiente tabla:

Componente	Concentración (g l ⁻¹)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

En caso de utilizarlo como medio sólido para el cultivo en placas, se agregan 15 g l⁻¹ de agar. Si se necesitan, se añaden los antibióticos adecuados una vez que la temperatura haya bajado por debajo de 50 °C.

3.8.2 Medio Definido (MD)

Es un medio mineral glucosado empleado para el cultivo de *E. coli*. La composición inicial del medio está descrita por Durany (Durany et al. 2004), utilizado para estudios de optimización de crecimiento y expresión en operación en *fed-batch* con la cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc).

En general, todos los medios definidos se prepararon a partir de soluciones stock concentradas estériles, las cuales se detallan a continuación:

- **Stock glucosa 100 g l⁻¹**. Esterilizar por calor húmedo 20 min, 121°C
- **Stock macroelementos (pH 7.3)**. Esterilizar por calor húmedo 30 min, 121°C

Componente	Concentración (g l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	17.91g
KH ₂ PO ₄	3.59 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.55 g
NaCl	2.76 g

- **Stock TES** (solución de elementos traza). Esterilizar por filtración (0.22 µM) y proteger de la luz con papel plata. La solución stock de microelementos caduca después de seis meses almacenada a temperatura ambiente.

Componente	Concentración (g l ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.443
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.042
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.865
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.159
CuSO ₄	1.546
H ₃ BO ₃	0.009
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.418
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.008
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.020

- **Stock MgSO₄·7H₂O 500 g l⁻¹**. Esterilizar por filtración (0.22 µM).
- **Stock FeCl₃ 5 g l⁻¹, citrato 6.5 g l⁻¹**. Esterilizar por filtración (0.22 µM). Cubrir con papel plata para evitar exposición a la luz.
- **Stock de fosfatos 342.6 g PO₄ l⁻¹**. Composición (g l⁻¹): K₂HPO₄, 500; KH₂PO₄, 100. Esterilizar por autoclave.
- **Stock ZnSO₄ 50 mg l⁻¹**. Esterilizar por filtración (0.22 µM).

3.8.3 Suplementos

Se preparan como soluciones concentradas para ser utilizadas en la preparación tanto de medios definidos como complejos dependiendo de su requerimiento, y a las concentraciones finales adecuadas. Todos ellos se esterilizan por filtración (0.22 μm) y se conservan en alícuotas congeladas a -20°C .

- Solución madre de ampicilina 100 mg ml^{-1} (Sigma)
- Solución madre de kanamicina 25 mg ml^{-1} (Sigma)
- Solución madre de tiamina 100 mg ml^{-1} (Fluka)
- Solución madre de IPTG 100 mM (Fluka)

3.8.4 Preparación de MD para ensayos en Erlenmeyer

La composición del medio definido empleada para estudios en Erlenmeyer, así como para la preparación de inóculo para el fermentador se preparó a partir de las soluciones stock concentradas estériles en la proporción indicada

Solución Stock	Volumen (ml)	Concentración final (g l^{-1})
Glucosa (100 g l^{-1})	4.7	9.4
Macroelementos	34.3	**
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (500 g l^{-1})	0.047	0.47
Agua destilada estéril	9.1	-
FeCl_3 (5 g l^{-1}) – Citrato (6.5 g l^{-1})	0.236	0.024
TES	0.149	**
Ampicilina (100 g l^{-1})	0.050	0.1
Kanamicina (25 g l^{-1})	0.050	0.025
Tiamina (100 g l^{-1})	0.047	0.094
Inóculo	3.5	-

** Ver soluciones stock

Soluciones stock:

Macroelementos	Concentración final (g l^{-1})
K_2HPO_4	12.3
KH_2PO_4	2.5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.8
NaCl	1.9

TES	Concentración final (mg l ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.3
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.13
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.6
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.47
CuSO ₄	4.6
H ₃ BO ₃	0.03
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.2
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.06

3.8.5 Preparación del MD para ensayos en Fermentador. Etapa discontinua de crecimiento

Se prepara a partir de la soluciones stock concentradas estériles en la proporción indicada:

Solución Stock	Volumen (ml)	Concentración final (g l ⁻¹)
Glucosa (100 g l ⁻¹)	180.0	22.5
Macroelementos	531.9	**
MgSO ₄ ·7H ₂ O (500 g l ⁻¹)	0.720	0.45
FeCl ₃ (5 g l ⁻¹) – Citrato (6.5 g l ⁻¹)	3.66	0.023
TES	2.29	**
Ampicilina (100 g l ⁻¹)	0.800	0.1
Kanamicina (25 g l ⁻¹)	0.800	0.025
Tiamina (100 g l ⁻¹)	0.800	0.1
Inóculo	80.0	-

** Ver soluciones stock

Soluciones stock:

Macroelementos	Concentración final (g l ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	11.89
KH ₂ PO ₄	2.38
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.69
NaCl	1.83

TES	Concentración final (mg l ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.1
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.12
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.45
CuSO ₄	4.4
H ₃ BO ₃	0.03
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.1
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.06

3.8.6 Preparación del MD (alimento) para ensayos en Fermentador. Etapa semicontinua de crecimiento

Se trabaja con una solución concentrada de glucosa como fuente de carbono limitante del crecimiento, conteniendo además otros nutrientes que habría de aportar en ligero exceso a su rendimiento relativo a glucosa.

Composición del alimento (g l⁻¹): glucosa, 580; MgSO₄·7H₂O, 11.6; FeCl₃, 0.6; ampicilina, 0.35; kanamicina, 0.09; tiamina, 0.4; TES, 78 ml l⁻¹. Esterilizar por calor húmedo a 121°C por 15 min antes de adicionar los suplementos.

3.9 SISTEMAS DE CULTIVO DE *E. coli*

3.9.1 Crecimiento en Erlenmeyers

Los estudios de crecimiento en Erlenmeyer se realizan en matraces de 500 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo específico (MD o LB). En condiciones de esterilidad, el medio se inocula con 3.5 ml de un pre-inóculo obtenido según el punto 3.5 (cultivo a partir de glicerizados) y se incuba a 37°C y 250 rpm. En el caso de inducción de la expresión de la proteína recombinante bajo el control del promotor T5, se adiciona IPTG durante la fase exponencial de crecimiento (DO aproximada: 1.5), disminuyéndose inmediatamente la temperatura de incubación a 30°C para minimizar la potencial formación de cuerpos de inclusión.

3.9.2 Crecimiento en Fermentador

Los estudios de crecimiento y expresión en fermentador se realizaron en un equipo Biostat® B (Braun Biotech Int.) cuyas características principales son:

- Vaso de vidrio 2 l de capacidad. Para los experimentos donde se determinó la relación DO_{600nm} y el peso seco, se utilizó un vaso de vidrio de 5 l de capacidad.
- Control de temperatura a través de una camisa de agua.
- Tapa de acero inoxidable, con conexiones para las sondas de pH, oxígeno disuelto, temperatura y nivel. Otras entradas/salidas: difusor de aire, toma de muestras, condensador de gases, multientrada (ácido, base, varios).
- Unidad de control integrada (figura 3.8). Esta unidad trabaja con una terminal de *software* Micro-DCU-system (Braun Biotech Int) que facilita el seguimiento, calibración y control de las variables del proceso: agitación, temperatura, pH y oxígeno disuelto. El equipo dispone de módulos de control del tipo *on-off*, PI, PID para cada una de estas variables.

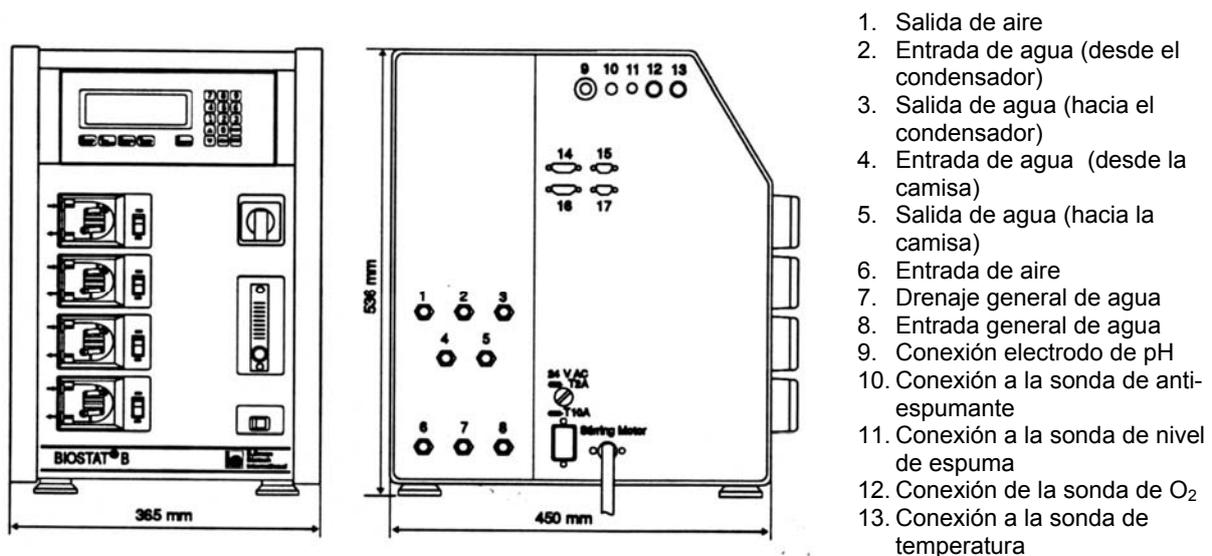


Figura 3.8 Esquema de la unidad de control integrada del equipo Biostat® B

- El caudal de aire de entrada al fermentador se controla mediante el rotámetro de la unidad de control. La difusión del aire dentro del medio de cultivo se realiza mediante un difusor tipo anilla (*sparger ring*).
- EL sistema de agitación consta de 3 turbinas de disco (Rhuston), colocándose las dos primeras dentro del medio de cultivo, espaciadas óptimamente según el

volumen de trabajo. La tercera turbina, utilizada para romper espuma, entre la superficie del medio y la superficie interna de la tapa de acero.

3.9.2.1 Accesorios para la implementación y control de la estrategia semicontinúa

Para la adición del alimento en la etapa semicontinua se ha incorporado una microbureta MICRO BU 2030 (Crison Instruments, S.A.) con una jeringa Hamilton de 2.5 ml de capacidad (Microliter™ Syringe 2.5 ml, Hamilton).

Se ha aprovechado la salida de periféricos de la unidad de control para implementar un PC que permite el registro y la visualización de los datos adquiridos por la unidad de control (figura 3.9). En este PC se implanta también el software de control de la microbureta de adición de alimento en la fase semicontinúa. Los dos programas han sido diseñados e implementados por J.C. Hurtado y O. Durany.

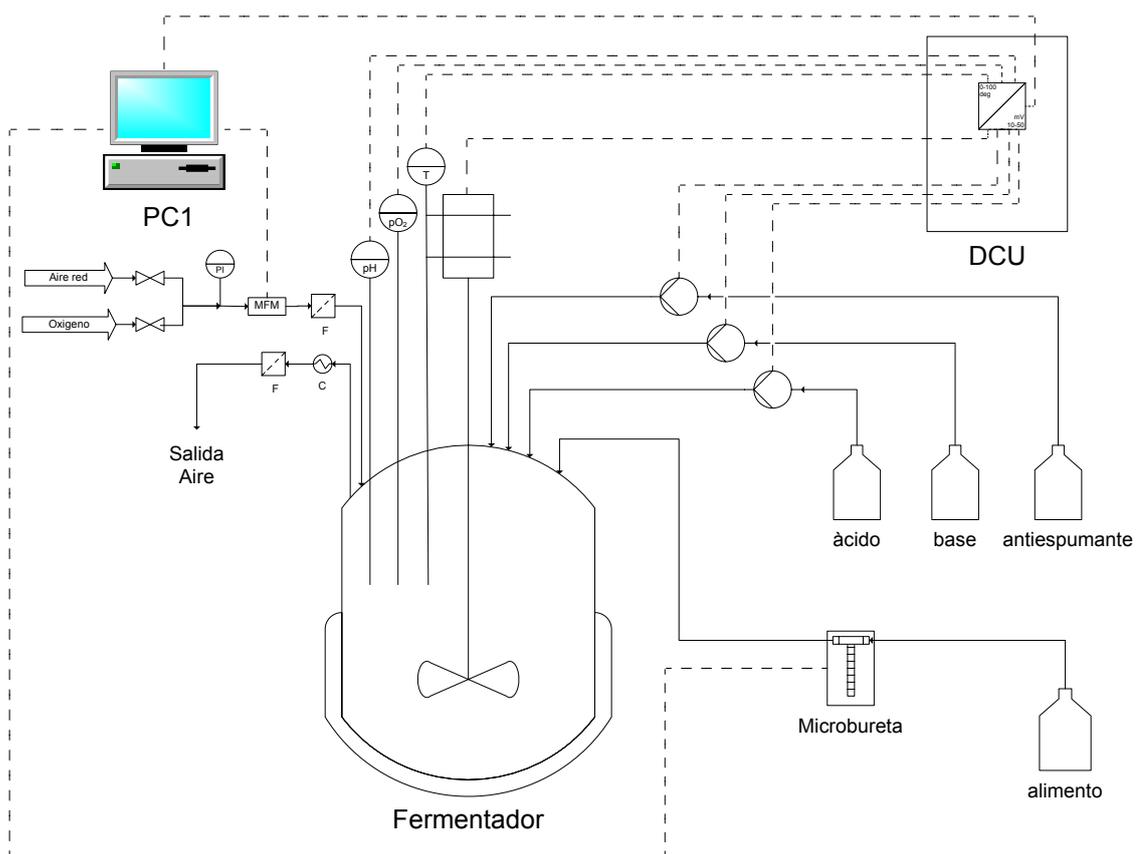


Figura 3.9 Representación esquemática del montaje experimental utilizado para efectuar los cultivos en discontinuo alimentado empleando el equipo Biostat® B. Abreviaciones: **MFM**: cabalímetro másico; **F**: filtro de aire de 0.22 μm ; **C**: condensador; **DCU**: unidad de control y registro integrada; **T**: sonda de temperatura; **pH**: sonda de pH; **pO₂**: sonda de oxígeno disuelto

3.9.2.2 Condiciones de operación

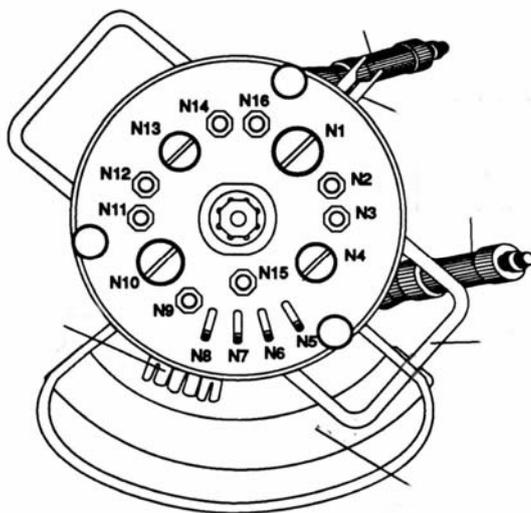
Todos los experimentos se han realizado fijando las mismas condiciones de trabajo:

- Volumen para la etapa discontinua: 0.80 l
- Temperatura: 37 °C.
- Caudal de entrada de aire: 2 l min⁻¹.
- Valor fijado (*set point*) de oxígeno disuelto: 50 %.
- Modo de agitación: Cascada, variando entre 480 y 960 rpm para evitar que el valor de oxígeno disuelto baje a valores inferiores al 20 %.
- Valor fijado (*set point*) de pH: 7.00 ± 0.05.
- Control de pH: Base NH₄OH 22,43 %; Acido: H₂SO₄ 2M.
- Antiespumante: 50 % (v/v)

3.9.2.3 Preparación del reactor

Limpieza: el interior del reactor se limpia con agua destilada para eliminar los restos de cualquier componente que se haya depositado en el mismo. Una vez limpio, se seca y se procede al el montaje.

1. Limpiar el conducto de toma de muestra con agua destilada
2. Verificar que el difusor de aire (*sparger*) no se encuentre obstruido: colocar agua destilada a presión y constatar todas las salidas de aire. En caso de obstrucción, desmontarlo y colocarlo en el sonicador.
3. Untar con silicona los o-rings negros. Cerrar el vaso de vidrio con la tapa de acero (figura 3.10), ajustando los tres tornillos simultáneamente



- N1. Condensador
- N2. Sonda de temperatura
- N3. Sonda de antiespumante (sellada)
- N4. Electrodo de pO₂
- N5. Entrada antiespumante. Conectar a la botella.
- N6. Entrada de álcali (colocar una manguera y sellarlo con una pinza). Se pueden interconectar las mangueras que conectan N6-N7
- N7. Entrada del ALIMENTO (para *fed-batch*)
- N8. Entrada de INOCULO. Colocar una manguera hacia un frasco de 200 ml vacío. Posteriormente, se utilizará como entrada de ácido
- N10. Tornillo de alimentación
- N12. Muestreador
- N13. Electrodo de pH
- N14. Entrada de aire

Figura 3.10 Esquema de la tapa de acero del fermentador Biostat® B

6. Introducir los macroelementos en el vaso. En caso de que el stock esté estéril, tomar el volumen que corresponda en un matraz dentro de la campana de flujo laminar y luego introducirlo en el vaso del fermentador.
7. Conectar el cable de la sonda de temperatura y el cable de la sonda de pH al equipo.
8. Calibrar la sonda de pH (debe guardarse con KCl 3 M). Calibración con 2 puntos (pH 7.00 y 4.00). Para ello, se utiliza el menú de la unidad de control.
9. Desconectar el cable de la sonda de pH y colocar el electrodo en el vaso (N13) y el tapón rojo para protegerla durante el autoclavado
10. Sonda de O₂: chequear el electrolito. Para ello, desenroscar el extremo y llenarla con la solución electrolito sin que queden burbujas en el interior y sin tocar la membrana. Lavar la sonda con agua (para remover el exceso de solución electrolito) y ajustar en la tapa del vaso con llave (N4). Se procederá a calibrarla después de autoclavar.
11. Sellar la salida de los filtros y envolver en papel plata para proteger.
12. Esterilizar por autoclave (20 min, 121°C). Debe estar semi-abierta la tuerca N10 para evitar que se sobrepresione el interior del vaso.
13. Una vez autoclavado, cerrar las botellas y la tuerca de alimentación N10. Enfriar.
14. Llevar a la campana y adicionar soluciones stock de glucosa, FeCl₃, microelementos, MgSO₄, vitaminas y antibióticos.
15. Conectar la entrada y salida del agua de la camisa del vaso al controlador, al igual que las del condensador de gases de la tapa, el cable de la sonda de temperatura y el de la sonda de pH y O₂.
16. Colocar el motor sobre el eje de la tapa
17. Dejar 12 horas para que la sonda de O₂ se polarice
18. Calibrar la sonda de O₂. Se debe hacer a la temperatura de operación (37°C). Para ello, debe estar abierta la llave del agua y encender el control de temperatura del BIOSTAT. Para que la temperatura se estabilice, se debe encender el control media hora antes.

3.9.2.4 Preparación del inóculo

El medio de cultivo del reactor se inocula en una relación 1:10 respecto al volumen final de medio. El inóculo se obtiene mediante un cultivo de *E. coli* en Erlenmeyer con medio MD (12 horas de crecimiento; DO_{600 nm}: 5 - 6)

3.9.2.5 Procedimiento para inocular

1. Verificar que todas las conexiones de agua y aire se encuentren funcionando
2. Verificar que la agitación y temperatura del vaso esté funcionando
3. Trasvasar en campana 80 ml de inóculo a un frasco de 200 ml estéril.
4. En condiciones de esterilidad (llama), intercambiar un frasco vacío estéril conectado a N8 por el frasco que contiene el inóculo.
5. Conectar el aire de red al filtro de aire del frasco que contiene el inóculo para crear presión y trasvasar el contenido al interior del vaso
6. Una vez finalizado, intercambiar los frascos por el de H₂SO₄ en condiciones de esterilidad (llama).

3.9.2.6 Procedimiento para toma de muestras

El fermentador incorpora un sistema de extracción de muestras, el cual consta de una cánula de extracción y un depósito donde queda recogida. La muestra se retira en condiciones estériles a la llama.

1. Encender la llama del mechero Bunsen
2. Abrir la pinza que cierra la manguera que conecta N12 con el tubo muestreador.
3. Con los dedos, doblar la manguera de salida de aire del fermentador para crear presión en el vaso.
4. Dejar que pasen aproximadamente 6 ml de muestra.
5. Desaprisionar la manguera de salida de aire del fermentador
6. Desenroscar el tubo y trasvasar 2 ml a tubo estéril (si se van a realizar contajes viables) y el resto a otro tubo (no estéril).
7. Enroscar el tubo nuevamente.
8. Abrir la llave de aire de red y conectar la manguera a la salida del filtro (0.22 μ M) del tubo muestreador. Esto impulsará la muestra contenida en la manguera al interior del vaso nuevamente
9. Cerrar con pinza la manguera N12 – tubo muestreador.
10. Dispensar 1 ml de muestra del tubo no estéril (previamente mezclado por inversión) en tubos Eppendorfs para:
 - ➔ Determinación de biomasa por turbidimetría (DO_{600nm}).
 - ➔ Análisis de actividades enzimáticas. Colocar la suspensión de células contenidas en el tubo en hielo y congelar inmediatamente a -20°C para su posterior análisis según 3.14.1.1.

- Análisis de glucosa, ácidos orgánicos, amonio, y fosfatos. Para ello, se centrifuga el tubo a 12000 rpm 5 min y se separa el sobrenadante. El *pellet* celular se puede congelar a -20°C en caso de necesitarse.

3.9.2.7 Esterilización química de la microbureta

Antes de comenzar el cultivo semicontínuo, se procede a una esterilización química de la microbureta. Para ello, se realizan los siguientes pasos utilizando el programa de control, con adiciones de 25 ml de cada una de las siguientes soluciones según la secuencia:

- Agua (no es necesario que sea estéril)
- NaOH 1M
- HCl 1M
- Agua estéril
- Sustituir el frasco con agua por alimento (complementado con antibióticos y vitaminas)
- Conectar el extremo de la manguera de silicona al puerto N8.

3.9.2.8 Etapa de cultivo semicontínuo (*fed-batch*)

1. Una vez que se acaba la glucosa de la etapa discontinua (*batch*), *E. coli* utiliza como fuente de carbono el ácido acético producido. Por ello, se observa que el pH incrementa de 6.95 a 7.05. En este momento, se debe comenzar la alimentación controlada al reactor.
2. La concentración de glucosa en el alimento debe haber sido medida por HPLC previamente, para luego introducir el valor de su concentración en el programa de control de la microbureta.
3. Cuando la máxima agitación no es capaz de mantener una concentración de oxígeno disuelto ($p\text{O}_2$) del 50% suministrando aire de red, se debe enriquecer el aire con oxígeno. Para la concentración de glucosa de la etapa de crecimiento discontinuo, el aire de red es suficiente. Sin embargo, se recomienda cambiar a O_2 puro una vez iniciada la etapa semicontinua (*fed-batch*) para facilitar el monitoreo y control de las variables del cultivo.
4. Programa de control de la microbureta. Ver punto anexo.

3.9.2.9 Finalización de la fermentación

1. Extraer la última muestra. Alicuotarla para las mediciones correspondientes y anotar el volumen extraído
2. Detener la adición de alimento por la microbureta.

3. Detener desde el controlador la adición de base, ácido, agitación, temperatura
4. Tomar los siguientes datos en la hoja de registro de fermentación: volumen del reactor (dado por el programa) y volumen de base añadido (dado por el controlador).
5. Cerrar el suministro de aire, oxígeno y agua
6. Desconectar las sonda de pH, O₂ y termostato. Sacar las sondas, limpiarlas con abundante agua y guardarlas. Guardarlas en sus cajas respectivas.
7. Trasvasar el contenido del vaso a una bureta y medir el volumen.
8. Una fracción del cultivo se separa para la determinación del peso seco. El resto se trasvasa a envases de plástico para congelar a -20°C si se requieren para la obtención de aldolasa.
9. Lavar el vaso y la tapa con jabón neutro. Enjuagar con agua destilada.
10. Limpiar la microbureta con agua (25 ml) → Etanol 50 % v/v (25 ml).

3.10 IMPLEMENTACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE ALIMENTACIÓN EXPONENCIAL PARA EL CRECIMIENTO DE *E. COLI*

Para el equipo utilizado se dispone de una microbureta electrónica destinado a la adición del alimento acoplado a un programa de control basado en la estrategia de adición exponencial utilizada. El programa de adición se basa en la ecuación 15, que permite estimar el volumen total de alimento que se habría de introducir al vaso de fermentación a un tiempo determinado de manera de mantener el crecimiento del microorganismo en las condiciones de trabajo deseadas.

Esta estimación de volumen se realiza de forma discontinua en el tiempo y se transmite en una orden hacia el equipo de adición. Fijando un incremento de tiempo adecuado entre las sucesivas estimaciones, se trabaja con un perfil escalonado de adición y que simula el perfil continuo de adición exponencial ideal del modelo.

En cualquier caso, el programa se basa en dos ideas fundamentales:

- a) Control de la adición de alimento en base al perfil teórico prefijado.
- b) Capacidad de corrección de las posibles desviaciones del modelo teórico mediante la actualización de los valores experimentales (X_i ; V_i) obtenidos cada vez se toma una muestra de cultivo y se analiza.

La expresión matemática que determina el perfil de alimentación a lo largo de la etapa alimentada de los cultivos se deduce a partir de los siguientes balances:

Balance de sustrato

A partir del balance de sustrato en un reactor discontinuo alimentado:

$$E + G = S + A \quad (1)$$

Ya que no hay salida del medio durante el cultivo:

$$Q_e \cdot S_0 - r_s \cdot V = 0 + \frac{d(S \cdot V)}{dt} \quad (2)$$

Considerando que el cultivo está limitado por la alimentación de la fuente de carbono, podemos aproximar que la concentración de glucosa en el interior del reactor es cero. Así consideramos que el sistema se encuentra en estado pseudo estacionario con respecto al sustrato y por consiguiente, el término de acumulación es cero

$$Q_e \cdot S_0 = r_s \cdot V \quad (3)$$

La velocidad de consumo de sustrato viene dado por:

$$r_s = \left(\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu + m_{SX} \right) \cdot X \quad (4)$$

Considerando el mantenimiento cero, y sustituyendo en la ecuación (3), se obtiene

$$Q_e \cdot S_0 = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu \cdot X \cdot V \quad (5)$$

Balance de biomasa

Este proceso se caracteriza por la entrada de sustrato con la correspondiente variación de volumen, ya que no hay ninguna corriente de salida. El balance de materia para la biomasa será:

$$E + G = S + A \quad (6)$$

Las células van creciendo y acumulándose en el interior del reactor a medida que pasa el tiempo. No hay entrada ni salida de biomasa durante el cultivo:

$$0 + r_x \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (7)$$

La velocidad de generación de la biomasa se puede simbolizar como la velocidad específica de crecimiento (μ) para la cantidad de biomasa:

$$r_x = \mu \cdot X \quad \left[\frac{g_{PS}}{l \cdot h} \right] \quad (8)$$

Sustituyendo esta última ecuación (8) en el balance de materia (7), se obtiene la siguiente expresión matemática:

$$\mu \cdot X \cdot V = \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (9)$$

Reordenando en integrando:

$$X_{i+1} \cdot V_{i+1} = X_i \cdot V_i \cdot \exp(\mu \cdot \Delta t) \quad (10)$$

Luego, sustituyendo (9) en (5)

$$Q_e \cdot S_0 = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (11)$$

Considerando constantes S_0 y $\frac{1}{Y_{XS}}$, reordenando y considerando que se quiere calcular el volumen a adicionar entre t_i y t_{i+1}

$$S_0 \int_{t_i}^{t_{i+1}} Q_e \cdot dt = \frac{1}{Y_{XS}} \int_{X_i V_i}^{X_{i+1} V_{i+1}} \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (12)$$

Ya que la glucosa no se alimenta de manera continua, la integral $S_0 \int_{t_i}^{t_{i+1}} Q_e \cdot dt$ se tendrá que calcular como la \sum de toda la glucosa consumida desde t_i hasta t_{i+1} . Integrando la expresión (12) queda:

$$S_0 \cdot V_A(t_i) = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot (X_{i+1} \cdot V_{i+1} - X_i \cdot V_i) \quad (13)$$

Sustituyendo $X_{i+1} \cdot V_{i+1}$ (10) en (13)

$$V_A(t_i) = \frac{1}{S_0 \cdot Y_{XS}} \cdot [X_i \cdot V_i \cdot \exp(\mu \cdot \Delta t) - X_i \cdot V_i] \quad (14)$$

Sacando factor común, se puede calcular el volumen de alimento a adicionar:

$$V_A(t_i) = \frac{1}{S_0 \cdot Y_{XS}} \cdot X_i \cdot V_i \cdot [\exp(\mu \cdot \Delta t) - 1] \quad (15)$$

El perfil de adición depende de la concentración de sustrato en el alimento, la velocidad específica de crecimiento deseada, los parámetros del modelo de consumo de glucosa, de la cantidad de células presentes en el sistema en cada momento y del tiempo del cultivo. De esta forma, fijando un incremento de tiempo constante, Δt , se actualiza el volumen necesario a adicionar $V_A(t_i)$ desde la última actualización para mantener el crecimiento exponencial. Para cada Δt se determina el volumen necesario a adicionar y para ello, se toman los valores de X_{i+1} y V_{i+1} correspondientes a la actualización anterior como valores iniciales de las variables (X_i, V_i)

En el siguiente diagrama de flujo (figura 3.11) se esquematiza el funcionamiento del programa:

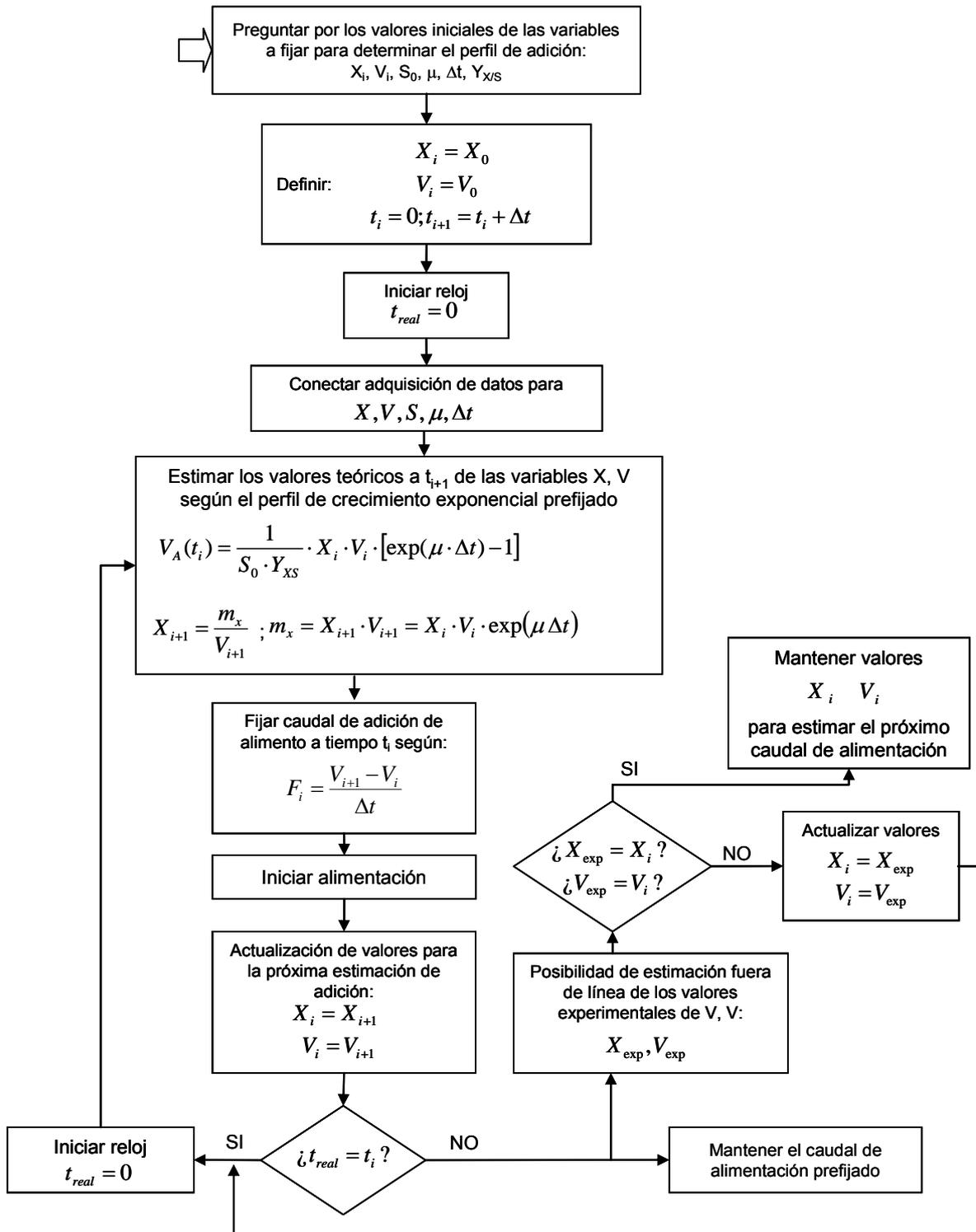


Figura 3.11 Diagrama de flujo del programa de control de la microbureta. Se presenta de manera esquemática el flujo de información. Abreviaturas: μ : velocidad específica de crecimiento (h^{-1}); S_0 : concentración de sustrato en el alimento ($g_{glucosa} \cdot l^{-1}$); $Y_{X/S}$: coeficiente aparente de rendimiento biomasa/sustrato; t : tiempo (h); Δt : incremento de tiempo fijado entre estimaciones del volumen a adicionar; V : volumen de cultivo en el vaso de fermentación (l); X : concentración de biomasa en el vaso de fermentación ($g_{biomasa} \cdot l^{-1}$); $V_A(t_i)$: volumen estimado que cabe adicionar al vaso de fermentación entre t_i y t_{i+1} para mantener el crecimiento exponencial a μ constante (l); El subíndice i indica el momento actual desde el inicio de la fase alimentada. El subíndice $i+1$ indica el momento futuro para el que se prevé la necesidad de alimento para mantener el crecimiento exponencial.

3.10.1 Programa de control de la fermentación y de la microbureta

Para seguir la fermentación, se dispone de dos programas. Uno realizado en DOS que captura los datos del PC del fermentador (pH, pO₂, temperatura, agitación) y otro en Visual Basic, que controla la adición de alimento a través de la microbureta electrónica. Para iniciar el programa de adición, se deben suministrar los siguientes datos:

VOLUMEN INICIAL: Indica el volumen del vaso. Cambia de acuerdo a la cantidad de alimento que va agregando la microbureta. Sin embargo, no corrige el volumen de muestra extraído ni la base añadida. Por ello, hay que actualizar este dato cada vez que se extrae muestra.

CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO (g l⁻¹): Se refiere a la concentración de glucosa en el alimento. Se determina experimentalmente una vez preparado el alimento y se introduce el dato antes de arrancar el programa de adición.

BIOMASA (g l⁻¹): Se refiere a la concentración de biomasa en el vaso. Este dato se corrige automáticamente en función del volumen de alimento añadido. Sin embargo, hay que determinarlo experimentalmente (DO_{600nm}) y cambiarlo periódicamente, ya que no toma en cuenta las variaciones producidas por el volumen de base añadido y el volumen de muestra extraído, así como las posibles desviaciones inherentes al crecimiento del microorganismo.

RENDIMIENTO: Se refiere al rendimiento aparente determinado experimentalmente. Este valor debe calcularse y es específico para cada microorganismo.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO: se refiere a la velocidad de crecimiento teórico que se quiere obtener.

INTERVALO DE ACTUACIÓN: Se refiere al intervalo de tiempo (en horas) que la microbureta va a actuar para adicionar alimento y así, regular la μ . Un intervalo adecuado es de 30 seg (0.009 h).

DURACIÓN: Se refiere al tiempo de duración de actuación del fed-batch. Se recomienda colocar un exceso (72) y detener la captura de datos manualmente.

DETENER: Esta acción genera un archivo de MS Access con los datos de la fermentación.

SIMULACIÓN: comienza el programa de la microbureta.

3.11 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL SEGUIMIENTO DE LOS CULTIVOS

3.11.1 Determinación de la biomasa

Una suspensión celular se caracteriza por presentar un número de partículas microscópicas dispersas en un fluido. Habitualmente, los métodos utilizados para evaluar la concentración de células en la suspensión en cultivos microbianos son la medición de la densidad óptica, la determinación de peso seco celular y el recuento de células viables.

Medición de la absorbancia del cultivo ($DO_{600\text{ nm}}$)

La estimación de la concentración de la biomasa por medición de la densidad óptica (DO) se basa en la capacidad de las células de producir turbidez (debido a su tamaño) y, concomitantemente, de absorber luz de una determinada longitud de onda. El incremento en la absorbancia del cultivo es proporcional a la concentración celular y, por tanto, es un buen indicador del crecimiento. Para ello, se realizan diluciones del cultivo en agua destilada de manera que las lecturas se encuentren dentro del intervalo lineal de 0.2 – 0.9 y se miden a 600 nm contra blanco de agua destilada (Uvicon 941 Plus, Control). Los resultados se expresan en unidades de absorbancia.

Determinación del peso seco celular (PS)

El peso seco (contenido de sólidos) de las células bacterianas que se encuentran en una suspensión se obtiene por el secado de un volumen en un horno a 105°C hasta peso constante. Esta técnica es útil para grandes volúmenes de muestra, debido a que diferencias del orden de los miligramos representan el peso de un gran número de bacterias. La desventaja de este método es que componentes volátiles de la célula pueden perderse por el secado y puede existir alguna degradación. También la muestra seca puede recobrar humedad durante el pesado, principalmente si el ambiente tiene una humedad relativa alta.

- a. Se introduce un volumen de muestra conocido de caldo de fermentación y se introduce en un tubo de centrifuga previamente pesado.
- b. Se centrifuga 20 min a 5000 x g y se descarta el sobrenadante.
- c. El contenido del tubo se resuspende en agua desionizada y se centrifuga nuevamente.
- d. Se descarta el sobrenadante y se seca el tubo con el sedimento celular en una estufa a 105°C (aproximadamente 18 h).

- e. Se deja enfriar el sedimento seco tapado hasta obtener un peso constante.
- f. Conociendo el volumen inicial de muestra y el peso seco correspondiente, se puede evaluar el peso seco en gramos de peso seco por litro de cultivo ($\text{g}_{\text{PS}} \text{l}^{-1}$).

Correlación entre el peso seco celular (PS) y la densidad óptica a 600 nm

Se realizó la calibración de la cepa de *E. coli* M15 (pQErham) para poder relacionar las medidas de peso seco y densidad óptica, obteniéndose los siguientes resultados:

$$E. coli \text{ M15 (pQErham) en medio MD sin inducir (g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}) = 0.37 \times \text{DO}_{600\text{nm}} \quad (r^2 = 0.996)$$

La curva de calibración se puede consultar en el apartado 7.2.

Recuento de células viables

Para determinar el porcentaje de células viables en un cultivo se utilizó el método del conteo en placa, el cual consiste en sembrar en placas un volumen determinado de una dilución de una muestra. Para la dilución, se utiliza una solución salina (NaCl, 0.9 % p/v) estéril. Cada bacteria viable dará lugar, después de la incubación correspondiente, a una colonia de forma que el número de éstas nos permitirá estimar el número de células presentes en la muestra plaqueada. El sistema se ha realizado sembrando en superficie (extendiendo un volumen dado de muestra sobre el medio de cultivo sólido) por triplicado. Para que el sistema de recuento en placa tenga validez estadística, es necesario contar entre 30 y 300 colonias con objeto de disminuir el error de la medida.

3.11.2 Determinación de sustratos y metabolitos

En general, las mediciones se realizaron en muestras de cultivos según el siguiente procedimiento:

- Centrifugación de 1 ml de medio de cultivo a $13.000 \times g$ por 5 min en tubos Eppendorf
- Filtración por membrana de $0.45 \mu\text{m}$ (HAWP01300, Millipore)

3.11.2.1 Análisis de glucosa y ácidos orgánicos

La determinación de glucosa y ácidos orgánicos en muestras de seguimiento de crecimiento se determinaron por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC (Hewlett

Packard 1050) con una columna Aminex HPX-87H (Bioread) a 25°C acoplado a un detector de índice de refracción IR (HP 1047), fase móvil de H₂SO₄ 15 mmol l⁻¹ (pH = 3.0) y un flujo de 0.6 ml min⁻¹. Los datos del análisis se recogen y analizan mediante el software *Millenium*.

3.11.2.2 Análisis de amonio

Se utilizó un método de análisis por flujo continuo (CFA) potenciométrico (Gabriel 1996). El sistema básifica la muestra de forma de convertir el amonio en amoníaco. El amoníaco acuoso se hace difundir a través de una membrana en la célula de difusión, y es arrastrado en contracorriente por una corriente de cloruro de amonio y cloruro de potasio. Finalmente, el amoníaco es detectado a través de un electrodo combinado conectado a un potenciómetro y cuantificado por una calibración previa con tres patrones (5, 25, 50 mg NH₄⁺ l⁻¹).

3.11.2.3 Análisis de fosfatos

La concentración de fosfatos en las muestras se determinó por electroforesis capilar usando un analizador capilar de iones (Waters, QANTA 4000E) con una columna de capilar de sílica (75 μm x 60 cm) y electrolito para aniones Waters IonSelect™ High Mobility Anion Electrolyte a 20°C. Los fosfatos se cuantificaron mediante una calibración previa con K₂HPO₄ (5 – 100 mg l⁻¹). Los datos del análisis se recogen y analizan mediante el software *Millenium*.

3.11.2.4 Determinación de zinc

El sedimento celular seco obtenido en el apartado 3.11.1 (lavado con agua desionizada) se trituró manualmente con un mortero hasta homogenización. Una fracción del polvo resultante se envió al Server d'Anàlisi Química de la UAB para analizar su contenido en zinc. Para ello, la muestra sólida se analizó por duplicado digiriendo 200 mg en horno de microondas con HNO₃ concentrado, diluyendo la solución digerida con agua Milli-Q. Las determinaciones de zinc se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica de llama (aire – acetileno; rsd 1 %)

3.12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se realizaron análisis por microscopia electrónica de transmisión y de barrido para determinar la presencia de cambios morfológicos en células inducidas y no inducidas de

cultivos de *E. coli* M15 (pQErham). Para ello, las muestras frescas procedentes de cultivos se fijaban inmediatamente por 2 h a 4°C diluyéndolas en glutaraldehído 25 % (v/v), proporción 10:1 respectivamente. Luego, se lavan 3 veces con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2, almacenándose a 4°C hasta su envío al Servicio de Microscopía Electrónica de la UAB.

3.13 CALCULOS

En este apartado se presentan las bases teóricas y las herramientas utilizadas para el cálculo de algunos parámetros que ayuden a interpretar y obtener más información de los cultivos

3.13.1 Cálculo de la velocidad de crecimiento (μ)

A partir de las principales variables de seguimiento durante la fermentación, se pueden calcular las velocidades específicas de crecimiento (μ). Esta variable puede dar información muy valiosa para analizar *a posteriori* la evolución de la fermentación, para relacionarlas con el estado fisiológico del microorganismo y para la detección de cambios de comportamiento.

A continuación, se deducen cada uno de los parámetros a partir de los correspondientes balances, tanto para el cultivo discontinuo como semicontinuo.

Balance de Biomasa. Cultivo en discontinuo

A partir del balance de materia para biomasa en un reactor discontinuo:

$$E + G = S + A \quad (16)$$

El término de entrada (E) y de salida (S) son nulos ya que no se introduce ni se extrae biomasa durante el cultivo. Únicamente se genera biomasa a partir de los sustratos, acumulándose en el interior.

$$0 + r_x \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (17)$$

Reordenando los diferentes términos se obtiene:

$$r_x \cdot V = \frac{dX}{dt} \cdot V + \frac{dV}{dt} \cdot X \quad (18)$$

La expresión de la producción de biomasa se puede sustituir por su expresión dependiente de la velocidad específica de crecimiento, sin tener en cuenta la

desaparición de la biomasa a lo largo del cultivo, término que es considerado menospreciable:

$$r_x = \mu \cdot X \quad \left[\frac{g_{PS}}{l \cdot h} \right] \quad (19)$$

En un cultivo en discontinuo, el volumen no varía a lo largo del tiempo:

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (20)$$

Sustituyendo, la expresión del balance queda como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (21)$$

Finalmente, aislando la velocidad específica de crecimiento, se obtiene la expresión matemática que posibilita su cálculo:

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad [h^{-1}] \quad (22)$$

Integrado la expresión anterior:

$$\mu \cdot \Delta t = Ln \left(\frac{X_{i+1}}{X_i} \right) \quad (23)$$

La pendiente de la representación gráfica del $Ln(X)$ frente a t permite calcular la μ

Balance de Biomasa. Cultivo en semicontinuo

Este proceso se caracteriza porque la entrada de sustrato con la correspondiente variación de volumen, ya que no hay ninguna corriente de salida. El balance de materia para la biomasa será:

$$E + G = S + A \quad (24)$$

Las células van creciendo y acumulándose en el interior del reactor a medida que pasa el tiempo. No hay entrada ni salida de biomasa durante el cultivo:

$$0 + r_x \cdot V = 0 + \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (25)$$

La velocidad de generación de la biomasa se puede simbolizar como la velocidad específica de crecimiento (μ) para la cantidad de biomasa:

$$r_x = \mu \cdot X \quad \left[\frac{g_{PS}}{l \cdot h} \right] \quad (26)$$

Sustituyendo esta última ecuación en el balance de materia, se obtiene la siguiente expresión matemática:

$$\mu \cdot X \cdot V = \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad (27)$$

Aislando el valor de la velocidad específica de crecimiento

$$\mu = \frac{1}{X \cdot V} \cdot \frac{d(X \cdot V)}{dt} \quad [h^{-1}] \quad (28)$$

Reordenando la ecuación anterior e integrando

$$\mu \cdot \Delta t = Ln \left(\frac{X_{i+1} \cdot V_{i+1}}{X_i \cdot V_i} \right) \quad (29)$$

La pendiente de la representación gráfica del $Ln(X \cdot V)$ frente a t permite calcular la μ

3.13.2 Calculo de la velocidad de producción de RhuA (q_p)

Teniendo en cuenta que el sistema de promotor utilizado es muy fuerte, y que la cantidad de puntos experimentales de los que se puede disponer para buscar una expresión que defina la velocidad de producción específica de RhuA, se decidió simplificar su cálculo a la determinación de velocidades puntuales, según:

$$q_p = \frac{\Delta AE}{\Delta t} \quad \left[\frac{U \cdot g_{PS}^{-1}}{h} \right] \quad (30)$$

Donde:

$$AE = U \cdot g_{PS}^{-1} \quad \text{para un tiempo } X_i$$

3.13.3 Rendimientos

Los rendimientos son parámetros muy importantes ya que representan la eficacia de conversión de una variable respecto a la otra. Por ejemplo, el rendimiento sustrato/biomasa da la idea de la fracción de sustrato que pasa directamente a biomasa.

Se pueden calcular en un intervalo determinado de la fermentación, siendo rendimientos parciales o por el contrario, para toda la fermentación, denominándose rendimiento global.

Es importante entender que estos coeficientes no se mantienen constantes durante toda la fermentación, ya que cambian según las necesidades energéticas del microorganismo.

A continuación, se presenta la forma de cálculo de diferentes rendimientos, en todos los casos, para cultivos discontinuos o semicontinuos.

Rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$)

El rendimiento biomasa/sustrato se define como la cantidad de biomasa por unidad de sustrato consumido. Así:

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{x/s} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (31)$$

No obstante, el método usual para calcular este rendimiento es medir la cantidad de biomasa formada y de sustrato consumido para un determinado intervalo de tiempo:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \left[\frac{g_{PS}}{g_{sustrato}} \right] \quad (32)$$

3.13.4 Producción

La producción volumétrica se define como la cantidad de producto formado por unidad de volumen.

De manera similar al rendimiento, se puede calcular para un período de tiempo o para todo el cultivo, todo y que éste último es el que podría ser más útil ya que contiene una información más valiosa.

La metodología de cálculo es muy sencilla:

$$\text{Productividad volumétrica} \left[\frac{UA}{l} \right] = (\text{Actividad específica}) \left[\frac{UA}{g_{PS}} \right] \cdot (\text{Biomasa}) \left[\frac{g_{PS}}{l} \right]$$

3.13.5 Productividad

La productividad se define como la cantidad de producto formado por unidad de volumen y tiempo

De manera similar al rendimiento, se puede calcular para un período de tiempo o para todo el cultivo, todo y que éste último es el que podría ser más útil ya que contiene una información más valiosa.

La metodología de cálculo es muy sencilla:

$$\text{Productividad volumétrica} = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad \left[\frac{UA}{l \cdot h} \right]$$

Donde:

$$\Delta P = \text{Incremento de producción} \quad \left[\frac{UA}{l} \right]$$

$$\Delta t = \text{Incremento de tiempo} \quad [h]$$

3.14 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEINAS

3.14.1 Electroforesis en gel disociante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Este método permite separar muestras de proteínas en base a su tamaño (Laemmli 1970). Los geles de poliacrilamida están formados por copolimerización de monómeros de acrilamida con N,N'-metilenbisacrilamida (Bis) para formar una red tridimensional de tamaño de poro determinado. Se utiliza el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) para desnaturalizar las proteínas disociándolas en subunidades, envolviéndolas, y haciendo menospreciabile su carga eléctrica intrínseca frente a la carga aniónica que él aporta. Así, con una proporción carga/masa constante, las diferentes proteínas se separan sobre un soporte físico de poliacrilamida sometido a un campo eléctrico basándose en su peso molecular.

3.14.1.1 Preparación de las muestras

Para el seguimiento de la expresión intracelular de aldolasas recombinantes en cultivos de *E. coli*, se trabaja con muestras corregidas por biomasa. Esta corrección se realiza basándose en la lectura de $DO_{600 \text{ nm}}$ de las muestras. Cada muestra se centrifuga, se descarta el sobrenadante con medio de cultivo y se adiciona un volumen de tampón Tris.HCl 100 mmol l⁻¹ pH = 7.5 de forma tal que la lectura en $DO_{600 \text{ nm}}$, reflejo de la concentración celular, sea igual para todas las muestras a analizar.

Para el control de la expresión de las aldolasas como proteína soluble intracelular se procede a la ruptura de las células (previo ajuste de la DO) y a la recuperación del contenido soluble intracelular tal como se describe a continuación.

3.14.1.2 Ruptura de células

Se realizan por disrupción celular de una suspensión de células empleando el equipo Vibracell™ Sonicator Modelo VC50.

Procedimiento

- Se toma una muestra de volumen conocido de caldo de cultivo y se determina su DO a 600 nm. Por dilución de la muestra con tampón Tris.HCl 100 mM pH 7.5, se ajusta su densidad óptica entre 3.0 – 4.0
- Se introducen 500 µl de la muestra corregida por biomasa en un tubo Eppendorf y se lisan las células por sonicación. Se hacen 4 ciclos de sonicación de 15 seg cada uno, dejando enfriar la suspensión en hielo durante 1 min después de cada ciclo.
- La muestra celular lisada y corregida por biomasa se centrifuga a 12.000 rpm a 4°C y se toma el sobrenadante para cuantificar proteínas totales, actividad aldolásica o su estudio en geles de poliacrilamida disociantes.

3.14.1.3 Materiales y reactivos para electroforesis

Equipo: MiniProtean II de Bio-Rad.

Soluciones (preparadas con agua Milli-Q de 18.2 MΩcm).

- Acrilamida (30 % acrilamida, 2.7 % bisacrilamida)
- 1.5 M Tris.HCl, pH 8.8
- 0.5 M Tris.HCl, pH 6.8
- NH₄S₂O₈ 10 % (preparada extemporánea)
- SDS 10 % (p/v).
- Tampón de electroforesis 5X pH 8.3 (almacenar a 4°C).

Componente	Concentración (g l ⁻¹)
Tris Base	15
Glicina	72
SDS 10 % p/v	5

- Tampón de carga (almacenar a 4°C).

Componente	Volumen (ml)
0.5 M Tris.HCl, pH 6.8	1.0
Glicerol	0.8
SDS 10 % (p/v)	1.6
2-mercaptoetanol	0.4
1 % (p/v) azul de bromofenol	0.4
Agua milliQ	3.8

Gel Separador (12 %): permite separar proteínas en un intervalo de pesos moleculares entre 10 y 100 kDa

Componente	Volumen
1.5 M Tris.HCl, pH 8.8	2.5 ml
SDS 10 % (p/v)	0.1 ml
Acilamida (30 %)	4.0 ml
NH ₄ S ₂ O ₈ 10 %	50 µl
TEMED	5 µl
H ₂ O milliQ	3.35 ml

Gel apilador

Componente	Volumen
0.5 M Tris.HCl, pH 6.8	2.5 ml
SDS 10 % (p/v)	0.1 ml
Acilamida (30 %)	1.33 ml
NH ₄ S ₂ O ₈ 10 %	50 µl
TEMED	10 µl
H ₂ O milliQ	6.1 ml

Preparación de las muestras para electroforesis

- Se diluyen en tampón de carga en proporción 4:1
- Se calientan 5 min a 95°C
- Se cargan las muestras (20 µl) y el marcador de peso molecular adecuado empleando una jeringa Hamilton en los bolsillos del gel apilador.

Marcador de peso molecular

Low-Range Protein Molecular Weight Standards for SDS-PAGE (Bio-Rad ref.: 161-0304).

Contiene proteínas no-teñidas de diferentes pesos moleculares, a saber:

Proteína	kDa
Fosforilasa b	97.4
Albúmina de suero	66.2
Ovoalbúmina	45.0
Anhidrasa carbónica	31.0
Inhibidor de tripsina	21.5
Lisozima	14.4

Preparación del marcador de peso molecular: se diluye 1:20 en tampón de carga y procesa igual que las muestras

Métodos de tinción de geles. Tinción con azul de Coomassie

Se basa en la afinidad que poseen las proteínas (específicamente los grupos amino libres) por el colorante Azul de Coomassie. Este método permite detectar hasta 0.1 µg de proteínas e involucra tres etapas:

- Fijación: 40 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) AcOH en agua destilada. Sumergir el gel por 30 min.
- Tinción: 0.25 g de *Coomassie Brilliant Blue* R250 en 90 ml de metanol:agua (1:1) y 10 ml de ácido acético glacial. Sumergir el gel por 15 min.
- Destinción: 7 % ácido acético glacial. Hacer varios lavados hasta que el gel quede translúcido y las bandas de tinción de proteínas aparezcan.

Después de la etapa de destinción, los geles pueden ser almacenados por tiempo indefinido en agua con 20 % (v/v) glicerol. También pueden secarse envolviéndolos en láminas de celofán (*GelAir Drying*; Bio-Rad).

3.14.2 Determinación de proteína total por el método de Bradford

Fundamento: en presencia del colorante Coomassie[®], las proteínas forman un complejo de color azul que absorbe luz a 595 nm y cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

Calibración

Se utiliza una solución de albúmina de 2.0 mg ml^{-1} para preparar patrones de 125, 250, 500, 750 y $1000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$

Procedimiento

A 1 ml del reactivo *Coomasie*[®] *Protein Assay Reagent* (Pierce, ref.: 1856209) se añaden 20 μl de muestra o patrón. Se deja reposar 10 min en oscuridad y se lee a 595 nm contra blanco de reactivo.

La curva de calibración se puede consultar en el anexo 1.

3.15 ENSAYOS ENZIMÁTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ALDOLÁSICAS

En general, se emplean método espectrofotométricos cinéticos donde la disminución en la absorbancia del NADH a 340 nm es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra, según:

$$UA \cdot ml^{-1} = \frac{(\Delta A_{340nm} \cdot \text{min}^{-1}) \cdot V_t}{\varepsilon \cdot V_e} \cdot Df \cdot Lp$$

Donde:

$\Delta A_{340 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$: cambio de absorbancia por minuto a 340 nm

ε = coeficiente de extinción molar del NADH ($6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_t = volumen total del ensayo (ml)

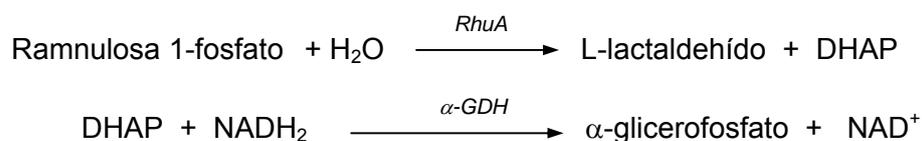
V_e = Volumen de la solución de enzima (ml)

Df = factor de dilución de la muestra aldolásica

$Lp = 1 \text{ cm}$

3.15.1 Determinación de la actividad de ramnulosa 1-fosfato aldolasa (RhuA)

Se empleó el método de Chiu (Chiu and Feingold 1969), el cual consiste en un ensayo enzimático acoplado que mide la tasa de formación de DHAP a partir de ramnulosa 1-fosfato. La DHAP fue determinado con la enzima α -glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) en presencia de NADH_2 , según el siguiente esquema



Reactivos:

a. Tampón Tris.HCl 100 mM KCl 200 mM pH 7.5

b. α -GDH 500 U ml⁻¹ (228 U mg⁻¹; Fluka, ref.: 50015)

A partir de GDH comercial de músculo de conejo, resuspender en agua milliQ. Alicuotar en Eppendorfs y almacenar a -20°C.

c. α -GDH 40 U ml⁻¹.

Se prepara a partir de una alícuota de 40 μ l congelada a -20°C de 500 U ml⁻¹. Para constituir la solución de trabajo, se agregan 460 μ l de agua MilliQ fría a una alícuota de 40 μ l GDH 500 U ml⁻¹

d. NADH₂ 3 mM (Sal disódica hidratada, Fluka 43420, PM = 709.46)

Pesar 2.13 mg y disolver en 1 ml de agua desionizada. Reactivo sensible a la luz.

e. Ramnulosa-1 fosfato (CHA)₂ 40 mM (89.6 %, PM = 442). Debido a que esta sustancia no es comercial, se sintetizó en el laboratorio (apartado 3.18)

Pesar 19.7 mg y disolver en 1 ml de agua milliQ.

Procedimiento

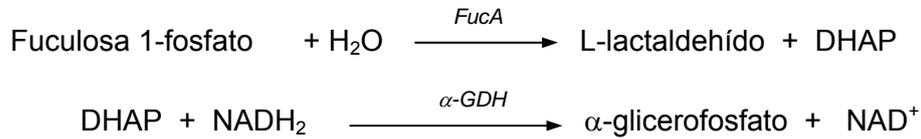
Componente	Volumen (μ l)	Concentración ensayo
NADH (3 mM)	50	0.15 mM
L-Rhamnulosa 1-P (40 mM)	50	2 mM
Tris 100 mM KCl 200 mM	500	50 mM - 100 mM
GDH (40 U ml ⁻¹)	50	2.0 U ml ⁻¹
H ₂ O	340	-
Muestra aldolásica	10	A determinar

Condiciones del ensayo: T = 25°C, λ = 340 nm, camino óptico = 1 cm, volumen total del ensayo = 1 ml

Definición de Unidad: Se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que es capaz de convertir 1 μ mol de ramnulosa-1-fosfato en DHAP y L-lactaldehído por minuto a pH 7.5 y 25°C.

3.15.2 Determinación de la actividad de fuculosa 1-fosfato aldolasa (FucA)

Se empleó un ensayo enzimático acoplado que mide la tasa de formación de DHAP a partir de fuculosa 1-fosfato. La DHAP fue determinado con la enzima α -glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) en presencia de NADH_2 , según el siguiente esquema



Reactivos:

a. Tampón Tris.HCl 100 mM KCl 150 mM pH 7.5

b. α -GDH 50 U ml⁻¹.

Se prepara por dilución 1:10 partir de una alícuota de 500 U ml⁻¹ congelada a -20°C.

c. NADH_2 4 mM (Sal disódica hidratada, Fluka 43420, PM = 709.46).

d. L-Fuculosa-1 fosfato (CHA)₂ 58 mM (PM = 442). Debido a que esta sustancia no es comercial, se sintetizó en el laboratorio (Durany 2000).

Procedimiento

Componente	Volumen (μl)	Concentración ensayo
NADH (4 mM)	34	0.136 mM
L-Fuculosa 1-P (58 mM)	34	1.97 mM
Tris 100 mM KCl 150 mM	864	86 mM – 129 mM
GDH (50 U ml ⁻¹)	34	1.7 U ml ⁻¹
Muestra aldolásica	34	A determinar

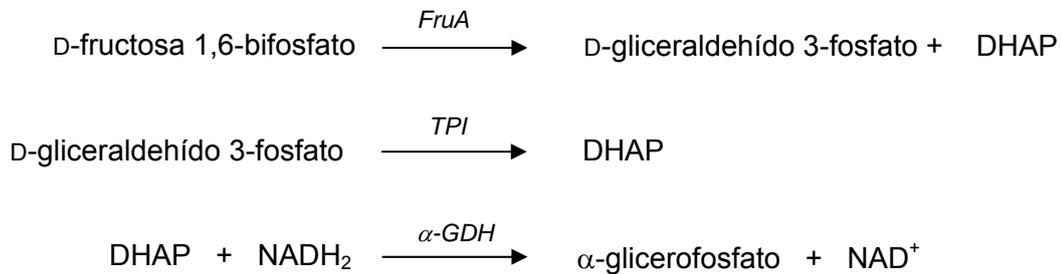
Condiciones del ensayo: T = 25°C, λ = 340 nm, camino óptico = 1 cm, volumen total del ensayo = 1 ml

Definición de Unidad: Se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que es capaz de convertir 1 μmol de fuculosa-1-fosfato en DHAP y L-lactaldehído por minuto a pH 7.5 y 25°C.

3.15.3 Determinación de la actividad fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (FruA)

Se empleó el método publicado por Berry (Berry and Marshall 1993) ligeramente modificado, el cual consiste en un método enzimático acoplada que mide la tasa de

DHAP a partir de D-fructosa 1,6 bifosfato. La DHAP fue determinado con la enzima α -glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) en presencia de NADH_2 , según el siguiente esquema:



Reactivos:

- Tampón Tris.HCl 100 mM, pH 8.0
- D-Fructosa 1,6 bifosfato 60 mM (sal de ciclohexilamina SIGMA F-0752 PM = 736.8)
- Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa/Triosa fosfato isomerasa (α -GDH/TPI) (suspensión en 3.2 M sulfato de amonio; Roche No. 127787). α -GDH: 310 U ml⁻¹; TPI: 900 U ml⁻¹.
- NADH_2 3 mM (sal disódica hidratada; FLUKA 4342)

Procedimiento:

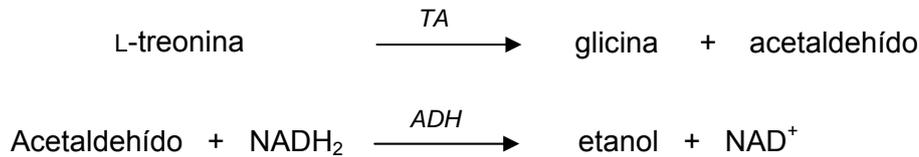
Componente	Volumen (μl)	Concentración ensayo
NADH 3 mM	50	0.15 mM
D-Fructosa 1,6 bifosfato 60 mM	50	3 mM
Tris.HCl 100 mM pH 7.8	500	50 mM
α -GDH/TPI (suspensión)	2	0.6/1.8 U ml ⁻¹
H ₂ O	378	-
Muestra aldolásica	20	A determinar

Condiciones del ensayo: T = 30°C, λ = 340 nm, camino óptico = 1 cm, volumen total del ensayo = 1 ml

Definición de Unidad: se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que es capaz de convertir 1 μmol de D-fructosa 1,6 bifosfato en DHAP por minuto a pH 8.0 y 30°C.

3.15.4 Determinación de la actividad treonina aldolasa

Para la determinación de la actividad treonina aldolasa, se utilizó el método de Liu (Liu et al. 1998) ligeramente modificado. La actividad se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado que mide la tasa de formación de acetaldehído a partir de L-treonina. El acetaldehído fue determinado con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en presencia de NADH_2 , según el siguiente esquema:



Reactivos:

- a. L-treonina 500 mM (SIGMA T-8625 10 g, PM = 119.1) :

Pesar 1488.75 mg y disolver en 25 ml de agua desionizada. Alicuotar esta solución en tubos Eppendorf (1 ml c/u). Congelar a -20°C . Cada vial proporciona 10 determinaciones enzimáticas.

- b. Alcohol deshidrogenasa (ADH SIGMA A-7011 30.000 unidades; 61 mg, 494 U mg^{-1} proteína, 547 U mg^{-1}) 600 U ml^{-1} :

Pesar 12.1 mg y disolver en 10 ml de agua desionizada. Alicuotar esta solución en tubos Eppendorf (500 μl c/u). Congelar a -20°C . Cada vial proporciona 10 determinaciones enzimáticas.

- c. NADH_2 (sal disódica hidratada; FLUKA 4342)

- d. 200 mM Tris.HCl pH 8.0 (PM Tris Base = 121.14)

Pesar 2.4228 g de Tris, adicionar 90 ml de agua desionizada y ajustar a pH 8 con HCl 6 N. Completar hasta 100 ml con agua desionizada.

- e. Tampón 200 mM fosfato de potasio pH = 6.5

9.1 ml de K_2HPO_4 1M + 10.9 ml KH_2PO_4 1M y enrasar a 100 ml con agua desionizada. La solución debe dar pH 6.5

- f. Fosfato de piridoxal (PLP) (SIGMA P-9255) 2 mM

Pesar 5 mg y disolver en 10 ml de agua desionizada. Hacer alícuotas de 0.5 ml c/u en tubos Eppendorfs y almacenar protegido de la luz a -20°C .

Procedimiento

Componente	Volumen (µl)	Concentración ensayo
NADH 3 mM	50	0.15 mM
L-treonina 500 mM	100	50 mM
PLP 2 mM	25	0.05 mM
Tampón 200 mM**	500	100 mM
ADH 600 U ml ⁻¹	50	30 U ml ⁻¹
H ₂ O	225	-
Aldolasa*	50	A determinar

* SHMT; LTA

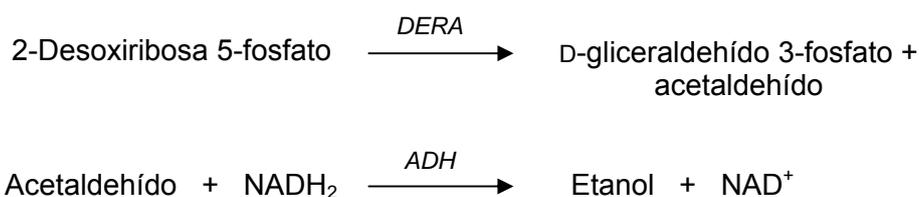
** Para LTA: Tris.HCl 200 mM pH 8.0 y para SHMT: fosfato de potasio 200 mM pH 6.5

Condiciones del ensayo: T = 37°C, λ = 340 nm, camino óptico = 1 cm, volumen total del ensayo = 1 ml

Definición de Unidad: se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que es capaz de convertir 1 µmol de L-treonina en acetaldehído por minuto a 37°C.

3.15.5 Determinación de la actividad 2-desoxiribosa 5-fosfato aldolasa (DERA)

Se empleó el método publicado por Valentín-Hansen (Valentin-Hansen et al. 1982) ligeramente modificado, el cual consiste en un método enzimático acoplada que mide la tasa de formación de acetaldehído a partir de 2-desoxiribosa 5-fosfato. El acetaldehído fue determinado con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en presencia de NADH₂, según el siguiente esquema:

Reactivos:

- Tampón Tris.HCl 100 mM pH 7.5
- 2-desoxiribosa 5-fosfato (sal de sodio SIGMA D-3126 100 mg, PM = 260.1) 40 mM

Tomar los 100 mg del contenido del envase y disolver en 9.612 ml de agua desionizada. Alicuotar esta solución en tubos Eppendorf (250 µl c/u). Congelar a -80°C. Cada vial proporciona 5 determinaciones enzimáticas.

- Alcohol deshidrogenasa 600 U ml⁻¹ (ADH SIGMA A-7011)

Pesar 6.05 mg y disolver en 5 ml de agua desionizada. Alicuotar esta solución en tubos Eppendorf (250 μ l c/u). Congelar a -80°C . Cada vial proporciona 5 determinaciones enzimáticas

d. NADH₂ 3 mM (sal disódica hidratada; FLUKA 4342)

Procedimiento:

Componente	Volumen (μ l)	Concentración ensayo
NADH 3 mM	50	0.15 mM
2-Desoxiribosa 5-fosfato 40 mM	50	2 mM
Tris.HCl 100 mM pH 7.5	500	50 mM
ADH 600 U ml ⁻¹	50	30 U ml ⁻¹
H ₂ O	340	-
Muestra aldolásica	10	A determinar

Condiciones del ensayo: T = 25°C , λ = 340 nm, camino óptico = 1 cm, volumen total del ensayo = 1 ml

Definición de Unidad: se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que es capaz de convertir 1 μ mol de 2-desoxiribosa 5-fosfato en acetaldehído y D-gliceraldehído 3-fosfato por minuto a pH 7.5 y 25°C .

3.16 PURIFICACIÓN DE ALDOLASAS RECOMBINANTES

Se ha utilizado un protocolo general para la purificación de proteínas recombinantes expresadas como proteínas de fusión con cola de histidinas. Los residuos de tipo histidinas forman complejos con cationes divalentes y se plantea una estrategia de purificación en una sola etapa empleando cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC; *Immobilized-Metal Affinity Chromatography*) a partir de los lisados celulares de caldos de cultivo de los microorganismos recombinantes.

3.16.1 Procesamiento de la muestra para cromatografía: obtención de extractos crudos

La purificación de aldolasas se llevó a cabo a partir de caldos de cultivos inducidos con IPTG. En líneas generales, los cultivos inducidos se centrifugan a 8000 rpm a 4°C por 20 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el *pellet* de células con tampón fosfato 20 mM, 10 mM imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.4. Para liberar el contenido intracelular, se rompen las células por sonicación: 4 ciclos de pulsos de 30 seg. con 2 min

de intervalo en baño de hielo, empleando el equipo Vibracell™ Sonicator modelo VC50. El lisado se centrifuga por 30 min, 12000 x g, 4°C para eliminar el *debris* celular. Luego, el sobrenadante es colectado, filtrado (0.45 µm) y almacenado a 4°C para su posterior carga en la columna de afinidad.

3.16.2 Columnas

Para la purificación a pequeña escala, se utiliza el kit HisTrap™ (Amersham Pharmacia Biotech), el cual consta de columnas de cromatografía de afinidad previamente empacadas (volumen de empaque 1 ml) con un polímero de agar funcionalizado con un compuesto quelante (IDA; ácido imino-diacético) para la unión del ion Ni²⁺ (*Chelating Sepharose® Fast Flow*)

Para la purificación a gran escala, se empleó una columna XK 50/20 (Amersham Pharmacia Biotech) termostatazada por medio de una camisa de una solución refrigerante, con un volumen de empaque de 50 cm³ de *Chelating Sepharose® Fast Flow*.

3.16.3 Equipo

Se dispone del equipo cromatográfico FPLC® System Pharmacia. El equipo consta de una válvula de inyección automática a la columna conectada con un cargador de inyección (*loop*) de capacidad variable, dos bombas peristálticas Pharmacia LKB-pump P-500 y de un colector automático de fracciones Pharmacia LKB-FRAK-200. El seguimiento de purificación se realiza mediante la lectura de absorbancia a 280 nm con un detector UV Monitor UV-M Pharmacia.

3.16.4 Reactivos

Todas las soluciones acuosas se preparan con agua milliQ. También se usa agua de esta misma calidad para las etapas de lavado durante el proceso cromatográfico. Todas las soluciones y tampones se filtran a través de membranas de 0.45 µm antes de ser utilizadas.

- Tampón fosfato 8X, pH 7.4

Componente	Cantidad
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.87 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1.11 g
NaCl	23.38 g
H ₂ O	100 ml

- Imidazol 2 M, pH 7.4
- Sulfato de níquel 0.1 M

- Cloruro de cobalto 0.1 M
- Tampón de carga de columna: 20 mM fosfato, 10 mM imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.4
- Tampón de elución 1 de columna: 20 mM fosfato, 0.5 M imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.4
- Tampón de elución 2 de columna: 20 mM fosfato, 0.4 M imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.4

3.16.5 Procedimiento

- Las columnas se conservan en una solución acuosa al 20 % (v/v) de etanol. Antes de conectar la columna al FPLC, se realiza un primer lavado con 5 volúmenes de agua para eliminar la solución alcohólica de la columna.
- A continuación, se equilibra la columna con una la solución de NiSO₄ 0.1 M o CoCl₂ 0.1 M (3 volúmenes) y finalmente se lava la columna con 5 volúmenes de agua.
- Se conecta la columna al equipo FPLC según las instrucciones del fabricante y se equilibra con 5 volúmenes de tampón de carga. Condiciones de operación: flujo: 1-5 ml min⁻¹, detección UV (280 nm).
- Una vez cargadas las muestras en la columna, se realiza un lavado con el tampón de carga hasta no observar la salida de proteínas no retenidas.
- Para eluir las proteínas recombinantes en columnas preempacadas se empleó un gradiente lineal de imidazol en 5 minutos como se describe en la siguiente tabla:

Tiempo (min)	%Tampón	
	20 mM fosfato, 10 mM imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.4	20 mM fosfato, 0.5 M imidazol, 0.5 M NaCl, pH 7.4
1 – 5	100	0
5	100	0
10	0	100
10 – 15	0	100

En el caso de la columna XK-50, la elución se realiza mediante un flujo isocrático de tampón 2 (0.4 mM imidazol).

Las fracciones que contiene la proteína de interés de colectan y se conservan a 4°C para su posterior procesamiento. De cada purificación se toman alícuotas tanto del extracto crudo como de las fracciones colectadas para la determinación de proteínas (Bradford, SDS-PAGE) y actividades enzimáticas.

3.16.6 Procesamiento post-purificación por columna de afinidad

Para la eliminación del tampón de elución se siguieron básicamente tres procedimientos diferentes: cromatografía de gel filtración, precipitación por salado y diálisis.

3.16.6.1 Cromatografía de gel filtración (exclusión molecular)

Se utiliza una columna pre-empaquetada HisTrap™ Desalting de Pharmacia Biotech (volumen de empaque = 5 ml) con esferas porosas de un polímero inerte (Sephadex® G-25 Superfine). Las moléculas de alto peso molecular no pueden penetrar en los poros de las partículas y por lo tanto son las primeras en salir (excluidas), mientras que las moléculas de bajo peso penetran y salen de los poros, retardando su salida de la columna. El efecto neto es una separación de los componentes en solución por tamaño. Este sistema se ha utilizado para separar la proteína recombinante del tampón fosfatoimidazol presente en la muestra de elución

Preparación de la columna

Las columnas se conservan en una solución acuosa de 0.2 M NaCl, 20 % (v/v) etanol. Una vez instalada en el equipo FPLC, se realiza un primer lavado con 25 ml de tampón Tris.HCl 10 mM pH 7.5 para eliminar la solución alcohólica y equilibrar la columna.

Condiciones de operación

Volumen de inyección: 1.5 ml, flujo: 5 ml min⁻¹, detección UV (280 nm)

Procedimiento

Se recolectan las fracciones anteriores al pico de imidazol-fosfato del cromatograma y se determina su contenido en proteína, actividad aldolásica y electroforesis de proteínas por SDS-PAGE.

3.16.6.2 Precipitación por sales

A medida que aumenta la fuerza iónica del medio, el agua de hidratación de las moléculas de proteína es eliminada por la alta concentración de sales. Esto trata como consecuencia la precipitación de la proteína. Para ello, se emplea sulfato de amonio al 40 % de saturación según el siguiente procedimiento:

- Colocar la muestra en baño de hielo con agitación suave
- Adicionar 0.4 g de (NH₄)₂SO₄ por ml de muestra
- Mezclar suavemente durante dos horas hasta disolución completa de la sal
- Colocar la muestra a 4°C *overnight* para incrementar la eficiencia de la precipitación de proteínas
- Centrifugar a 10000 rpm 40 min, 4°C

- Decantar el sobrenadante
- Resuspender el precipitado suavemente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 500 g l⁻¹
- Almacenar a 4°C

3.16.6.3 Diálisis - Liofilización

La liofilización es un proceso en el que una muestra congelada se introduce en una cámara de vacío para que se evapore el agua por sublimación. Este proceso se utilizó para el estudio de la conservación de muestras puras de treonina aldolasas (LTA y SHMT). Equipo utilizado: Benchtop 5-l Lyophilizator (Virtis Sentir, Gardiner, N.Y., USA)

Procedimiento

Se dializa la muestra contra 250 vol de tampón PBS pH 8.0 conteniendo 0.01 mM fosfato de piridoxal (PLP) a 4°C por 24 horas. La diálisis tiene como objetivo separar las proteínas globulares en disolución de los solutos de bajo peso molecular (tampón fosfato – imidazol), para lo cual se utiliza una membrana semipermeable que permite el paso de moléculas pequeñas de soluto y de agua, mientras que las proteínas son retenidas.

- Congelar la solución dializada a -80°C.
- Liofilizar la muestra.
- El polvo obtenido se almacena a diferentes temperaturas protegido de la luz.

3.17 SÍNTESIS DE RAMNULOSA 1-FOSFATO

3.17.1 Síntesis de L-lactaldehído

Se prepara a partir de D-treonina no proteinogénica y ninhidrina según el método de Zagalak (Zagalak et al. 1966) ligeramente modificado.

Reactivos y soluciones para la síntesis

- D-treonina (Sigma, Ref. : T-8250)
- Ninhidrina (Sigma, Ref. : N-4876)
- Tampón citrato de sodio 0.05 M, pH 5.4

Preparación

Para 1 l de solución tampón, se disuelven 3.074 g de ácido cítrico (Panreac, Ref. : 131808) y 10.0 g de citrato de sodio dihidratado (Panreac, Ref. : 131655) en 800 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 5.4 con una disolución de ácido cítrico 0.5 M y finalmente se lleva a 1 l.

Método

Para la preparación de 25 mmol de L-lactaldehído:

- a. En un balón esmerilado de 1 L de capacidad se disuelven 2.978 g de D-treonina (25 mmol) y 9.1 g ninhidrina (51.1 mmol) en 400 ml de tampón citrato sódico 0.05 M pH 5.4. El balón con la mezcla se acopla a un condensador de gases y se lleva a ebullición durante 20 min..
- b. Se deja enfriar la mezcla de reacción y se filtra mediante un filtro Rossich de capa porosa nº 3.
- c. El filtrado se trata con resina Dowex 1x8 en forma bicarbonatada (Fluka, ref.: 44324) bajo agitación magnética hasta alcanzar un pH de 6.5. Se deja en agitación por 2-3 horas.
- d. Se separa la resina Dowex 1x8 por filtración y el filtrado se ajusta a pH 4.0 mediante sucesivas adiciones de resina Dowex 50Wx8 en forma H⁺ (Fluka, ref: 44504) bajo agitación magnética. Se mantiene la agitación por 1 h y luego se filtra.
- e. Se repite el tratamiento con las dos resinas descritas en los pasos c y d, y el filtrado se concentra por vacío hasta obtener un volumen de aproximadamente 100 ml
- f. Se repite el tratamiento con las resinas descrito en los pasos c y d hasta que la solución resultante sea incolora a pH 6.5 y que después del tratamiento con la resina de intercambio aniónico, ésta no se oscurezca.
- g. Conservar la solución resultante a 4°C, pH 4.0 y atmósfera inerte.

3.17.2 Síntesis de dihidroxiacetona fosfato (DHAP)

Se prepara por hidrólisis ácida de la sal trisódica del dímero etil hemiacetal de dihidroxiacetona fosfato según el procedimiento descrito por Effenberg (Effenberger and Straub 1987). La sal trisódica de DHAP fue sintetizada por el Departamento de Química Orgánica de la UAB.

Reactivos

Sal trisódica del dímero etil hemiacetal de dihidroxiacetona fosfato (PM = 462.16)

Método

En un vaso de precipitado de 250 ml se disuelven 3.1147 g del dímero etil hemiacetal de dihidroxiacetona fosfato en 95 ml de agua desionizada.

A la disolución resultante se adiciona, bajo agitación magnética, resina Dowex 50Wx8 (Fluka, ref.:44504) en forma H⁺ hasta alcanzar pH 1.0. Se filtra la disolución ácida para separar la resina y luego se procede a la reacción de hidrólisis.

Hidrólisis: el filtrado ácido se introduce en un frasco hermético y se agita en un baño termostatzado a 65°C, bajo atmósfera inerte, entre 6 y 8 horas. El seguimiento de la hidrólisis se realiza por cuantificación a intervalos de tiempo de 1 hora de la DHAP liberado al medio mediante un método enzimático (3.19.2). La hidrólisis se detiene una vez que la concentración de DHAP en el medio se mantiene constante.

La solución de DHAP resultante se enfría a 4°C y se almacena bajo atmósfera inerte a pH 1.0 y -20°C.

3.17.3 Síntesis de la sal de ciclohexilamina de L-ramnulosa 1-fosfato

Para ello, se utiliza el método empleado por Fessner (Fessner et al. 1993) ligeramente modificado, el cual posee como fundamento la reacción de condensación aldólica entre DHAP y L-lactaldehído, empleando como catalizador específico la enzima RhuA, obtenida según el apartado 3.17.5

Procedimiento

- a. En un frasco se mezclan cantidades equimolares de la solución de L-lactaldehído y de DHAP. Se añade agua desionizada hasta completar un volumen de 250 ml y se ajusta el pH de la solución a 7.5 con KOH.
- b. Se introduce la solución en un baño a 37°C con agitación suave y constante y se adicionan 5 mg de la enzima RhuA purificada.
- c. Se toman muestras a intervalos de tiempos regulares (cada 10 min aproximadamente) y se analizan en su contenido de DHAP y L-lactaldehído.
- d. La reacción se detiene una vez que uno de los dos sustratos se ha consumido completamente.
- e. La mezcla de reacción se conserva a 4°C hasta su posterior purificación.

Purificación

- a. La mezcla de reacción se filtra a través de carbón activo, haciendo dos lavados consecutivos con agua desionizada (2 x 30 ml) para recuperar los residuos que hayan podido quedar en el carbón activado.
- b. El filtrado se pasa a través de una columna de intercambio aniónico (Dowex 1x8, Fluka, ref.:44324) en forma HCO³⁻ y se lava la columna post-carga con agua desionizada para eliminar el K⁺ presente en la muestra de síntesis. Se recomienda hacer al menos dos lavados con un volumen igual o superior al de la resina contenida en la columna.

- c. Se eluye la ramnulosa 1-fosfato con NaHCO_3 0.2 M, incrementándose gradualmente la fuerza iónica a 0.5 M hasta 0.7 M. Se recomienda hacer lavados con volúmenes de NaHCO_3 iguales al volumen muerto de la resina para obtener una mayor eficiencia en la elución, recogiendo cada uno de ellos en un frasco aparte. Ello tiene como objetivo poder monitorear la presencia ramnulosa 1-fosfato en las fracciones de elución.
- d. Se recolectan las fracciones que poseen ramnulosa 1-fosfato y se tratan con resina de intercambio catiónico Dowex 50Wx8 en forma H^+ con agitación vigorosa hasta pH 1 y desprendimiento total de CO_2 .
- e. Se filtra la solución mediante un filtro Rossich de placa porosa No. 3 y se lava la resina recuperada con agua desionizada (2 x 20 ml) para recuperar toda la ramnulosa 1-fosfato.
- f. La disolución se neutraliza con ciclohexilamina (Fluka, ref.:29300) y se liofiliza.
- g. El producto de liofilización, ramnulosa-1-P $(\text{CHA})_2$, se conserva a -20°C bajo atmósfera inerte.

3.18 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL SEGUIMIENTO Y VALORACIÓN DE LA SÍNTESIS DE SUSTRATOS

3.18.1 Determinación de la concentración de L-lactaldehído

La determinación del L-lactaldehído obtenido a partir de la descarboxilación de L-treonina se realiza por reducción específica del L-lactaldehído con KBH_4 a 1,2-isopropanodiol (Sigma P-1009, PM = 76.1) y posterior cuantificación del producto de reducción por HPLC (Zagalak et al. 1966). Para asegurar que la reducción ha sido completa, se realiza una segunda reducción utilizando el doble de cantidad de KBH_4 .

Así, suponiendo un rendimiento de síntesis del 100 %, tenemos que:



Procedimiento

- a. Se toma una muestra de 2 ml de la disolución de L-lactaldehído a cuantificar y se hace reaccionar con KBH_4 de forma tal de se asegure la completa reducción estequiométrica de la muestra.

- b. La mezcla se mantiene bajo agitación magnética a temperatura ambiente por un mínimo de 3 h.
- c. Se determina la concentración de 1,2-isopropanodiol en la mezcla por HPLC.

Condiciones de análisis (HPLC)

- Columna aminex HPX-87H (Biorad)
- Temperatura de columna: 25°C
- Fase móvil: H₂SO₄ pH 3.0
- Flujo: 0.6 ml min⁻¹
- Volumen de inyección: 20 µl
- Detección por índice de refracción (IR)

Calibración

Solución madre: 1,2 isopropanodiol (Sigma P-1009, PM = 76.10). Patrones: 50, 100, 250, 500 y 1000 mM de 1,2 isopropanodiol

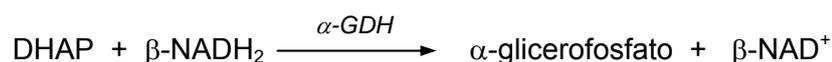
El seguimiento de la concentración de L-lactaldehído durante la síntesis de L-ramnulosa 1-fosfato se realizó por HPLC, midiendo L-lactaldehído directamente sin el paso previo de reducción. La calibración se realizó a partir de la solución de L-lactaldehído de concentración determinada por el método de reducción con KBH₄. Las condiciones de análisis por HPLC son las mismas que las descritas para 1,2 isopropanodiol.

3.18.2 Determinación de la concentración de DHAP

La cuantificación de DHAP se utiliza tanto para el seguimiento de su síntesis vía hidrólisis ácida como para el seguimiento de la síntesis de ramnulosa 1-P.

Fundamento

La DHAP es reducida por el β-NADH en presencia de la enzima α-GDH a α-glicerofosfato. La disminución en la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la cantidad de DHAP presente en la muestra.



Condiciones del ensayo: λ = 340 nm, 25°C, pH 7.5, cubetas de 1 ml, camino óptico = 1 cm.

Procedimiento

- a. Colocar en la cubeta los siguientes componentes:

Componente	Volumen (μl)
100 mM Tris.HCl, pH 7.5	975
20 mM β-NADH ₂	10
Muestra	10

- Se realiza una primera lectura de absorbancia (DO_1) a 340 nm.
- Se añade a la mezcla de reacción 5 μl de GDH (50 UA ml⁻¹).
- Se realiza una segunda lectura de absorbancia después de observar que la densidad óptica a 340nm se mantiene constante (DO_2).

Cálculos

Concentración de DHAP en la muestra

$$mM = \frac{(DO_1 - DO_2)}{\epsilon} \cdot \frac{V_t}{V_e} \cdot Df \cdot Lp$$

Donde:

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH (6.22 mM⁻¹ · cm⁻¹)

V_t = volumen total del ensayo (ml)

V_e = Volumen de la solución de enzima (ml)

Df = factor de dilución de la muestra

Lp = 1 cm

3.18.3 Seguimiento y control de la pureza en la síntesis de ramulosa 1-fosfato

Se emplearon básicamente tres métodos:

- Cromatografía en capa fina
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)
- Resonancia magnética nuclear (RMN)

3.18.3.1 Cromatografía en capa fina

Fase estacionaria: gel de sílice 60 de 0.063-0.20 mm, 70-230 mesh.

Fase móvil: butanol:ácido acético:agua (5:3:1).

Reveladores

- Revelador específico de azúcares

Especificidad: reacciona con compuestos que poseen dioles vecinos.

Preparación:

Componente	Cantidad
Etanol	180 ml
Ácido acético glacial	100 ml
H ₂ SO ₄ 98 %	3 ml
Difenilamina	1 g

Proceso de revelado: por inmersión de la capa seca de sílice en el revelador y posterior calentamiento a 100°C hasta visualización de las manchas.

b. Revelador General de compuestos orgánicos

Preparación:

Componente	Cantidad
H ₂ O	450 ml
H ₂ SO ₄ 98 % (v/v)	50 ml
Molibdato de amonio tetrahidratado	25 g
Sulfato de cesio	0.5 g

Revelado: por inmersión de la capa seca de sílice en el revelador y posterior calentamiento a 100°C hasta visualización de las manchas.

Tabla de factores de retención (R_f)

Compuesto	R _f
DHAP	0.38
L-lactaldehído	0.89
Ramnulosa 1-P	0.27

3.18.3.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Se empleó el método de Tjioe (Tjioe et al. 1985) para la determinación de azúcares fosforilados, el cual utiliza pares iónicos cromatográficos (PIC) para separar compuestos en columna de fase reversa C₁₈. En este caso, se emplea tetrabutilamonio con catión lipofílico, el cual se combinará con la ramnulosa 1-P para formar un compuesto de carga neutra que interactuará con la fase estacionaria de C₁₈.

Condiciones

- Fase móvil: Tetrabutilamonio hidróxido (40 % v/v) en solución; Sigma T-2761) 10 mM ajustado a pH 2.0 con H₂SO₄ 98 %

- Flujo: 0.8 ml min⁻¹
- Detector IR
- Temperatura de columna: 30°C
- Columna C₁₈ Lichrospher 100 RP-18 (Merck) 5 µm, 250x4 mm

Preparación de las muestras: todas las muestras deben ser diluidas al menos 1:3 con la fase móvil y filtradas por 0.45 µm antes de ser inyectadas en el HPLC.

3.18.3.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La caracterización de la estructura química y control de pureza de la síntesis se realizó por ¹H-RMN (250 MHz, D₂O). El espectro obtenido, así como la asignación de señales, se puede consultar en el anexo 2.

3.19. BIBLIOGRAFIA

- Berry A, Marshall KE. 1993. Identification of Zinc-Binding Ligands in the Class-II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase of *Escherichia coli*. FEBS Lett. 318(1):11-16.
- Cherepanov PP, Wackernagel W. 1995. Gene Disruption in *Escherichia coli* - Tcr and Km(R) Cassettes with the Option of Flp-Catalyzed Excision of the Antibiotic-Resistance Determinant. Gene 158(1):9-14.
- Chiu TH, Feingold DS. 1969. L-Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase from *Escherichia coli* Crystallization and Properties. Biochemistry 8(1):98-&.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97(12):6640-6645.
- Durany O. 2000. Desenvolupament de Metodologia per la producció de fuculosa 1-fosfat aldolasa. Universitat Autònoma de Barcelona. Memoria de Màster.
- Durany O, Caminal G, de Mas C, Lopez-Santin J. 2004. Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. Process Biochemistry 39(11):1677-1684.
- Effenberger F, Straub A. 1987. A Novel Convenient Preparation of Dihydroxyacetone Phosphate and Its Use in Enzymatic Aldol Reactions. Tetrahedron Lett. 28(15):1641-1644.
- Fessner WD, Schneider A, Eyrisch O, Sinerius G, Badia J. 1993. Enzymes in Organic-Synthesis .6. 6-Deoxy-L-Lyx-Hexulose and 6-Deoxy-L-Arabino-Hexulose 1-

- Phosphates - Enzymatic Syntheses by Antagonistic Metabolic Pathways. *Tetrahedron-Asymmetry* 4(6):1183-1192.
- Gabriel D. 1996. Disenya i automatització d'un sistema de monitorització de nitrat, nitrit i amoni mitjançant techniques d'anàlisi en flux: aplicació a una planta pilot depuradora d'aigües residuals urbanes amb criteris de Nitrificació/Desnitrificació. Tesis de licenciatura. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Garcia-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong CH. 1995. A New Strategy for the Cloning, Overexpression and One-Step Purification of 3 Dhap-Dependent Aldolases - Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* 3(7):945-953.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227(5259):680-&.
- Liu JQ, Ito S, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 1998. Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas sp.* strain NCIMB 10558. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2):549-554.
- McNeil B, Harvey LM. 1990. Fermentation, a practical approach. Oxford University Press, Oxford (England) 1ra Edición.
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. 1989. Molecular cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY.
- Tjioe TT, Vanderwiel JP, Stikkelman RM, Straathof AJJ, Vanrantwijk F. 1985. High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Glucose-1-Phosphate and Glucuronic Acid 1-Phosphate. *J. Chromatogr.* 330(2):412-414.
- Valentin-Hansen P, Aiba H, Schumperli D. 1982. The Structure of Tandem Regulatory Regions in the Deo Operon of *Escherichia coli* K12. *EMBO J.* 1(3):317-322.
- Villarej.MR, Zabin I. 1974. Beta-Galactosidase from Termination and Deletion Mutant Strains. *J. Bacteriol.* 120(1):466-474.
- Zagalak B, Frey PA, Karabats.GI, Abeles RH. 1966. Stereochemistry of Conversion of D and L 1,2-Propanediols to Propionaldehyde. *J. Biol. Chem.* 241(13):3028-&.
- Zamenhof PJ, Villarej.M. 1972. Construction and Properties of *Escherichia coli* Strains Exhibiting Alpha-Complementation of Beta-Galactosidase Fragments in-Vivo. *J. Bacteriol.* 110(1):171-&.

CAPÍTULO IV

Resultados y Discusión

4. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE ALDOLASAS RECOMBINANTES EN *E. coli*

4.1 INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista tecnológico, la meta principal de la producción de proteínas recombinantes es obtener un alto contenido de la proteína de interés por unidad de biomasa y, además, para ser un proceso industrial efectivo, se deben alcanzar elevadas concentraciones de biomasa.

En estos procesos, el rendimiento de la proteína recombinante respecto a la biomasa está determinado principalmente por el tipo de construcción genética y la capacidad biosintética de la célula hospedera (Kramer et al. 1996)

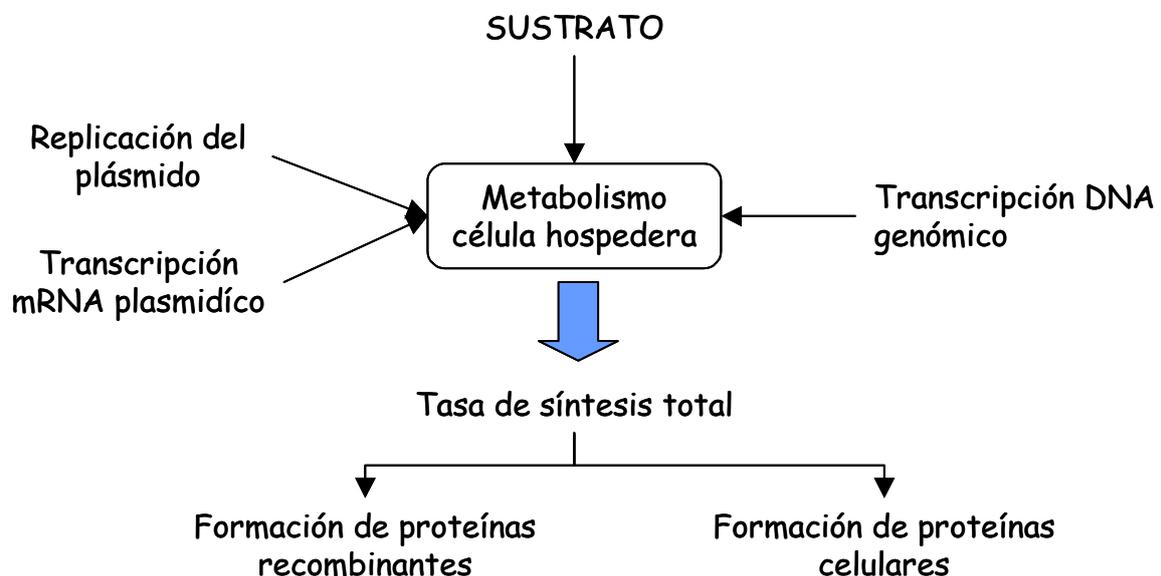


Figura 4.1 Esquema general de la producción de proteínas recombinantes

La capacidad de encontrar un sistema de expresión de proteínas que permita obtener grandes cantidades de la proteína recombinante es básico para cualquier estudio cuyo objetivo esté orientado hacia la producción. En este sentido, el empleo de la ingeniería genética para lograr la correcta expresión a altos niveles de un gen clonado en un microorganismo huésped constituye una herramienta importante para alcanzar esta meta.

Sin embargo, la clonación directa (sin manipulación adicional) de un gen en un vector no suele asegurar la correcta expresión del mismo, sobre todo cuando procede de especies alejadas filogenéticamente. Por esta razón hay que seleccionar vectores especializados y a menudo, incluir modificaciones del gen de interés con objeto de que este pueda

transcribirse y traducirse bien en el microorganismo huésped. Existen algunos aspectos tener en cuenta para este fin:

- ➔ Naturaleza de las secuencias de inicio y final de la transcripción (promotores-operadores, terminadores)
- ➔ Señales para el comienzo de la traducción, especialmente sitios de unión del ribosoma y codón de inicio de la traducción
- ➔ Eficiencia de la traducción, lo que puede obligar a utilizar codones sinónimos adaptados a la abundancia de los correspondientes RNAt del huésped.
- ➔ Localización celular de la proteína a expresar: en muchos casos interesa que la proteína se secrete, por lo que el diseño genético debe incluir señales de procesamiento postraduccional adecuadas. Otras veces interesa que la proteína se quede en el espacio periplásmico de la bacteria Gram-negativa huésped, o que se retenga en el citoplasma.
- ➔ Estabilidad de la proteína en la célula huésped
- ➔ Número de copias del gen clonado. Cuando se pretende que el gen se exprese a alto nivel, se pueden escoger diferentes alternativas, tales como un plásmido de control relajado, es decir, con gran número de copias, o uno de control estricto (poco número de copias) con un promotor fuerte. También se puede recurrir a la integración del gen de interés en el cromosoma.

Cada vez que se quiere clonar y expresar un gen, se deben considerar específicamente muchos de estos parámetros. Se trata de una labor que frecuentemente es bastante ardua, y que pone en juego una gran cantidad de conocimiento de biología molecular y de pericias técnicas.

Uno de los microorganismos huéspedes más usados es *Escherichia coli*, probablemente el ser vivo más estudiado a nivel molecular, y del que se dispone de una vasta batería de métodos de manipulación genética *in vitro*, así como sistemas de expresión de genes.

Antes de entrar en detalles, se enumeran algunos aspectos básicos de lo que debe tener un vector de expresión en *E. coli*: (se citan los elementos genéticos siguiendo el orden desde el lado 5' al lado 3'):

- ➔ Un promotor eficiente

- A corta distancia del promotor, una región que al transcribirse suministre el sitio de entrada al ribosoma: la denominada secuencia de Shine-Dalgarno, que es complementaria del extremo 3' del RNAr 16S
- A unos 3-11 bp *downstream* de la secuencia de Shine-Dalgarno, debería situarse el codón ATG que señala el comienzo de la traducción del RNA_m. Este codón lo puede suministrar el gen a clonar, o bien el vector puede disponer de ese codón, seguido de alguna diana que permita la inserción del gen a expresar
- Finalmente, y situado al lado 3' de todo lo anterior, una secuencia que funcione como terminador de la transcripción (que en su forma de RNA constituye la típica horquilla por emparejamiento intracatenario, donde la RNA polimerasa se desliga del RNA_m recién formado).

Basándose en los aspectos mencionados anteriormente, se seleccionó el sistema comercial pQE-40 de QIAGEN como sistema general de expresión en *E. coli*. Entre los diferentes motivos se citan:

Hospedero: la mayoría de los genes que se plantean clonar son de *E. coli* K-12. Utilizar como hospedero *E. coli* permitiría eliminar algunas barreras de expresión al tratarse de proteínas homólogas. Aunque también se incluyen otras fuentes, en general, todos provienen de organismos procariontes. Otras ventajas inherentes a *E. coli* incluyen: fácil manejo microbiológico y genético, amplio conocimiento en relación con los requerimientos y estrategias de cultivo y seguridad biológica en el laboratorio.

Expresión intracelular: Por un lado, las aldolasas son enzimas intracelulares, y por otro lado, la forma activa de la mayoría de las adolasas es oligomérica, lo cual implica un procesamiento post-transduccional intracelular. Tratar de extrapolar esta situación a nivel extracelular empleando sistemas de secreción no constituye ninguna garantía de obtener la proteína en su conformación oligomérica activa. Además, durante los cultivos, la presencia de la proteína fuera de la célula podría afectar su estabilidad debido a varios factores: agitación, naturaleza del medio de cultivo, temperatura, etc.

Regulación y niveles de expresión: pQE-40 consta de un sistema dual de regulación: por un lado, el plásmido pREP-4 contiene el gen *lacI^q* que codifica una proteína represora *lac*, y por otro, el plásmido pQE-40, que contiene un promotor fuerte (T5) seguido de dos secuencias operadoras *lac*, lo que permite que regular de manera eficaz la transcripción. El plásmido pREP-4 es un derivado de pACYC y contiene el replicón p15A. La célula de *E. coli* hospedera (M15) posee múltiples copias de este plásmido, el cual expresa de manera constitutiva el represor *lac* asegurando altos niveles de la proteína represora, la

cual se une a las secuencias operadoras en pQE-40 e impide la transcripción de la proteína recombinante. La adición al medio de cultivo del inductor químico IPTG (análogo de lactosa no metabolizable) induce la expresión de la proteína recombinante al unirse a la proteína represora *lac*, desplazándola del sitio operador, permitiendo que la RNA polimerasa transcriba las secuencias en dirección *downstream* del promotor. El sistema de “doble operador” en el vector pQE-40, en combinación con los altos niveles del represor *lac* generados por pREP-4 aseguran un mejor control al nivel de transcripción.

Número de copias: La posibilidad de inestabilidad segregacional en plásmidos es importante a la hora de seleccionar un sistema adecuado de expresión. Este fenómeno, junto con una alta carga metabólica durante la inducción, ha sido descrito como la causa de la obtención de bajas productividades de proteínas recombinantes en sistemas que utilizan plásmidos de alto número de copias (Wilms et al. 2001). Esta observación fue lo que condujo a seleccionar un plásmido de bajo número de copias (pQE-40) como sistema general de expresión de aldolasas. En general, existen varias ventajas en la utilización de plásmidos de bajo número de copias (Carrier et al. 1998) entre los cuales se destacan:

- Regulación de la expresión del gen clonado de forma más eficiente
- Buena estabilidad segregacional
- Capacidad para replicar grandes fragmentos de DNA
- Baja carga metabólica para la célula hospedera

Uno de los factores negativos del empleo de este tipo de plásmidos es que los niveles de expresión pueden ser menores comparados con uno de alto número de copias. Sin embargo, la presencia del promotor fuerte T5 del pQE-40 permitiría obtener una alta tasa de transcripción del gen clonado y concomitantemente, un alto rendimiento de la proteína recombinante deseada.

Otras características inherentes al vector: el vector pQE-40 posee las secuencias 6xHis-tag y DHFR adyacentes al MCS, las cuales codifican para una cola de histidinas en N-terminal y para la enzima murina dihidrofolato reductasa respectivamente. La primera secuencia tiene por finalidad que la proteína de interés se exprese con una cola de histidinas para facilitar su purificación posterior por cromatografía de afinidad. La segunda, que proteínas pequeñas (< 10 kDa) se expresen fusionadas a DHFR, asegurando su correcto plegamiento, estabilizándolas.

En este apartado se pretende mostrar los resultados obtenidos en la clonación de las diferentes aldolasas. La siguiente tabla muestra las aldolasas objetivo del presente trabajo, así como su fuente y algunas características de las mismas.

<u>ALDOLASA</u>	<u>Gen</u>	<u>Fuente</u>	<u>Características de la proteína recombinante</u> <u>Datos adicionales</u>
<u>RhuA</u> (Ramnulosa 1-fosfato aldolasa)	<i>rhaD</i>	<i>E. coli</i> K-12	Tetrámero. Subunidad de 32 kDa 6xHisTag en N-terminal Aldolasa de clase II (Zn ²⁺ en el centro activo) Clonada a partir del plásmido pTrcrham por corte/ligación
<u>FucA</u> (Fuculosa 1-fosfato aldolasa)	<i>fucA</i>	<i>E. coli</i> K-12	Tetrámero. Subunidad de 25 kDa 6xHisTag en N-terminal Aldolasa de clase II (Zn ²⁺ en el centro activo) Clonada a partir del DNA genómico de <i>E. coli</i> K12 por amplificación por PCR.
<u>FruA</u> (Fructosa 1,6 bifosfato aldolasa ó RAMA)	<i>fda</i>	<i>E. coli</i> K-12	Dímero. Subunidad de 43 kDa 6xHisTag en N-terminal Aldolasa de clase II (Zn ²⁺ en el centro activo). Actividad <u>no</u> es incrementada por K ⁺ . Clonada a partir del plásmido wtfdp-pKEN-8 por PCR
<u>TagA</u> (tagatosa 1,6-bifosfato aldolasa)	<i>lacD</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> MG1820	Trímero ? Subunidad de 36 kDa 6xHisTag en N-terminal Aldolasa de clase I Clonada a partir del plásmido pSettag por PCR
<u>DERA</u> (2-Desoxiribosa 5-fosfato aldolasa)	<i>deoC</i>	<i>E. coli</i> K-12	Dímero. Subunidad de 30 kDa 6xHisTag en N-terminal Aldolasa de clase I (no es inhibida por agentes quelantes) Clonada a partir del plásmido pVH-17 por PCR
<u>SHMT</u> (serina hidroximetil transferasa)	<i>glyA</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> YKA-184	Subunidad de 45 kDa Requiere de PLP como cofactor Clonada a partir del DNA genómico de <i>S. thermophilus</i> YKA-184 por amplificación por PCR
<u>LTA</u> (L-treonina aldolasa)	<i>ltaE</i>	<i>E. coli</i> K-12	Tetrámero. Subunidad de 36 kDa 6xHisTag en N-terminal Requiere de PLP como cofactor Clonada a partir del DNA genómico de <i>E. coli</i> K12 por amplificación por PCR.

Tabla 4.1. Resumen de las características principales de las aldolasas objetivo.

La figura 4.2 muestra el esquema general que se ha seguido para la clonación de las diferentes aldolasas utilizadas, así como los diferentes ensayos realizados para verificar el resultado final de la clonación y la capacidad de expresión del sistema.

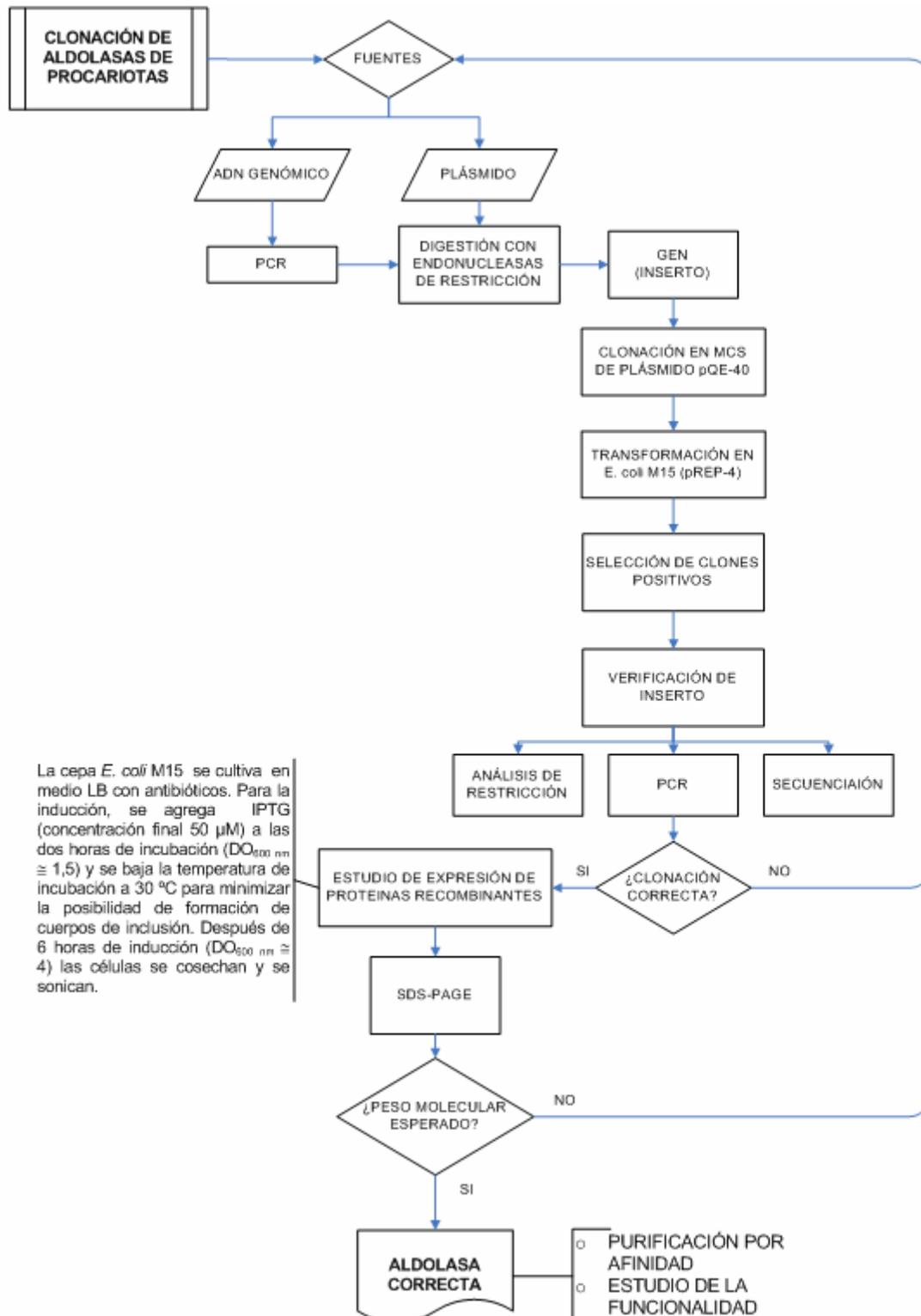


Figura 4.2. Esquema general de clonación y expresión de adolasas

4. 2 CLONACIÓN DEL GEN DE LA RAMNULOSA 1-FOSFATO ALDOLASA (*rhaD*) DE *E. coli* K-12 EN EL VECTOR pQE-40 (QIAGEN)

El gen *rhaD* de *E. coli* que codifica para la ramnulosa 1-fosfato aldolasa se clonó a en el vector pQE-40 a partir de la cepa de *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) cedida por García-Junceda (García-Junceda et al. 1995)). El cambio de sistema de expresión resulta, por un lado, de los bajos rendimientos de expresión obtenidos en ensayos preliminares con el sistema pTrc (Vidal, 2002) y, por otro lado, cumplir con los objetivos definidos sobre la unificación del sistema de expresión de las aldolasas.

Para ello, se extrajo el plásmido pTrcrham de las células de *E. coli* XL1 Blue MRF' y se digirió con las enzimas de restricción *Hind* III y *Bam*H I. El análisis de los fragmentos de DNA por electroforesis en gel de agarosa demostró la presencia de una banda de peso molecular aproximado de 0.80 Kb correspondiente al gen *rhaD* (figura 4.3).

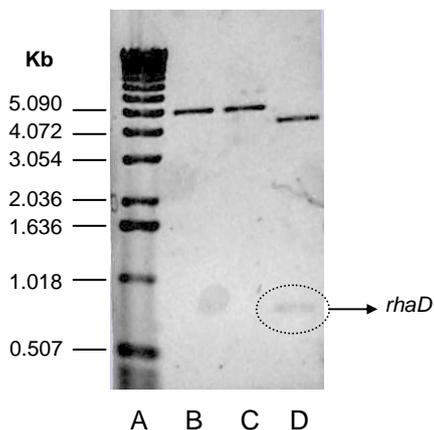


Figura 4.3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.

Líneas:

A: marcador de peso molecular

B: plásmido pTrcrham digerido con *Hind*III

C: plásmido pTrcrham digerido con *Bam*HI

D: plásmido pTrcrham digerido con *Hind*III/*Bam*HI

El fragmento de 0.8 Kb se extrajo, purificó y se clonó en el vector pQE-40. Se conoce que la incorporación de aminoácidos adicionales a la proteína recombinante, tanto en el extremo N-terminal como en C-terminal, pueden afectar la funcionalidad de la proteína, así como la viabilidad de las células hospederas. Por ejemplo, Viaplana (Viaplana and Villaverde 1996) encontró que la presencia de un péptido codificado por las secuencias del MCS en la proteína de fusión p60 de la cápside del virus de enfermedad hemorrágica de conejos (RHDV), promovía la muerte celular de *E. coli*.

Así, en virtud de que las colas peptídicas introducidas en proteínas recombinantes pueden jugar un rol crítico en la expresión de la proteína y del rendimiento final del proceso de producción, se planteó minimizar el tamaño del péptido adicional en el extremo N-terminal de la nueva construcción, con la finalidad de tratar de asegurar un plegamiento correcto, que su funcionalidad no se vea afectada y evitar efectos tóxicos sobre la célula.

Utilizando las mismas dianas de restricción del gen *rhaD* (*Bam*HI/*Hind*III), se escindió la secuencia para DHRF, la cual no se consideró necesaria para la proteína RhuA, y se dejó la secuencia 6xHisTag en el extremo N-terminal de la proteína (figura 4.4)

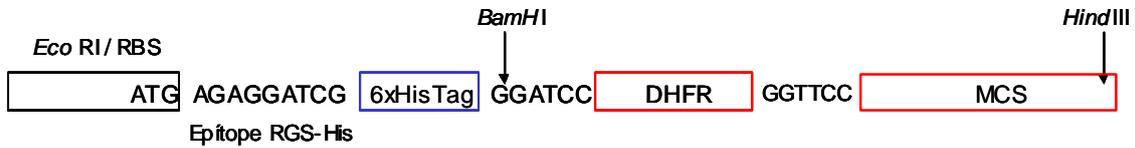


Figura 4.4. Sitio de clonaje Múltiple (MCS) del vector pQE-40 y las dianas de restricción *Bam*HI y *Hind*III dentro de la secuencia del plásmido pQE-40

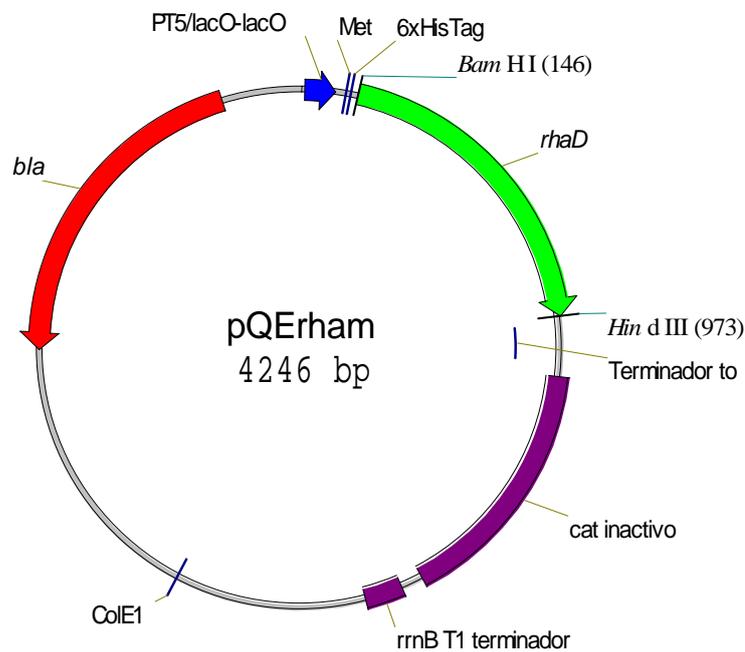


Figura 4.5. Esquema del plásmido pQErham

La nueva construcción con el gen *rhaD* se denominó pQErham (figura 4.5). Luego, se transformaron células competentes de *E. coli* M15 (pREP-4) y el producto de transformación se sembró en placas de Petri con medio LB con ampicilina y kanamicina. Los clones positivos se analizaron para comprobar la incorporación del inserto y para estudiar su capacidad de expresar la proteína recombinante RhuA en medio LB según el protocolo 3.9.1 y 3.14.1 (materiales y métodos).

La figura 4.6 muestra una banda muy significativa (carril E) de aproximadamente 32 kDa, que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína de fusión RhuA, la cual no se observa en el control no inducido (carril F). Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión del plásmido pQE-40 funciona de manera adecuada, lo cual no

ocurre con la cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham), donde no se observa una expresión importante de la proteína recombinante aun a diferentes concentraciones de IPTG.

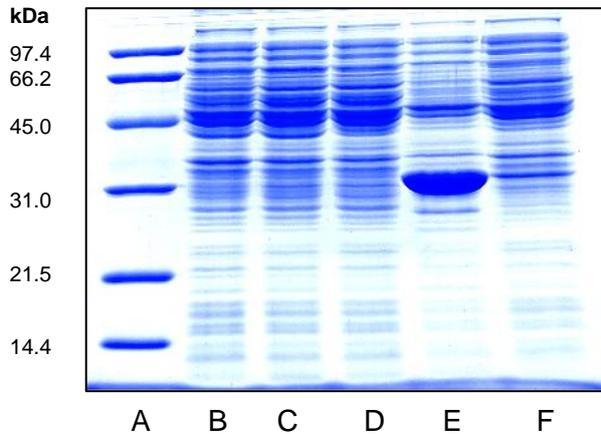


Figura 4.6. Análisis de las proteínas intracelulares por SDS-PAGE de:

- A. Marcador de Peso Molecular
- B. Cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) con 50 μ M IPTG
- C. Cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) sin IPTG
- D. Cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (tipo salvaje) sin IPTG.
- E. Cepa *E. coli* M15 (pQErham) con 50 μ M IPTG
- F. Cepa *E. coli* M15 (pQErham) sin IPTG

En todos los casos, las células fueron ajustadas a una $DO_{600nm} = 3$ antes de ser sonicadas.

Por otro lado, se realizó una densitometría de los geles de proteínas teñidos con Coomassie para determinar el porcentaje de proteína recombinante soluble presente en las células de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas. La figura 4.7 muestra que, cuando las células son cultivadas en medio LB e inducidas con IPTG, aproximadamente el 50 % corresponde a la proteína recombinante RhuA, en comparación con un 8 % de las células no inducidas.

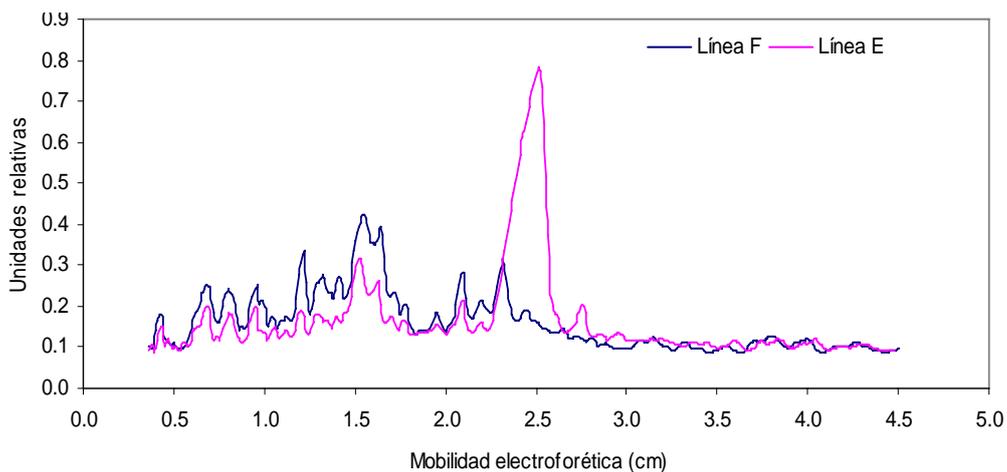


Figura 4.7. Imagen densitométrica correspondiente al carril E (*E. coli* M15 pQErham con 50 μ M IPTG) y carril F (*E. coli* M15 pQErham sin IPTG) del gel de la figura 4.6.

Características de la proteína recombinante RhuA

Basándonos en la secuencia traducida del gen *rhaD*, podemos obtener algunas de las características teóricas de la proteína recombinante sintetizada (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

- N-terminal: 11 aminoácidos adicionales (incluye cola de 6 histidinas) y el epítipo RGS-His.
- C-terminal: 0 aminoácidos adicionales

1	11	21	31	41	51		
1	MRGSHHHHHH	GSQNITQSWF	VQGMKATTD	AWLKGWDERN	GGNLTLRLDD	ADIAPYHDNF	60
61	HQQPRYIPLS	QPMPLANTP	FIVTGSKFF	RNVQLDPAAN	LGIVKVDSDG	AGYHILWGLT	120
121	NEAVPTSELP	AHFLSHCERI	KATNGKDRVI	MHCHATNLIA	LYVLENDTA	VFTRQLWEGS	180
181	TECLVVPDGD	VGILPMMVPG	TDEIGQATAQ	EMQKHSVLVW	PFHGVFGSGP	TLDETFGLID	240
241	TAEKSAQVLV	KVYSMGMKQ	TISREELIAL	GKRFVGTPLA	SALAL		

Número de aminoácidos: 285

Peso molecular: 31412.7

Punto isoeléctrico teórico (PI): 6.08

Los resultados obtenidos indican que se ha conseguido un sistema de expresión efectivo y bien regulado que permite obtener altos niveles de la proteína recombinante. La funcionalidad de la enzima recombinante, así como de las siguientes aldolasas, se presentará en el capítulo 5

4. 3 CLONACIÓN DEL GEN DE LA FUCULOSA 1-FOSFATO ALDOLASA (*fucA*) DE *E. coli* K-12

La enzima fuculosa 1-fosfato aldolasa (FucA; E.C. 4.1.2.17) es una enzima homotetramérica involucrada en el metabolismo bacteriano de L-fucosa (Ghalambor and Heath 1962) . La vía inducible para el metabolismo de este carbohidrato requiere la acción secuencial de la mucosa permeasa (codificada por *fucP*), fucoisomerasa (*fucI*) fucoquinasa (*fucK*) y fuculosa 1-fosfato aldolasa (*fucA*). Cada subunidad de FucA consta de 215 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 24 kDa y un lugar de unión a zinc. Tiene un margen de pH de actuación entre 6 y 9, siendo su pH óptimo de acción de 7.2. La temperatura máxima de actividad a pH 7.2 es de 37°C para su sustrato natural fuculosa 1-fosfato.

Esta enzima se ha clonado en la cepa recombinante *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) (Garcia-Junceda et al. 1995) para la producción de FucA de *E. coli* K12. Durany (Durany et al. 2005) optimizó la producción de esta enzima recombinante utilizando como

estrategia operacional cultivos discontinuos alimentados dirigidos a la obtención de altas densidades celulares. Las principales características de esta construcción se detallan a continuación:

Vector: pTrcHis C (Invitrogen). Permite la expresión de proteínas bajo el control del promotor *trc* (derivado del promotor *lac*). Inducible por IPTG

Proteína: se expresa como proteína de fusión con una cola de 6 histidinas (6xHisTag) en el extremo N-terminal. Sin embargo, teniendo en cuenta las dianas utilizadas para la clonación en este vector (*Pst*I/*Eco*RI), el número aminoácidos traducidos a partir del extremo N-terminal se incrementa en 41 residuos, entre los cuales se incluyen:

- Cola de seis histidinas (6xHisTag)
- Epítotope Xpress™
- Sitio de ruptura de enteroquinasa.

Este exceso de aminoácidos (excepto la cola de histidinas), *a priori*, no representa ninguna ventaja adicional sobre la funcionalidad de la enzima. En este sentido, basándonos en la estandarización de un sistema de producción general de aldolasas, se consideró la posibilidad de clonarla en el mismo vector de expresión utilizado para las otras aldolasas (pQE-40). La nueva aldolasa tendría un menor número de aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal y además, se encontraría dentro de un sistema de producción normalizado.

El gen *fucA* se amplificó por PCR (figura 4.8) a partir del DNA de *E. coli* K-12 introduciendo las dianas de restricción *Bam*HI (5') y *Hind*III (3') con la finalidad de clonar el producto amplificado en el plásmido pQE-40.

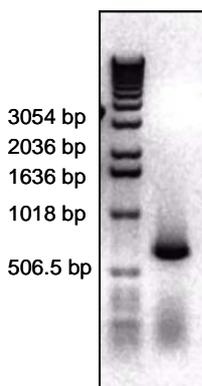


Figura 4.8. Gel de agarosa al 1 %. (B) Banda de 0.6 Kb del gen *fucA* amplificado por PCR usando los oligos 5fucA y 3fucA (30 ciclos; Tm = 50°C).

El gen *fucA* (amplificado por PCR) se clonó en las dianas *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pQE-40, eliminándose de esta forma la secuencia correspondiente a la DHFR. Con el nuevo plásmido pQEfucA (figura 4.9) se transformaron células de *E. coli* M15 (pREP-4)

por electroporación. Los clones positivos de *E. coli* M15 (pQEfucA) se analizaron para comprobar la incorporación del inserto y para estudiar su capacidad de expresar la proteína recombinante SHMT en medio LB según el protocolo 3.9.1 y 3.14.1 (materiales y métodos)

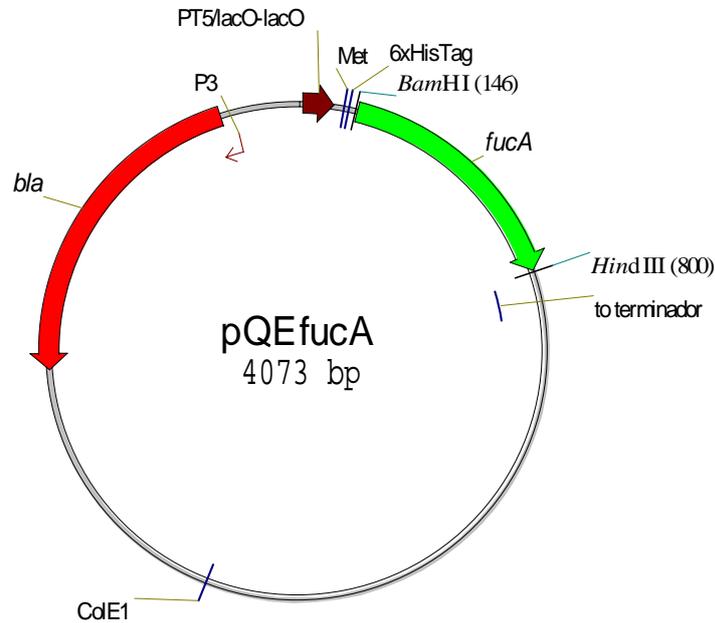


Figura 4.9. Esquema del plásmido pQEfucA

La figura 4.10 muestra una banda significativa (A) de aproximadamente 26 kDa que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína FucA recombinante, la cual no se observó en el control no inducido. Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión del gen clonado en M15 (pQEItaE) funciona de manera adecuada y que la proteína se está expresando en forma soluble en el citoplasma de las células.

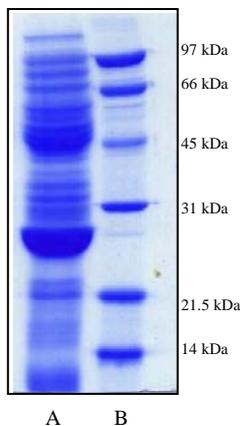


Figura 4.10. Análisis de proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie de:

- (A) *E. coli* M15 (pQEfucA) inducido
 (B) Marcadores de peso molecular

Solo muestra el cultivo inducido debido a que el resultado del control se deterioró durante el proceso del secado del gel.

La secuencia de la proteína recombinante FucA se muestra a continuación, así como el análisis teórico del peso molécula, PI, composición de aminoácidos (<http://kr.expasy.org/tools/protparam.html>)

```

      1           11           21           31           41           51
      |           |           |           |           |
1  MRGSHHHHHH  GSMERNKLAR  QIIDTCLEMT  RLGLNQGTAG  NVSVRYQDGM  LITPTGIPYE  60
61  KLTESHIVFI  DGNGKHEEGK  LPSSEWRFHM  AAYQSRPDAN  AVVHNHAVHC  TAVSILNRSI  120
121 PAIHYMIAAA  GGNSIPCAPY  ATFGTRELSE  HVALALKNRK  ATLLQHHGLI  ACEVNLEKAL  180
181 WLAHEVEVLA  QLYLTTLAIT  DPVPVLSDEE  IAVVLEKFKT  YGLRIEE

```

Número de aminoácidos: 227

Peso molecular: 25173.8

Punto isoeléctrico teórico (PI): 6.49

4. 4 CLONACIÓN DEL GEN DE LA FRUCTOSA 1,6-BIFOSFATO ALDOLASA (*fda*) DE *E. coli* K-12

Esta enzima, que pertenece a las aldolasa de clase II, cataliza la reacción aldólica de DHAP con gliceraldehído 3-fosfato como aceptor natural. La enzima comercial RAMA (*rabbit muscle aldolase*), que cataliza la misma reacción pero empleando como mecanismo catalítico la formación de una base de Schiff, ha sido ampliamente estudiada y es capaz de aceptar una gran cantidad de aldehídos diferentes a su sustrato natural (Bednarski et al. 1989) demostrando ser una herramienta potencialmente importante para procesos de síntesis. Sin embargo, las potencialidades catalíticas de la enzima microbiana no han sido estudiadas por lo que su sobreexpresión representará un avance en el estudio de su utilidad como catalizador para síntesis orgánica de moléculas con estereoquímica definida.

Clonación del gen *fda* a partir del plásmido wtfdp-pKEN-8.

Este apartado tiene como objetivo la clonación del gen *fda* de *E. coli* K-12 para la sobreexpresión de la enzima FruA de tipo II (Zn^{2+} dependiente). El plásmido wtfdp-pKEN-8, el cual sirvió como fuente para obtener el gen *fda*, fue construido por Henderson (Henderson 1994) a partir de DNA de *E. coli* K-12 y el plásmido pKEN-2. Este sistema se encuentra bajo el control de un promotor *tac* e inducible por IPTG e infección por el fago M13/T7 para asegurar un control estricto de la expresión del gen. Sin embargo, el hecho de tener que utilizar un fago hace que este sistema no sea viable para ser escalado, por lo que se plantea emplear el sistema pQE-40 utilizado anteriormente con éxito para sobreexpresar otras aldolasa.

Una vez extraído el plásmido wtfdp-pKEN-8 se procedió a amplificar el gen *fda* por PCR (figura 4.11). Para ello, se introdujo una diana de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y

SalI en el extremo 3' del gen *fda* con la finalidad de clonar el producto amplificado en el plásmido pQE-40.

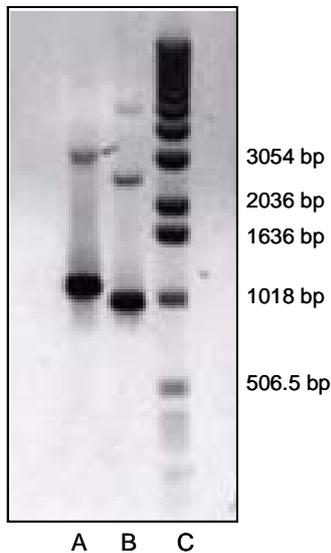


Figura 4.11. Gel de agarosa al 1 %. (A) Banda de 1.1 Kb del gen *fda* amplificado por PCR usando los oligos 5fda y 3fda (30 ciclos; $T_m = 50\text{ }^\circ\text{C}$). (B) Banda de 1.0 Kb (B) del gen *lacD* amplificado por PCR usando los oligos 5lacD y 3lacD (30 ciclos; $T_m = 52\text{ }^\circ\text{C}$)

El gen *fda* (amplificado por PCR) se clonó en las dianas *Bam*HI y *Sal*I del plásmido pQE-40, eliminándose de esta forma la secuencia correspondiente a la DHFR. Con el nuevo plásmido, pQEfda (figura 4.12), se transformaron células de *E. coli* M15 (pREP-4) por electroporación. El análisis con endonucleasas de restricción (*Bam*HI y *Sal*I) de los plásmidos extraídos de los clones positivos permitieron confirmar la incorporación del inserto en el vector.

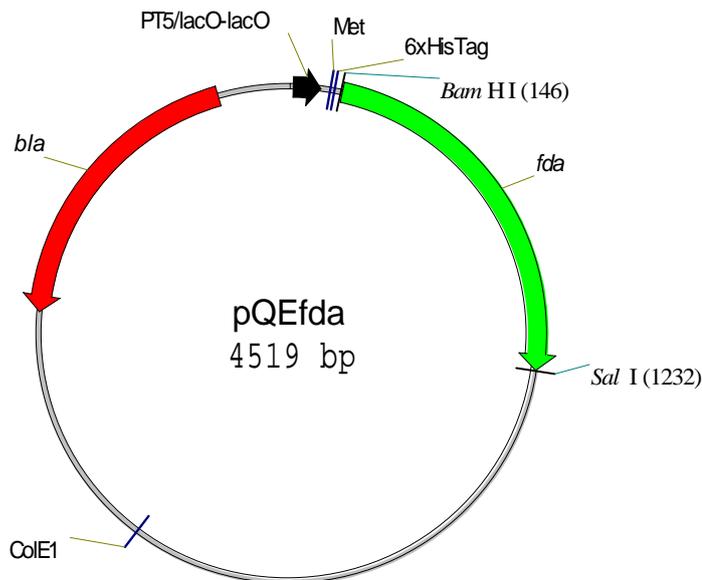


Figura 4.12. Esquema del plásmido pQEfda

Para comprobar la eficiencia de expresión de la proteína recombinante, la cepa *E. coli* M15 (pQEfda) se cultivó a en medio LB y se procedió según el protocolo del apartado 3.9.1 y 3.14.1 (materiales y métodos). Los resultados de la evaluación de la expresión de FruA recombinante se muestran en la figura 4.13. La figura 4.13 muestra una banda muy significativa (A) de aproximadamente 41 kDa que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína FruA recombinante, la cual no se observa en el control no inducido (B). Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión del gen clonado en M15 (pQEFruA) funciona de manera adecuada y que la proteína se está expresando en forma soluble en el citoplasma de las células.

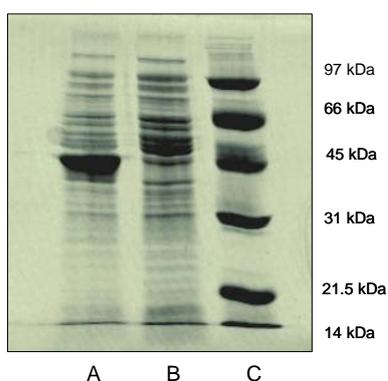


Figura 4.13. Análisis de proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie de:

- (A) *E. coli* M15 (pQEfda) inducido con IPTG
 (B) *E. coli* M15 (pQEfda) no inducido (control)
 (C) marcador de peso molecular

Características de la proteína recombinante FruA

	1	11	21	31	41	51	
1	MRGSHHHHHH	GSMSKIFDFV	KPGVITGDDV	QKVFQVAKEN	NFALPAVNCV	GTDSINAVLE	60
61	TAAKVKAPVI	VQFSNNGGASF	IAGKGVKSDV	PQGAAILGAI	SGAHHVHOMA	EHYGVPVILH	120
121	TDHCAKKLLP	WIDGLLDAGE	KHFAATGKPL	FSSHMIDLSE	ESLQENIEIC	SKYLERMSKI	180
181	GMTLEIELGC	TGGEEDGVDN	SHMDASALYT	QPEDVDYAYT	ELSKISPRFT	IAASFGNVHG	240
241	VYKPGNVVLT	PTILRDSQEY	VSKKHNLPHN	SLNFVFGGGS	GSTAQEIKDS	VSYGVVKMNI	300
301	DTDTQWATWE	GVLNYYKANE	AYLQGQLGNP	KGEDQPNKKY	YDPRVWLRAG	QTSMIARLEK	360
361	AFQELNAIDV	L					

Número de aminoácidos: 371

Peso molecular: 40545.7

Punto isoeléctrico teórico (PI): 5.93

4.5 CLONACIÓN DEL GEN DE LA TAGATOSA 1,6-BIFOSFATO ALDOLASA (*lacD*) DE CLASE I DE *Lactococcus lactis ssp. lactis* MG1820

Esta enzima cataliza la reacción de ruptura de tagatosa 1,6- bifosfato (sustrato natural) para la formación de DHAP y gliceraldehído 3-fosfato. Se ha descrito principalmente en el

metabolismo de lactosa y D-galactosa de especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Bissett and Anderson 1980; Crow and Thomas 1982). Existen algunos reportes sobre la escasa diastereoselectividad de esta enzima en relación con la reacción de síntesis, específicamente con sustratos no naturales.

Bissett (Bissett and Anderson 1980) purificó y estudió la TagA clase I obtenida a partir de *Staphylococcus aureus* crecido en presencia de D-galactosa. El proceso de purificación es más detallado que el proporcionado por Fessner (Fessner and Eyrisch 1992) en su trabajo de purificación de la TagA de clase II de *E. coli*, mostrando no solo valores del grado de purificación y rendimientos de cada etapa, sino también la corroboración por SDS-PAGE de una única banda de proteína (incluye 2 etapas de cromatografía de afinidad y una de intercambio iónico). Así, obtuvo una fracción 155 veces pura de TagA con una razón de actividad tagatosa 1,6-bifosfato:fructosa 1,6-bifosfato de 2.1:1. En relación con la reversibilidad de la reacción (síntesis), la enzima era capaz de catalizar la condensación de DHAP con D-gliceraldehído 3-fosfato (sustratos naturales) proporcionando una mezcla de cuatro D-2-cetohexosas 1,6-bifosfato (tagatosa, fructosa, sorbosa y psicosa (no muestra datos en referencia a las proporciones de cada uno de las sustancias identificadas). En resumen, esta enzima no mostraba estereoespecificidad ni para la reacción de ruptura ni para la reacción de condensación.

Crow (Crow and Thomas 1982) purificó y estudió la TagA de clase I obtenida a partir de *Streptococcus cremoris* E₈ (actualmente reclasificado dentro del género *Lactococcus*). El proceso de purificación incluye una precipitación con sulfato de amonio, una etapa de cromatografía de intercambio iónico y un último paso cromatográfico de gel filtración, obteniendo un bajo grado de purificación (13.5 veces pura), aunque postula la completa separación de TagA de FruA durante la cromatografía de intercambio. La fracción pura de TagA obtenida presenta una razón de actividad tagatosa 1,6-bifosfato:fructosa 1,6-bifosfato (TBP:FBP) de 2:1, similar a la obtenida con *S. aureus* (Bissett and Anderson 1980). Por otro lado, cuando la enzima era incubada con DHAP y D-gliceraldehído 3-fosfato (sustratos naturales), se obtenía una mezcla de FBP y TBP en el equilibrio en una proporción de 7.1:1. Los autores no descartan la presencia de otras cetohexosas 1,6-bifosfato (al igual que lo que ocurre con la enzima obtenida a partir de *S. aureus*) en la reacción de condensación ya que los productos (FBP y TBP) fueron determinados por métodos enzimáticos

Eyrisch (Eyrisch et al. 1993) purificó una TagA clase II a partir de un extracto de *E. coli* JWL183 (Lengeler 1977) crecido en galactitol como fuente de carbono y purificada con solo dos pasos cromatográficos de otras actividades contaminantes, obteniendo un grado

de purificación de 50 (destaca una separación entre FruA y TagA basándose en su punto isoeléctrico a través de cromatografía de intercambio iónico). Los resultados obtenidos con la fracción purificada de TagA indicaban una alta especificidad por el sustrato natural tagatosa 1,6 bifosfato en la reacción de ruptura y muy baja por fructosa 1,6 bifosfato (99:1). Sin embargo, cuando se evaluó su potencial para la reacción de síntesis (Fessner and Eyrisch 1992) frente a otros aldehídos aceptores (glicolaldehído, D ó L gliceraldehído, acetaldehído e isobutirilaldehído) diferentes al sustrato natural, se encontró que los productos poseían una configuración C-3/C-4 predominantemente D-threo (>90 %) característica del tipo fructosa en lugar de la configuración L-erythro (<10 %) característica del tipo tagatosa. Ello llevó a pensar en la escasa utilidad de esta enzima para ser empleada en reacciones biosintéticas.

La enzima TagA de *Lactococcus lactis ssp lactis* MG1820 fue clonada a partir de los estudios realizados por Van Rooijen (Van Rooijen et al. 1991), cuyo trabajo tenía como objetivo principal la caracterización molecular del operón *lacABCD* de *L. lactis* que codifica para las enzimas involucradas en la vía de la tagatosa 6-fosfato: galactosa 6-fosfato isomerasa, tagatosa 6-fosfato kinasa y tagatosa 1,6-bifosfato aldolasa respectivamente. A partir de este trabajo, García-Junceda (García-Junceda et al. 1995) realiza la clonación del gen *lacD* de *L. lactis ssp lactis* MG1820 en el vector pSettag (inducible por IPTG/coinfección con el fago M13-T7) para sobreexpresarla como una proteína de fusión con cola de histidinas y estudiar su potencial en reacciones de síntesis en virtud de los resultados poco alentadores en relación con la misma enzima pero procedente de otras fuentes. García-Junceda (García-Junceda et al. 1995), reporta que la TagA de *L. lactis ssp lactis* MG1820, a pesar de tener la misma composición virtual de aminoácidos y ser muy similar en relación con el K_m y V_{max} de la TagA de *S. cremoris* E₈, la enzima es más estereoselectiva en la reacción de ruptura, obteniendo una razón de actividad TBP:FBP de 48:1. A partir de esto, postula la posibilidad de que sea también más esteroespecífica en la reacción de síntesis y deja abierta la puerta para estudiar las potencialidades de la enzima microbiana como catalizador para síntesis orgánica de moléculas con estereoquímica definida a través de su sobreexpresión.

Probablemente, el proceso de purificación de 1 solo paso de la proteína recombinante TagA obtenida por García-Junceda (García-Junceda et al. 1995) sea más eficiente que el realizado por Crow (Crow and Thomas 1982) para la TagA nativa de la misma especie (a pesar de que García-Junceda no muestra datos numéricos de la purificación) y que por ello se observen las diferencias de K_m , V_{max} y estereoespecificidad. En este sentido, se plantea la necesidad de obtener una fracción altamente purificada y en grandes cantidades para corroborar estos datos.

Utilizando el mismo argumento que para FruA, el hecho de tener que utilizar un fago hace que el sistema pSettag no sea viable para ser escalado, por lo que se plantea clonar el gen *lacD* en el sistema pQE-40.

Clonación del gen *lacD* en pQE-40

A partir del plásmido pSettag extraído y purificado, se amplificó el gen *lacD* por PCR. Para ello, se introdujeron las dianas de restricción *Bam*HI/*Sal*I en el extremo 5' y 3' del gen *deoC* respectivamente. El producto de PCR (figura 4.1) se purificó y se comprobó mediante un gel de agarosa 1 % para determinar el tamaño del producto amplificado (1.0 Kb teóricos).

El gen *lacD* amplificado se clonó en el plásmido pQE-40, obteniéndose el plásmido pQE*lacD* (figura 4.14), el cual se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* M15 (pREP-4). Los clones positivos se analizaron para comprobar la incorporación del inserto y para estudiar su capacidad de expresar la proteína recombinante RhuA en medio LB según el protocolo 3.9.1 y 3.14.1 (materiales y métodos)

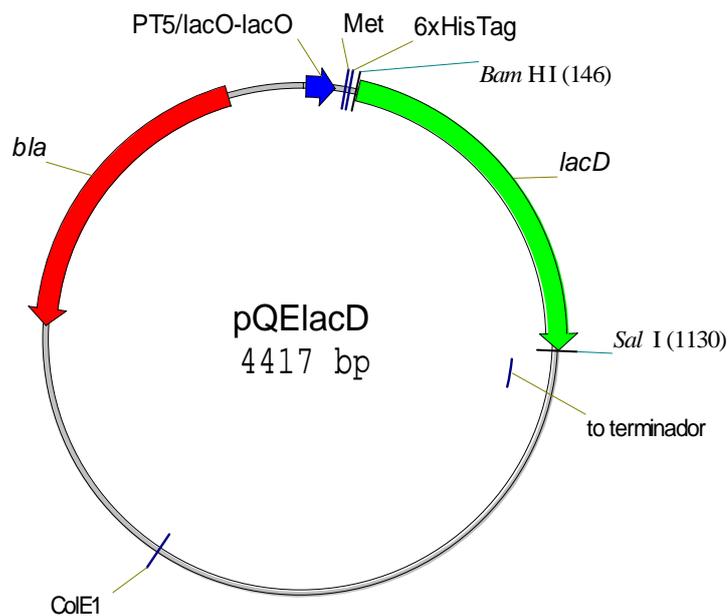


Figura 4.14. Esquema del plásmido pQE*lacD*

La figura 4.15 muestra una banda muy significativa (B) de aproximadamente 36 kDa que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína TagA recombinante, la cual no se observa en el control no inducido (C). Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión del gen clonado en M15 (pQE*lacD*) funciona de manera adecuada y que la proteína se está expresando en forma soluble en el citoplasma de las células.

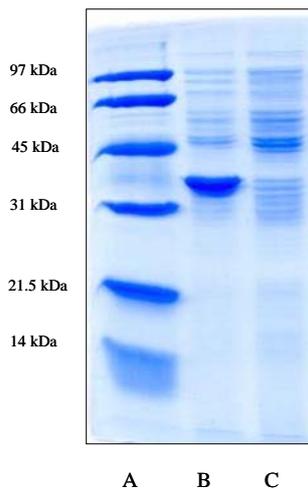


Figura 4.15. Análisis de proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie de:

- (A) Marcadores de peso molecular.
 (B) *E. coli* M15 pQE1acD inducido con IPTG.
 (C) *E. coli* M15 pQE1acD sin inducir (control).

4.6 CLONACIÓN DEL GEN DE LA 2-DESOXIRIBOSA 5-FOSFATE ALDOLASA (*deoC*) DE *E. coli* K-12

Se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α (pVH-17) cedida por García-Junceda como fuente del gen *deoC*. El plásmido pVH-17 fue construido por Valentin-Hansen (Valentin-Hansen et al. 1982) a partir de DNA de *E. coli* K-12 y el plásmido pBR322. Este trabajo tenía como objetivo estudiar la estructura y función de la región reguladora del operón *deo*, el cual esta conformado de la siguiente manera (figura 4.16):

- PO₁ y PO₂: regiones promotoras 1 y 2, reguladas negativamente por el represor *deoR* e inducibles por desoxiribosa 5-fosfato. En la región PO₂, la transcripción también es reprimida por el represor *cytR* e inducida por citidina o adenosina, y depende de AMPc/CRP (*cyclic AMP receptor protein complex*).
- PO₃: región promotora cuya transcripción está controlada por factores proteicos no conocidos) e inducida por inosina o guanosina
- Genes estructurales:
 - deoC*: 2-desoxiribosa 5-phosphate aldolasa
 - deoA*: Timidina fosforilasa
 - deoB*: Desoxiribomutasa
 - deoD*: Purina nucleósido fosforilasa.

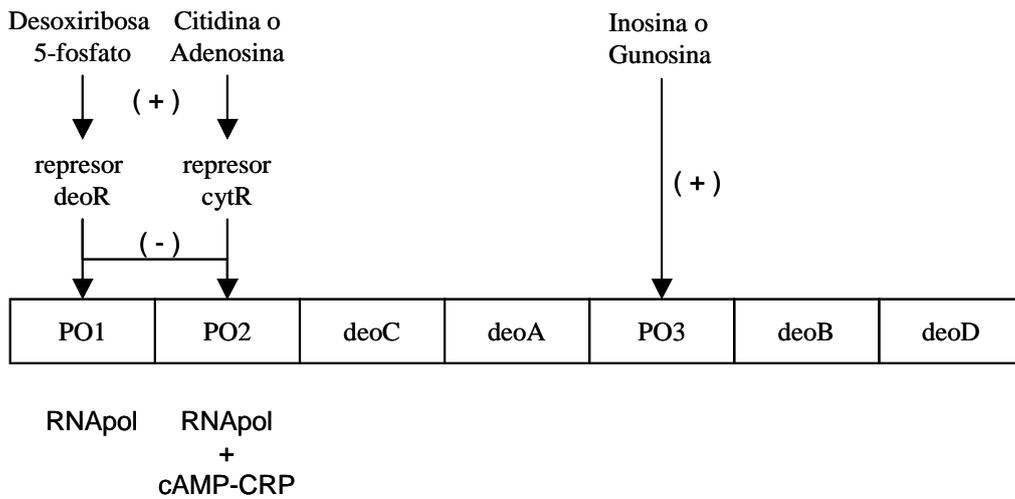


Figura 4.16. Esquema de la estructura y regulación del operón *deo*

El plásmido pVH-17 (figura 4.17) contiene un fragmento de DNA cortado con las enzimas *EcoRI/AvaI* e incorporado en el plásmido pBR322, conteniendo las regiones regulatorias PO₁ y PO₂ *upstream* de *deoC*, el gen *deoC* y un fragmento del gen *deoA*.

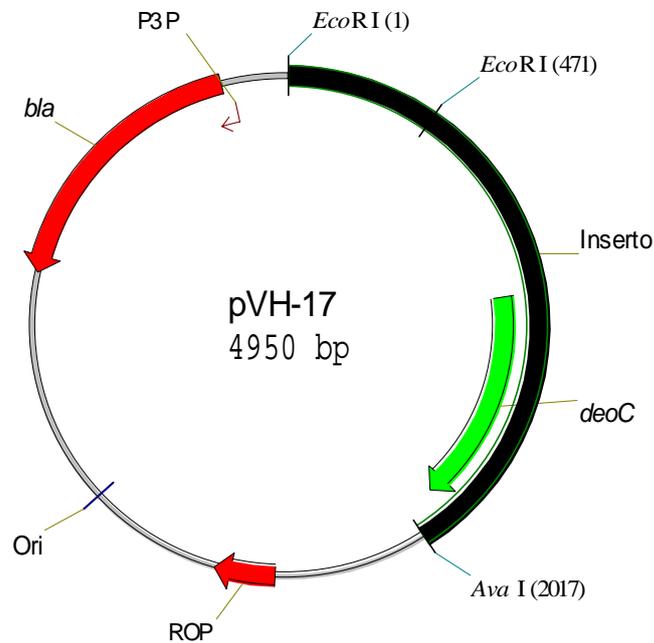
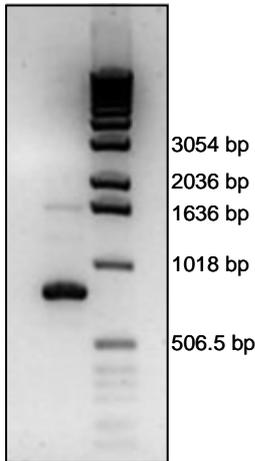


Figura 4.17. Esquema del plásmido pVH-17.

Clonación del gen *deoC* en pQE-40

A partir del plásmido pVH-17 extraído y purificado, se amplificó el gen *deoC* por PCR (figura 4.18). Para ello, se introdujo una diana de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y la diana *Hind*III en el extremo 3' del gen *deoC* con la finalidad de clonar el producto amplificado en el plásmido pQE-40. El producto de PCR se purificó y se comprobó mediante un gel de agarosa 1 % para determinar el tamaño del producto amplificado (801 bp teóricos).



Se observa la banda de 803 bp la cual corresponde al gen *deoC* amplificado por PCR usando los oligos 5*deoC* y 3*deoC* (30 ciclos).

Figura 4.18. Gel de agarosa al 1 %. Se observa la banda de 803 bp la cual corresponde al gen *deoC* amplificado por PCR usando los oligos 5*deoC* y 3*deoC* (30 ciclos).

El gen *deoC* se clonó en el plásmido pQE-40, obteniéndose el plásmido pQE*deoC*1 (figura 4.19). Luego se transformaron células de *E. coli* M15 (pREP-4) por electroporación. Los clones positivos se analizaron para comprobar la incorporación del inserto y para estudiar su capacidad de expresar la proteína recombinante RhuA en medio LB según el protocolo 3.9.1 y 3.14.1 (materiales y métodos). Se utilizó como controles un cultivo de *E. coli* M15 (pQE*deoC*1) al cual no se le agregó IPTG y otro con la cepa DH5 α (pVH-17) y se procesaron de la misma manera que la cepa en estudio.

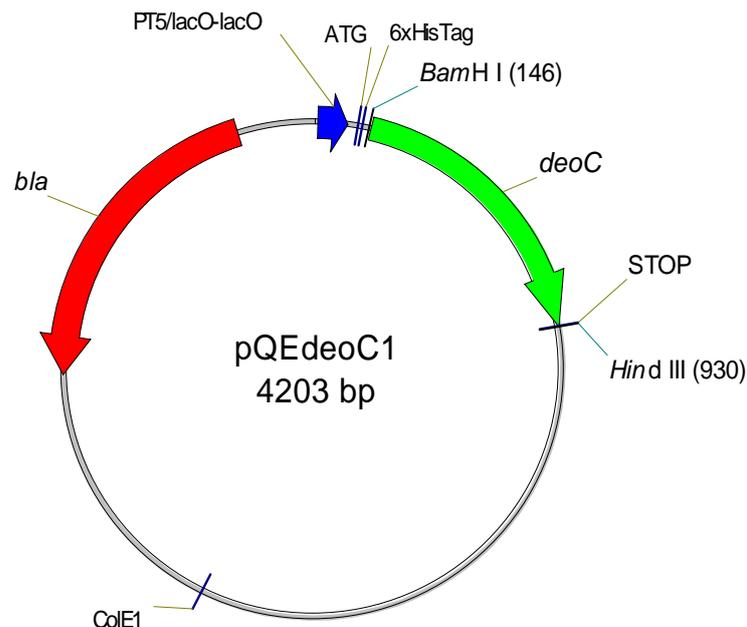


Figura 4.19. Esquema del plásmido pQE*deoC*1

Los resultados de la evaluación de la expresión de DERA recombinante se muestran en la figura 4.20. La figura 4.20 muestra una banda muy significativa (B) de aproximadamente 30 kDa que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína DERA, la cual no se observa en el control no inducido (C). Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión del gen clonado en M15 (pQEdecoC1) funciona de manera adecuada y que la proteína se está expresando en forma soluble en el citoplasma de las células. Por otro lado, se observa que la banda de DERA de la cepa M15 (pQEdecoC1) es de mayor intensidad que la banda obtenida con la cepa DH5 α (pVH-17) para una misma cantidad de células, indicando que se ha incrementado significativamente la expresión de DERA empleando el sistema pQE.

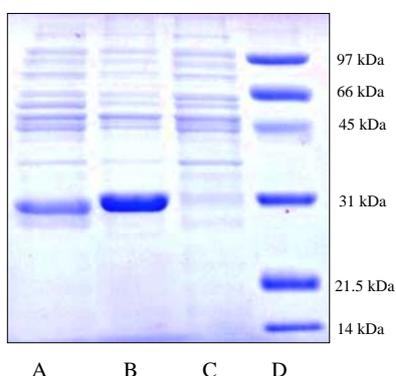


Figura 4.20. Análisis de proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie de:

- A. *E. coli* DH5 α (pVH-17)
- B. *E. coli* M15 (pQEdecoC1) con 50 μ M IPTG
- C. *E. coli* M15 (pQEdecoC1) sin IPTG (control)
- D. Marcador de Peso Molecular

A pesar de que la expresión de DERA en *E. coli* DH5 α (pVH-17) debiera ser un proceso altamente regulado, se observa que la cantidad de DERA es significativa y mayor que una cepa DH5 α no recombinante (datos no mostrados). Esto pudiera deberse a que el alto número de plásmidos por célula conteniendo regiones promotoras supere estequiométricamente el número de proteínas represoras, por lo que al quedar libres los sitios promotores, se favorezca la transcripción del gen *deoC* (control negativo). De esta forma, la expresión de DERA en esta construcción puede asumirse como "constitutiva".

El hecho de que la expresión de DERA en DH5 α (pVH-17) no requiera de IPTG resulta atractivo desde el punto de vista económico, ya que se prescindiría de la utilización este costoso reactivo para la producción de la enzima. Partiendo de esta idea, se ha diseñado una estrategia para la construcción de un plásmido de expresión constitutiva de DERA con cola de histidinas en el extremo C-terminal para facilitar su purificación.

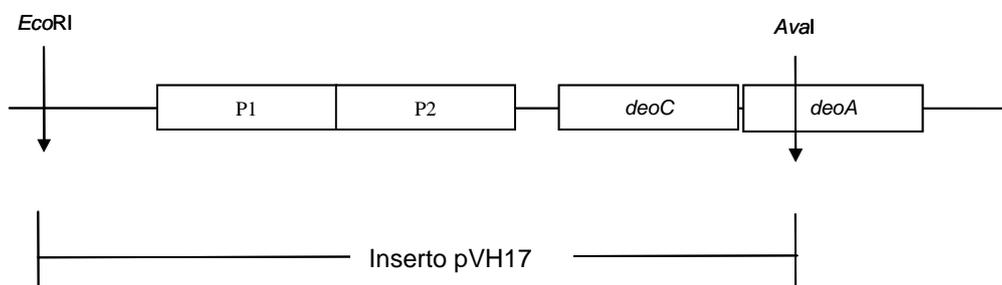
4.6.1 Clonación del fragmento *deoC2* en pBR322

Con el objetivo de evaluar el potencial de operar con un plásmido de expresión constitutiva para la expresión de DERA, se diseñó una estrategia en la cual, por medio de

PCR, se amplificó un fragmento a partir del plásmido pVH-17 que contiene el gen de la 2-desoxiribosa 5-fosfato aldolasa y las regiones promotoras PO₁ y PO₂ de *E. coli* K-12. Este fragmento se clonaría en el plásmido pBR322, insertando además una secuencia 6xHisTag en el extremo C-terminal del gen *deoC* para facilitar la posterior purificación de la enzima.

Amplificación del segmento *deoC2*

Una vez extraído el plásmido pVH-17, se procedió a amplificar la región del plásmido pVH-17 que contiene las regiones promotoras del operón *deo* y del gen *deoC* por PCR. Para ello, se diseñaron un par de primers en los que se incluyó la diana *AatII* en el extremo 5' y la diana *AvaI* en el extremo 3' con la finalidad de clonar el producto amplificado en el plásmido pBR322 (amp^r)



Los *primers* empleados fueron:

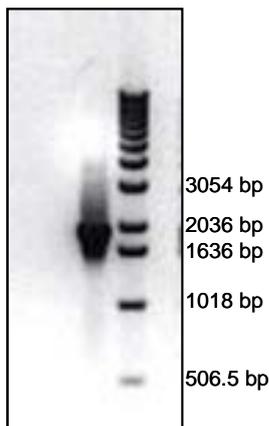
Forward primer (5yjjl-2):

5'-ATATGTGACGTCGAATTCACACCGCGCATCGATGATGG-3'
AatII EcoRI

Reverse primer (3deoC6xHis2):

5'-ACAGATCCCGAGTTAATGGTGATGGTGTGCGTAGCTGCTGGCGCTCTTACCG-3'
AvaI STOP 6xHisTag

Nota: se eliminó el codon TAA (STOP) del gen *deoC* en la secuencia original y se incluyó después de la cola de histidinas. *AvaI* (C↓[T,C]CG[A,G]G)



Se purificó el producto de PCR y se corrió un gel de agarosa 1 % para determinar el tamaño del producto amplificado (1929 bp teóricos; figura 4.21)

Figura 4.21. Gel de agarosa al 1 %. Se observa una banda de aprox. 1.9 Kb la cual corresponde al segmento de DNA *deoC2* (contiene las nuevas dianas de restricción *AatII* y *AvaI*) amplificado por PCR usando los oligos 5yjj-2 y 3deoC6xHis2 (30 ciclos; T_m = 50 °C).

El plásmido pBR322 se cortó con *Aat*II y *Ava*I, obteniéndose dos fragmentos (1499 bp y 2862 bp). Paralelamente, se digirió el producto de PCR *deoC2* con *Aat*II y *Ava*I. La banda de 2862 bp del plásmido pBR322 y la de 1929 bp de la secuencia *deoC2* se cortaron y purificaron para posteriormente ser ligadas empleando T4 DNA ligasa según el protocolo recomendado para extremos cohesivos, obteniéndose el plásmido **pBRdeoC2**.

El producto de ligación se empleó posteriormente para transformar células de *E. coli* DH5 α por electroporación. Los clones positivos (amp^r) se estudiaron mediante análisis de restricción de los plásmidos recombinantes con *Aat*II y *Ava*I, seleccionando aquellos que incorporaron el inserto *deoC2*.

Incorporación de secuencia terminadora de transcripción del fago t_0

El siguiente paso a realizar para la construcción del plásmido de expresión constitutiva de DERA consistió en incluir una secuencia de terminación de transcripción (figura 4.22), ya que la del operón *deo* se eliminó cuando se amplificó por PCR el fragmento *deoC2*. Ello permitiría incrementar la estabilidad del RNAm (Arndt and Chamberlin 1990) y mejorar el rendimiento intracelular de DERA recombinante.

Para ello, se incluyó la secuencia terminadora de transcripción del fago t_0 en el plásmido pBRdeoC2 amplificándola por PCR a partir del plásmido pQE-40 e insertando dianas de restricción adecuadas (*Mro*I/*Ava*I)

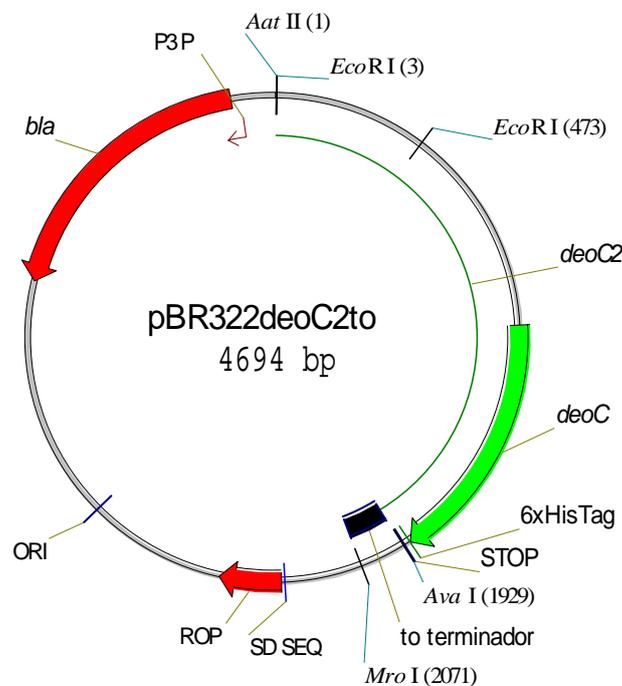


Figura 4.22. Esquema del plásmido de expresión constitutiva pBR322deoC2to

Las cepas transformantes *E. coli* DH5 α (pBRdeoc2to) se cultivaron 16 horas a 37°C y 250 rpm en Erlenmeyers con medio LB con ampicilina para estudiar su capacidad de expresión del gen. Paralelamente, se cultivaron las cepas *E. coli* M15 (pQEdeoc1) y DH5 α (pVH-17) como controles.

La figura 4.23 muestra una banda de aproximadamente 30 kDa de dos clones de *E. coli* DH5 α (pBRdeoc2to) con un peso molecular semejante a la proteína DERA recombinante obtenida con M15 (pQEdeoc1). La banda, que correspondería a la DERA recombinante con cola de histidinas en C-terminal, obtenida con el plásmido de expresión constitutiva pBRdeoc2to es de menor intensidad comparada con la cepa M15 (pQEdeoc1) para una misma cantidad de células. A pesar de ello, el sistema podría llegar a ser optimizado mediante el estudio de las condiciones de cultivo, medios y estrategias operacionales para incrementar los rendimientos de la enzima.

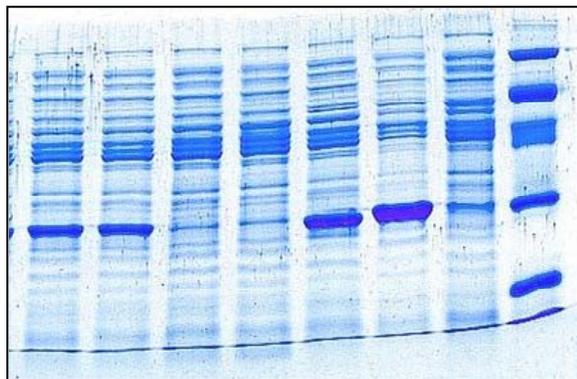


Figura 4.23. Análisis de proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie de:

(A, B): *E. coli* DH5 α (pBRdeoc2to).

(C, D): *E. coli* DH5 α (pBR322)

(E): *E. coli* DH5 α (pVH-17)

(F): *E. coli* M15 (pQEdeoc1) inducida con IPTG

(G): *E. coli* M15 (pQEdeoc1) no inducida

H. Marcadores de peso molecular (kDa): 97.4; 66.2; 45; 31; 21.5; 14.4

A B C D E F G H

Características de la proteína recombinante DERA

A partir de la cepa *E. coli* M15 (pQEdeoc1):

- Subunidad monomérica: 29.1 kDa. La enzima nativa DERA contiene 259 aminoácidos mientras que la proteína recombinante obtenida a partir de pQEdeoc1 contiene 271 aminoácidos.
- N-terminal: 12 aminoácidos adicionales (incluye cola de 6 histidinas)
- C-terminal: 0 aminoácidos adicionales

	1	11	21	31	41	51	
1	MRGSHHHHHH	GSMTDLKASS	LRALKLMDLT	TLNDDDTDEK	VIALCHQAKT	PVGNTAAICI	60
61	YPRFIPiARK	TLKEQGTPEI	RIATVTNFPH	GNDDIDIALA	ETRAAIAYGA	DEVVVFPYR	120
121	ALMAGNEQVG	FDLVKACKEA	CAAANVLLKV	IIETGELKDE	ALIRKASEIS	IKAGADFIKT	180
181	STGKVAVNAT	PESARIMMEV	IRDMGVEKTV	GFKPAGGVRT	AEDAQKYLAI	ADELFGADWA	240
241	DARHYRFGAS	SLLASLLKAL	GHGDGKSASS	Y			

Número de aminoácidos: 271
Peso molecular: 29132.2
Punto isoeléctrico teórico (PI): 6.21

A partir de la cepa *E. coli* DH5 α (pBRdeoC2to):

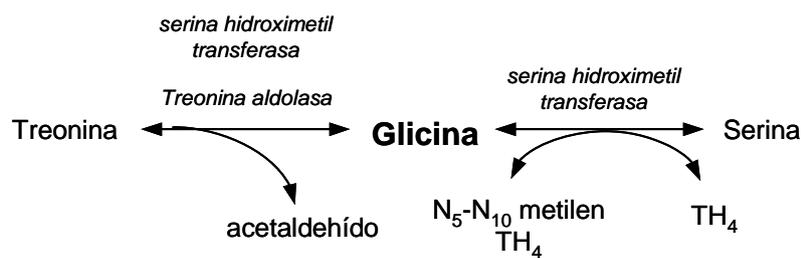
- Subunidad monomérica: 28.6 kDa. La enzima nativa DERA contiene 259 aminoácidos mientras que la proteína recombinante obtenida a partir de pBRdeoC2to contiene 266 aminoácidos.
- N-terminal: 0 aminoácidos adicionales
- C-terminal: 7 aminoácidos adicionales (incluye 1 alanina y cola de 6 histidinas)

	1	11	21	31	41	51	
1	MTDLKASSLR	ALKLMDLNTL	NDDDTDEKVI	ALCHQAKTPV	GNTAAICIYP	RFIPIARKTL	60
61	KEQGTPEIRI	ATVTNFPHGN	DDIDIALAET	RAAIAYGADE	VDVVPYRAL	MAGNEQVGF	120
121	LVKACKEACA	AANVLLKVII	ETGELKDEAL	IRKASEISIK	AGADFIKTST	GKVAVNATPE	180
181	SARIMMEVIR	DMGVEKTVGF	KPAGGVRTAE	DAQKYLAIAD	ELFGADWADA	RHYRFGASSL	240
241	LASLLKALGH	GDGKSASSYA	HHHHHH				

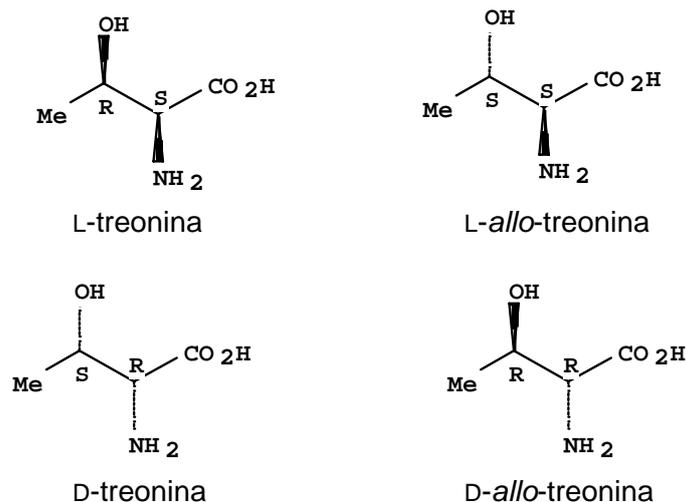
Número de aminoácidos: 266
Peso molecular: 28640.7
Punto isoeléctrico teórico (PI): 6.06

4.7 CLONACIÓN DE TREONINA ALDOLASAS

La treonina aldolasa (EC 4.1.2.5) cataliza la interconversión reversible entre algunos β -hidroxi- α -aminoácidos (i.e. L-treonina) y glicina más su correspondiente aldehído (i.e. acetaldehído).



Actualmente, se pueden clasificar en dos grandes grupos basándose en su estereoespecificidad sobre la reacción de clivaje hacia el carbono α de la treonina: tipo L y tipo D. A su vez, se han descrito tres tipos L basados en su estereoespecificidad hacia el carbono β de la treonina: a) L-*allo*-treonina específica, b) L-treonina específica, c) L-treonina de baja especificidad, la cual puede actuar sobre ambos sustratos (Liu et al. 2000). De manera similar, las treonina aldolasas de tipo D podrían clasificarse de la misma manera.



La L-treonina aldolasa de baja especificidad se encuentra ampliamente distribuida en varios microorganismos, entre los cuales se citan: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Arthrobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus mesentericus*, *Staphylococcus aureus*, *Xantomonas campestris*, y levaduras del género *Candida*. Por otro lado, las L-TA y L-allo TA específicas se han reportado solo en algunos casos concretos. A diferencia del tipo L, la TA de tipo D solo se ha detectado la D-TA de baja especificidad y ha sido hallada en *Arthrobacter sp* y *Alcaligenes xylosoxidans*. De hecho, las D-allo-TA y D-TA no se han reportado hasta la fecha. Una característica importante de todas estas enzimas es que utilizan fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor en el centro activo, lo que hace que su pH óptimo de actividad sea ligeramente alcalino.

Un hecho relevante sobre la treonina aldolasa es que durante mucho tiempo se pensó que la serina hidroximetil transferasa y la treonina aldolasa eran la misma enzima. Esta confusión surgió a raíz de los estudios realizados sobre la SHMT de hígado de conejo, donde se reportó que esta enzima tenía ambas actividades (Schirch and Gross 1968). A partir de ese momento, se aceptó que la vía de degradación de treonina era catalizada por la SHMT, asumiendo que ambas actividades eran producto de una misma proteína. Sin embargo, otros estudios realizados en hígado de rata (Ogawa and Fujioka 1981) encontraron que las preparaciones obtenidas de SHMT no exhibían actividad L-TA.

Durante mucho tiempo, se pensaba que la síntesis intracelular de glicina en *E. coli* era llevada a cabo principalmente por la SHMT cuando la glucosa es la principal fuente de carbono (Stauffer et al. 1986). Kimura (Kimura et al. 1997) denomina L-treonina aldolasa a la actividad asociada a la SHMT (codificada por el gen *glyA*) en *E. coli*. Sin embargo, Liu (Liu et al. 1998) demostró que existe un gen (*ItaE*) que codifica para una L-TA

termoestable de baja especificidad. El hallazgo de esta enzima implica que existe un mecanismo alternativo para la síntesis de glicina diferente a la reacción catalizada por la SHMT, el cual sería relevante cuando la SHMT es inerte.

Basándonos en el trabajo de Liu (Liu et al. 1998), se decidió clonar la L-TA de *E. coli* codificada por el gen *ltaE*. Además, se buscó otra fuente original de treonina aldolasa sobre la cual no existían datos sobre su sobreexpresión y utilización para la síntesis de β -hidroxi- α -aminoácidos. Para ello, se escogió la cepa de *Streptococcus thermophilus* YKA-184 hiperproductora de acetaldehído, la cual fue suministrada por el Profesor N. Tzanetakys de la Universidad de Thessaloniki (Grecia).

S. thermophilus es una de las bacterias involucradas en la fermentación de la leche para la elaboración del yogurt. El típico sabor del yogurt es causado por el ácido láctico, el cual proporciona un gusto ácido y refrescante, además de una mezcla de otros compuestos, tales como acetona, diacetilo y acetaldehído, considerándose éste último el principal componente del sabor y aroma. La relativa alta concentración de acetaldehído (5 – 20 mg l⁻¹) encontrada en el yogurt es debida a la baja tasa de utilización de este metabolito por parte de las bacterias ácido-lácticas, las cuales carecen de la enzima para la conversión de acetaldehído en etanol (alcohol deshidrogenasa) (Lees and Jago 1976). Por otro lado, existen varias vías metabólicas para la formación de este compuesto, siendo una de ellas la conversión de treonina en glicina. En *S. thermophilus*, la única enzima descrita con actividad TA es la SHMT (SHMT; E 2.1.2.1).

4.7.1 Clonación del gen *ltaE* de *E. coli* K-12

Este gen codifica para una L-treonina aldolasa termoestable de baja especificidad (Liu et al. 1998). Para ello, se introdujo una diana de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y la diana *Hind*III en el extremo 3' del gen *ltaE* amplificado por PCR (figura 4.24) con la finalidad de clonar el producto amplificado en el plásmido pQE-40.

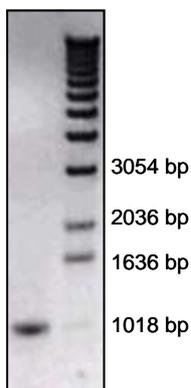


Figura 4.24. Gel de agarosa al 1 %. Se observa la banda de 1.0 Kb la cual corresponde al gen *ltaE* amplificado por PCR usando los oligos 5ltaE y 3ltaE (30 ciclos).

Una vez clonado el gen *ltaE* en el plásmido pQE-40, obteniéndose el plásmido pQEItaE (figura 4.25), se transformaron células competentes de *E. coli* M15 (pREP-4).

Los clones positivos se analizaron para comprobar la incorporación del inserto y para estudiar su capacidad de expresar la proteína recombinante LTA en medio LB según el protocolo 3.9.1 y 3.14.1 (materiales y métodos).

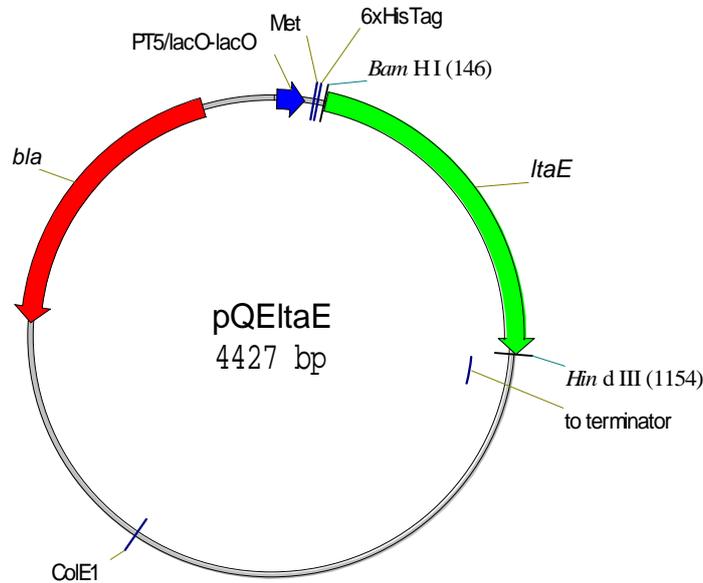


Figura 4.25. Esquema del plásmido pQEItaE

La figura 4.26 muestra una banda significativa (A) de aproximadamente 36 kDa que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína LTA recombinante, la cual no se observa en el control no inducido (B). Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión del gen clonado en M15 (pQEItaE) funciona de manera adecuada y que la proteína se está expresando en forma soluble en el citoplasma de las células.

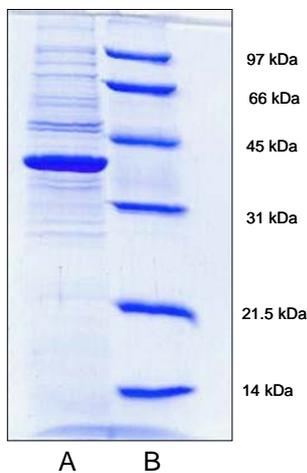


Figura 4.26. Análisis de proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie de:

- A. *E. coli* M15 (pQEItaE) inducido con IPTG
- B. Marcadores de peso molecular

Solo muestra el cultivo inducido debido a que el resultado del control se deterioró durante el proceso del secado del gel.

La secuencia teórica de aminoácidos de la proteína recombinante LTA de *E. coli* se muestra a continuación, así como el análisis teórico del peso molecular, PI, composición de aminoácidos (<http://kr.expasy.org/tools/protparam.html>)

	1	11	21	31	41	51	
1	MRGSHHHHHH	GSMIDLRSDT	VTRPSRAMLE	AMMAAPVGDD	VYGDDPTVNA	LQDYAAELSG	60
61	KEAAIFLPTG	TQANLVALLS	HCERGEYIV	GQAAHNYLFE	AGGAAVLGSI	QPQPIDAAAD	120
121	GTLPLDKVAM	KIKPDDIHFA	RTKLLSLENT	HNGKVLPREY	LKEAWEFTRE	RNLALHVDGA	180
181	RIFNAVWAYG	CELKEITQYC	DSFTICLSKG	LGTFVGSLLV	GNRDYIKRAI	RWRKMTGGGM	240
241	RQSGILAAAG	IYALKNNVAR	LQEDHDNAAW	MAEQLREAGA	DVMRQDTNML	FVRVGEENAA	300
301	ALGEYMKARN	VLINASPIVR	LVTHLDVSRE	QLAEVAAHWR	AFLAR		

Número de aminoácidos: 345
Peso molecular: 37893.1
Punto isoeléctrico teórico (PI): 6.27

4.7.2 Clonación del gen *glyA* de *S. thermophilus* YKA-184.

Para el momento en que esta parte del trabajo se comenzó, el genoma de *S. thermophilus* (1.8 Mb) se encontraba en proceso de secuenciación por la Université Catholique de Louvain (www.biol.ucl.ac.be/gene/genome/introduction.html). El acceso a los resultados estaba restringido, y solo se podía acceder a una base de datos de los posibles ORFs > 100 bp traducidos. La secuencia pública de aminoácidos correspondiente a *glyA* era:

SHMT (*glyA*) de *S. thermophilus*

>C105_50 [8416 - 9681]

TSKETSMIFDKEDYKAFDPELWNAIDAEAERQQNNIELIASENVVSKAVMAAQGTLLTNK
YAEGYPGKRYYGGAVIDVETLAIERAKKLFVGFANVQPHSGSQANAAVYMSLIQPG
DTVMGMDLSAGGHLTHGAPVSFSGKTYNFVSYNVDKESELLDYDAILAQAKEVRPKLIVA
GASAYSRIIDFAKFREIADAVGAYLMVDMAHIAAGLVASGHHPSPVPYAHVTTTTTHKTLRG
PRGGLILTDDEDIAKKNLSAVFPGLQGGPLEHVIAAKAVALKEALDPAFKEYGENVIKNAA
AMADVFNQHPDFRVISGGTNNHLFLVDVTKVVENGVKVAQNVLEEVNITLNKNSIPYEQLS
PFKTSGIRVGSIPAITSRGMGEAESRQIAEWMVEALENHDKPEVLERIRGDVKVLTDAFPL
Y

Una estrategia sencilla para diseñar los *primers* para clonar el gen tuvo lugar a partir del trabajo publicado por Chavez (Chaves et al. 2002) donde reporta la amplificación del gen *glyA* de *S. thermophilus* utilizando un par de *primers* con dianas de restricción específicos para su posterior inserción downstream del promotor *lacA* en el vector pNZ276. Estos *primers* son:

Forward primer: 5'-GCGAAAACTGCAGCCTATTAGACCTCAAAG-3'
*Pst*I

Traducción: AKTAAYStopTSK

Reverse primer: 5'-TATCCGCTCGAGTATTAATAGAGTGGGAAAGC-3'
*Xho*I

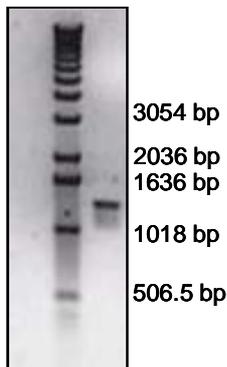
Traducción: AFPLYStopYSSG

En el trabajo de Chavez (Chaves et al. 2002), el fragmento de DNA amplificado (1.2 kb) posee el gen *glyA* incluyendo el RBS, por lo que se supuso que la secuencia TSKETS publicada en a base de datos del proyecto de la Université Catholique de Louvain no pertenecía a la proteína y que más bien, fuera un error.

Ya que la secuencia del *forward primer* empleada por Chavez (Chaves et al. 2002) no revelaba información sobre las secuencias de los primeros aminoácidos de la SHMT, se decidió amplificar y clonar el mismo fragmento clonado por Chavez en un plásmido pUC18 empleando sus mismos *primers*, pero, modificando las dianas de restricción

Forward primer (5SHMT): 5'-GCGAAAACCCGGGCCTATTAGACCTCAAAG-3'
*Sma*I

Reverse primer (3SHMT): 5'-TATCCGCTGCAGTATTAATAGAGTGGGAAAGC-3'
*Pst*I



El producto de PCR usando los oligos 5SHMT y 3SHMT sobre DNA genómico de *S. thermophilus* YKA-184 (30 ciclos, $T_m = 46\text{ }^\circ\text{C}$) se corrió en un gel de agarosa 1 % (figura 4.27) para determinar el tamaño del producto amplificado (1.2 Kb teóricos)

Figura 4.27. Gel de agarosa al 1 %. Se observa la banda de 1.2 Kb la cual corresponde en longitud con el segmento amplificado por Chavez (Chaves et al. 2002).

La banda amplificada de 1.2 Kb se cortó, purificó y clonó en pUC18. El nuevo plásmido pUCglyA1 se introdujo en *E. coli* DH5 α por electroporación. El plásmido pUCglyA1 se secuenció utilizando *primers* específicos diseñados para secuencias insertadas entre *Pst*I y *Sma*I. El resultado de la secuenciación permitió establecer la secuencia de nucleótidos de los 6 primeros aminoácidos de la SHMT (MIFDKE) y construir nuevos *primers*

(5glyA1/3glyA1) para amplificar únicamente la secuencia correspondiente a la SHMT y clonarla en el vector pQE40

El nuevo fragmento amplificado (1.2 Kb) se subclonó en la diana *Sma*I del plásmido pUC18 (extremos romos) y se transformaron células de *E. coli* DH5 α por electroporación, seleccionando los clones positivos por selección x-gal (colonias blancas). Se analizaron los clones positivos extrayendo los plásmidos y cortando secuencialmente con *Bam*HI y *Sal*I. Aquellos clones que mostraron un patrón de bandas de DNA concordante con las dianas de restricción empleadas se seleccionaron. La banda resultante de 1.2 Kb de uno de los clones positivos se cortó, purificó y se insertó en el MCS del vector pQE-40 (*Bam*HI/*Sal*I) para obtener el plásmido pQEglyA1 (figura 4.28).

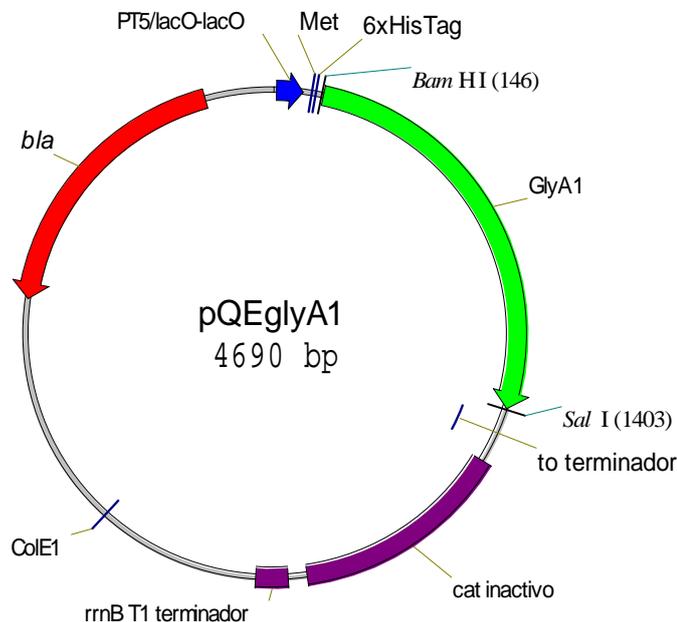


Figura 4.28. Esquema del plásmido pQEglyA

Una vez clonado el gen *glyA* en el plásmido pQE-40, obteniéndose el plásmido pQglyA1, se transformaron células competentes de *E. coli* M15 (pREP-4). Los clones positivos de *E. coli* M15 (pQEglyA1) se analizaron para comprobar la incorporación del inserto y para estudiar su capacidad de expresar la proteína recombinante SHMT en medio LB según el protocolo 3.9.1 y 3.14.1 (materiales y métodos)

La figura 4.29 muestra una banda significativa (B) de aproximadamente 45 kDa que corresponde con el peso molecular esperado de la proteína SHMT recombinante, la cual no se observa en el control no inducido (A). Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión del gen clonado en M15 (pQEItaE) funciona de manera adecuada y que la proteína se está expresando en forma soluble en el citoplasma de las células.

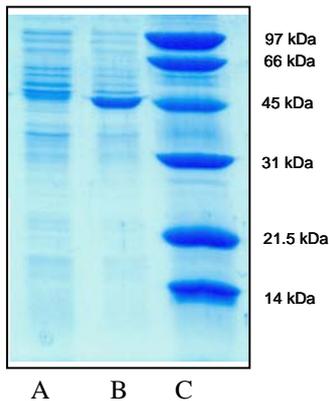


Figura 4.29. Análisis de proteínas citosólicas solubles por SDS-PAGE y teñidas con Coomassie de:

- (A) *E. coli* M15 (pQEglyA1) no inducido (control)
- (B) *E. coli* M15 (pQEglyA1) inducido con IPTG.
- (C) Marcadores de peso molecular

Para comprobar que la amplificación por la polimerasa fue correcta, se seleccionó un clon positivo para secuenciar el inserto del nuevo plásmido (pQEglyA1). El resultado de la secuenciación se contrastó con el resultado de la secuenciación obtenido a partir del fragmento de 1.2 Kb clonado inicialmente en pUC-18, obteniéndose un 100 % de homología.

La secuencia de la proteína recombinante rSHMT de *S. thermophilus* se muestra a continuación, así como el análisis teórico del peso molécula, PI, composición de aminoácidos (<http://kr.expasy.org/tools/protparam.html>)

```

1           11           21           31           41           51
|           |           |           |           |           |
1  MRGSHHHHHH  GSMIFDKEDY  KAFDPELWNA  IDAEAERQQN  NIELIASENV  VSKAVMAAQG  60
61  TLLTNKYAEG  YPGKRYYGGT  AVIDVVETLA  IERAKKLFGA  KFANVQPHSG  SQANAAYVMS  120
121 LIQPGDVTMG  MDLSAGGHLT  HGAPVSFSGK  TYNFVSYNVD  KESELLDYDA  ILAQAKEVRP  180
181 KLIVAGASAY  SRIIDFAKFR  EIADAVGAYL  MVDMAHIAGL  VASGHHPSPV  PYAHVTTTTT  240
241 HKTLRGRPGG  LILTDDEDIA  KKLNSAVFPG  LQGGPLEHVI  AAKAVALKEA  LDPAFKEYGE  300
301 NVIKNAAMA  DVFNQHPDFR  VISGGTNNHL  FLVDVTKVVE  NGKVAQNVLE  EVNITLNKNS  360
361 IPYEQLSPFK  TSGIRVGSFA  ITSRRMGGEAE  SRQIAEWMVE  ALENHDKPEV  LERIRGDVKV  420
421 LTDAFPLY
    
```

(Los aminoácidos en rojo coinciden la región rica en glicina conservada en la mayoría de las SHMT (Usha et al. 1994); el aminoácido en azul corresponde a la sustitución de Val por Ala para la SHMT de esta cepa)

Número de aminoácidos: 428
Peso molecular: 46484.6
Punto isoeléctrico teórico (PI): 5.91

La traducción de la secuencia del gen *glyA* clonado en el vector pQEglyA1 se contrastó con la secuencia de aminoácidos pública para SHMT de *S. thermophilus* (www.biol.ucl.ac.be/gene/genome/blast.html), encontrándose una sustitución del aminoácido Val₈₈ por Ala₈₈ para la cepa YKA-184.

4.8 CONCLUSIONES

El sistema de clonación y expresión *E. coli* M15 pQE-40 ha demostrado ser un sistema muy eficiente para tanto para aldolasas homólogas como heterólogas, ya que:

- Las dianas de restricción del sitio de clonaje múltiple ha permitido la inserción de todas la aldolasas objetivo
- El sistema ha permitido la expresión intracelular de las diferentes aldolasas a niveles elevados (entre 30 – 50 %),
- El control de la expresión es altamente regulado ya que los niveles de expresión basal son bajos
- La expresión de las aldolasas objetivo ha sido en forma soluble, lo que ha permitido la obtención de enzimas funcionales (capítulo 6)
- Es un sistema sencillo de utilizar, y además, potencialmente escalable a bioreactores, lo cual es un aspecto que otros sistemas originales no cumplen en su totalidad, como por ejemplo, los sistemas inducibles por coinfección con fagos.
- Tal como se verá en el capítulo 5, las proteínas se expresan como proteínas con cola de histidinas, lo que permite su purificación en un solo paso de cromatografía de afinidad.

4.9. BIBLIOGRAFIA

- Arndt KM, Chamberlin MJ. 1990. RNA Chain Elongation by Escherichia coli RNA-Polymerase - Factors Affecting the Stability of Elongating Ternary Complexes. *J. Mol. Biol.* 213(1):79-108.
- Bednarski MD, Simon ES, Bischofberger N, Fessner WD, Kim MJ, Lees W, Saito T, Waldmann H, Whitesides GM. 1989. Rabbit Muscle Aldolase as a Catalyst in Organic-Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 111(2):627-635.
- Bissett DL, Anderson RL. 1980. Lactose and D-Galactose Metabolism in *Staphylococcus aureus* .4. Isolation and Properties of a Class I D-Ketohexose-1,6-Diphosphate

- Aldolase That Catalyzes the Cleavage of D-Tagatose 1,6-Diphosphate. *J. Biol. Chem.* 255(18):8750-8755.
- Carrier T, Jones KL, Keasling JD. 1998. mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. *Biotechnol. Bioeng.* 59(6):666-672.
- Crow VL, Thomas TD. 1982. D-Tagatose 1,6-Diphosphate Aldolase from Lactic Streptococci - Purification, Properties, and Use in Measuring Intracellular Tagatose 1,6-Diphosphate. *J. Bacteriol.* 151(2):600-608.
- Chaves A, Fernandez M, Lerayer ALS, Mierau I, Kleerebezem M, Hugenholtz J. 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11):5656-5662.
- Durany O, de Mas C, Lopez-Santin J. 2005. Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry* 40(2):707-716.
- Eyrisch O, Sinerius G, Fessner WD. 1993. Facile Enzymatic Denovo Synthesis and NMR Spectroscopic Characterization of D-Tagatose 1,6-Bisphosphate. *Carbohydr. Res.* 238:287-306.
- Fessner WD, Eyrisch O. 1992. Enzymes in Organic-Synthesis .2. One-Pot Synthesis of Tagatose 1,6-Bisphosphate by Diastereoselective Enzymatic Aldol Addition. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 31(1):56-58.
- Garcia-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong CH. 1995. A New Strategy for the Cloning, Overexpression and One-Step Purification of 3 DHAP-Dependent Aldolases - Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* 3(7):945-953.
- Ghalambor MA, Heath EC. 1962. Metabolism of L-Fucose .2. Enzymatic Cleavage of L-Fuculose 1-Phosphate. *J. Biol. Chem.* 237(8):2427-&.
- Henderson IG-J, E.; Liu, K. K. C.; Chen, Y.-L.; Shen, G.-J.; Wong, C.-H. 1994. Cloning, overexpression and isolation of the Type II FDP aldolase from *E. coli* for specificity study and synthetic application. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2(8):837-843.
- Kimura T, Vassilev VP, Shen GJ, Wong CH. 1997. Enzymatic synthesis of beta-hydroxy-alpha-amino acids based on recombinant D- and L-threonine aldolases. *J. Am. Chem. Soc.* 119(49):11734-11742.
- Kramer W, Elmecker G, Weik R, Mattanovich D, Bayer K. 1996. Kinetic studies for the optimization of recombinant protein formation. *Recombinant DNA Biotechnology* lii: the Integration of Biological and Engineering Sciences. p 323-333.
- Lees GJ, Jago GR. 1976. Formation of Acetaldehyde from Threonine by Lactic-Acid Bacteria. *J. Dairy Res.* 43(1):75-83.

- Lengeler J. 1977. Analysis of Mutations Affecting Dissimilation of Galactitol (Dulcitol) in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 152(1):83-91.
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 1998. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 255(1):220-226.
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 2000. Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 10(1-3):107-115.
- Ogawa H, Fujioka M. 1981. Purification and Characterization of Cytosolic and Mitochondrial Serine Hydroxymethyltransferases from Rat-Liver. *J. Biochem. (Tokyo)*. 90(2):381-390.
- Schirch L, Gross T. 1968. Serine Transhydroxymethylase - Identification as Threonine and Allothreonine Aldolases. *J. Biol. Chem.* 243(21):5651-&.
- Stauffer LT, Plamann MD, Stauffer GV. 1986. Cloning and Characterization of the Glycine-Cleavage Enzyme-System of *Escherichia coli*. *Gene* 44(2-3):219-226.
- Usha R, Savithri HS, Rao NA. 1994. The Primary Structure of Sheep Liver Cytosolic Serine Hydroxymethyltransferase and an Analysis of the Evolutionary Relationships among Serine Hydroxymethyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*:75-83.
- Valentin-Hansen P, Aiba H, Schumperli D. 1982. The Structure of Tandem Regulatory Regions in the deo Operon of *Escherichia coli*-K12. *EMBO J.* 1(3):317-322.
- Van Rooijen RJ, Vanschalkwijk S, Devos WM. 1991. Molecular-Cloning, Characterization, and Nucleotide-Sequence of the Tagatose 6-Phosphate Pathway Gene-Cluster of the Lactose Operon of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 266(11):7176-7181.
- Viaplana E, Villaverde A. 1996. Polylinker-encoded peptides can confer toxicity to recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 12(5):723-727.
- Wilms B, Hauck A, Reuss M, Syldatk C, Mattes R, Siemann M, Altenbuchner J. 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 73(2):95-103.

5. PURIFICACIÓN DE ALDOLASAS RECOMBINANTES PRODUCIDAS EN *E. coli*

Uno de los objetivos en la purificación de proteínas es la obtención del máximo rendimiento de proteína pura en el menor número de pasos, lo cual no solo favorece la estabilidad de la proteína, sino también disminuye los costes de producción. La mayoría de los procesos de purificación requieren de más de un paso para conseguir el grado de pureza deseado, lo que puede provocar pérdida del producto. En este caso, se ha empleado un solo paso cromatográfico para purificar las enzimas recombinantes aprovechando la presencia de las colas de histidinas en el extremo N-terminal. Un esquema general del proceso de purificación de las aldolasas producidas se muestra en la figura 5.1.

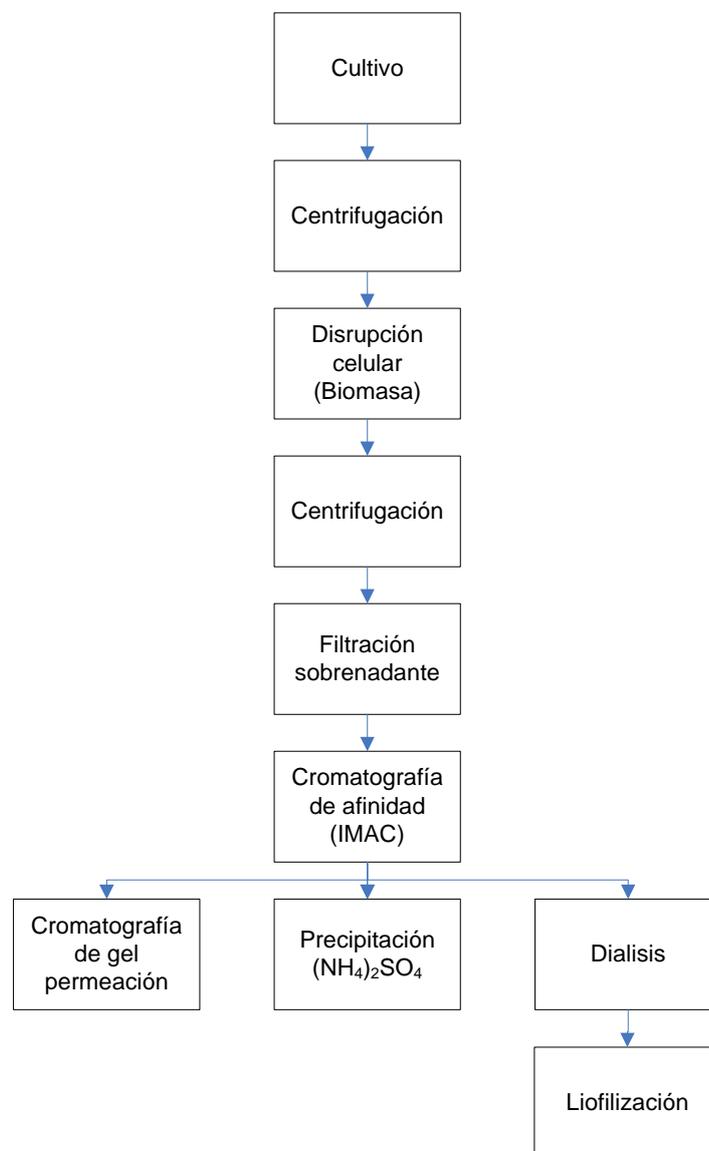


Figura 5.1. Esquema general del proceso de purificación de aldolasas a partir de células de *E. coli* M15 inducidas con IPTG. IMAC: Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados.

Las adolasas recombinantes objetivo han sido producidas como proteínas intracelulares solubles en *E. coli* M15 (capítulo 4), por lo que el proceso de purificación se debe iniciar recuperando la biomasa, siendo el método más sencillo la centrifugación del caldo de cultivo.

A continuación, la biomasa recuperada debe ser sometida a un proceso de disrupción celular para liberar el contenido intracelular, para lo cual, existen varios métodos:

a) Métodos mecánicos: generalmente, los productos intracelulares son liberados por ruptura física de la pared celular, liberando los componentes intracelulares al medio. Son necesarios equipos, tales como homogenizadores, molinos de bolas, ultrasonidos, French Press, etc.

b) No mecánicos: se basan en la ruptura de la célula a través de métodos que involucran la permeabilización química, mecánica o enzimática de la pared celular.

En base a la experiencia previa del grupo de investigación de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada de la UAB, obtenida con la enzima FucA recombinante (Durany 2000; Suau 2001) se ha seleccionado el método de ultrasonidos. Este método ha sido ampliamente utilizado en el laboratorio y se basa en la lisis celular a través de sonidos de alta frecuencia, producidos electrónicamente y transportados a través de una vara metálica a una suspensión celular concentrada.

Este método, al igual que los otros métodos de disrupción celular, tiene el inconveniente de que todos los materiales intracelulares son liberados. Por consiguiente, el producto de interés debe ser separado de una mezcla compleja de proteínas, ácidos nucleicos y fragmentos de pared celular. Por un lado, los ácidos nucleicos pueden incrementar la viscosidad de la solución, complicando los subsecuentes pasos de purificación, especialmente la cromatografía. Por otro lado, el *debris* celular producido por la lisis mecánica hace difícil la clarificación de la muestra.

Un método para solucionar este último problema consiste en la filtración del lisado celular. Mediante este método, el *debris* celular es retenido en una membrana, mientras que el resto de los componentes celulares la atraviesa. Este método se seleccionó para el procesamiento de las muestras, en parte debido a su sencillez y por otro, los buenos rendimientos previos obtenidos en cuanto a actividad enzimática.

Así, el lisado de células, después de centrifugado para minimizar la cantidad de *debris* celular, debe ser filtrado a través de una membrana (0.45 μ M). El filtrado obtenido queda listo para ser introducido en la columna de cromatografía de afinidad. Una vez que

el lisado se ha cargado en la columna, la enzima recombinante es eluída de la columna mediante altas concentraciones de imidazol.

Un aspecto muy importante a la hora de utilizar las enzimas purificadas como biocatalizadores en reacciones de síntesis es que éstas no presenten otros elementos diferentes a la proteína. La adición de otros componentes diferentes al biocatalizador durante una síntesis puede no solo interferir en la reacción, sino también adicionar contaminantes no deseados al producto final. Por ello, se hace imprescindible la eliminación del tampón fosfato-imidazol que acompaña a la enzima después de su purificación por cromatografía de afinidad.

Existen diversas estrategias para eliminar el tampón fosfato-imidazol, tales como gel filtración, precipitación o diálisis. En todos los casos, la adición de pasos adicionales puede repercutir en el rendimiento final de la aldolasa, por lo que la búsqueda de una estrategia definitiva debe ser analizada individualmente. A continuación, se presentan un resumen de la purificación llevada a cabo por cromatografía de afinidad para las diferentes aldolasas estudiadas

5.1 PRIMERA ETAPA: CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD DE METALES INMOVILIZADOS (IMAC)

Para llevar a cabo la purificación de las aldolasas recombinantes a partir de lisados crudos de *E. coli* M15, se utilizó un polímero de agar funcionalizado con IDA (ácido iminodiacético) para la unión del ión Ni^{2+} . Esta tecnología permite purificar en un solo paso proteínas que contienen una cola de 6 histidinas (6xHisTag) bajo condiciones nativas o desnaturalizantes. IDA es un adsorbente capaz de quelar iones metálicos tales como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , ocupando 3 sitios de unión de la esfera de coordinación de los iones, dejando sitios libres (3 en el caso del níquel) para interactuar con los residuos de histidina.

El anillo de imidazol es una parte de la estructura del aminoácido histidina (figura 5.2). Los anillos de imidazol en los residuos histidina de la proteína recombinante se unen a los iones níquel inmovilizados por los grupos IDA de la matriz. El imidazol mismo también puede unirse a los iones níquel y, por un mecanismo competitivo, puede llegar a desplazar los residuos histidina de las proteínas. A bajas concentraciones de Imidazol (hasta 20 mM) se previene las uniones no específicas y de baja afinidad de otras proteínas, mientras que las que poseen la estructura 6xHistag se unen fuertemente.

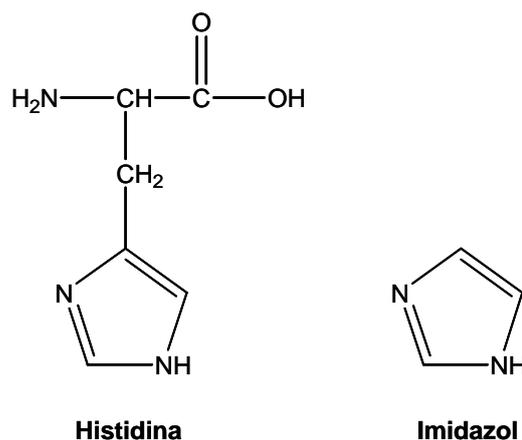


Figura 5.2. Representación de la estructura del aminoácido histidina y del anillo imidazol.

Es importante destacar que, en algunos casos, la cola de histidina (6xHisTag) se oculta dentro de la estructura terciaria de la proteína nativa, de manera que para poder purificarlas, sería necesario desnaturalizarlas para luego purificarlas por afinidad. Sin embargo, esta situación no se presentó en ninguno de las enzimas producidas.

Para la purificación por cromatografía de afinidad, se procedió a pasar el extracto crudo filtrado a través de columnas con *Chelating Sepharose® Fast Flow* cargados con níquel o cobalto. La figura 5.3 y 5.4 muestran un pico de proteínas que eluye después de que la concentración de imidazol es superior a 400 mM. El análisis por SDS-PAGE de las fracciones colectadas reveló en todos los casos la presencia de la proteína de interés (RhuA, FucA, FruA, TagA, LTA, SHMT, DERA) con un alto grado de pureza (>90 %) (Figura 5.5). A pesar de que normalmente hay pérdida de proteínas en cada paso cromatográfico, esta metodología permitió recuperar más del 90 % de la proteína total del extracto crudo en todos los casos.

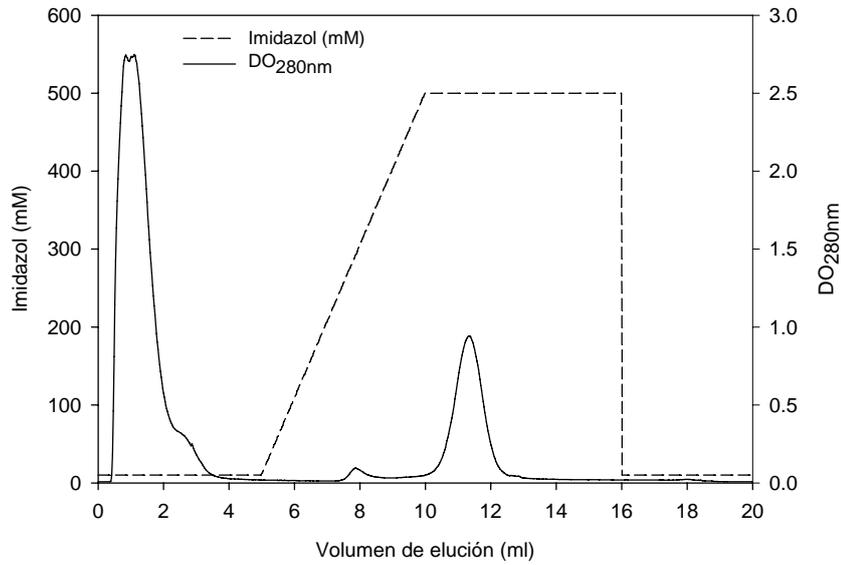


Figura 5.3. Perfil de elución de proteínas de la columna preempacada (1 cm^3) HisTrap™ Chelating (Pharmacia Biotech) cargada con níquel empleando un gradiente de imidazol (10 - 500 mM). Flujo de operación = 1 ml min^{-1}). El ejemplo particular corresponde a RhuA.

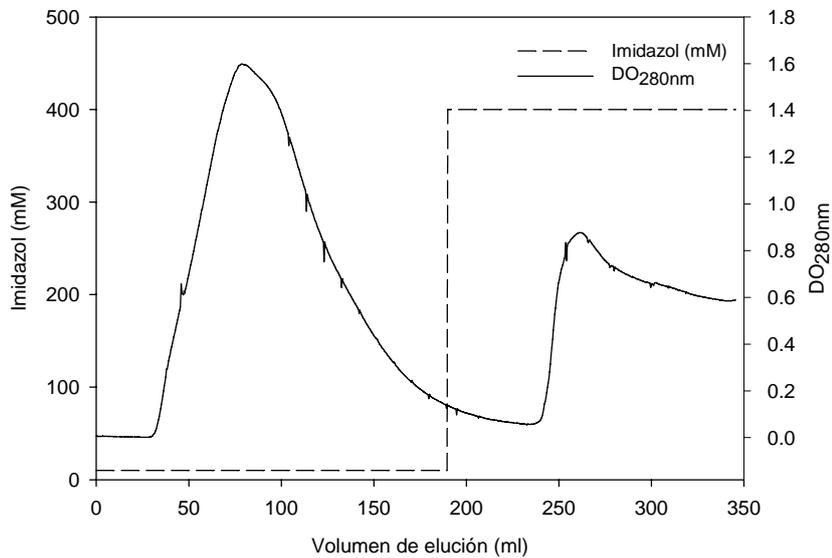


Figura 5.4. Perfil de elución de proteínas de la columna XK 50/20 (Amersham Pharmacia Biotech) termostatzada con un volumen de empaque de 50 cm^3 cargada con níquel. Flujo de operación = 5 ml min^{-1} . La elución se realiza mediante un flujo isocrático de tampón 400 mM imidazol. El ejemplo particular corresponde a LTA.

Las siguientes figuras muestran el análisis por SDS-PAGE de las fracciones puras obtenidas de las diferentes aldolasas recombinantes después de pasar por la columna de afinidad.

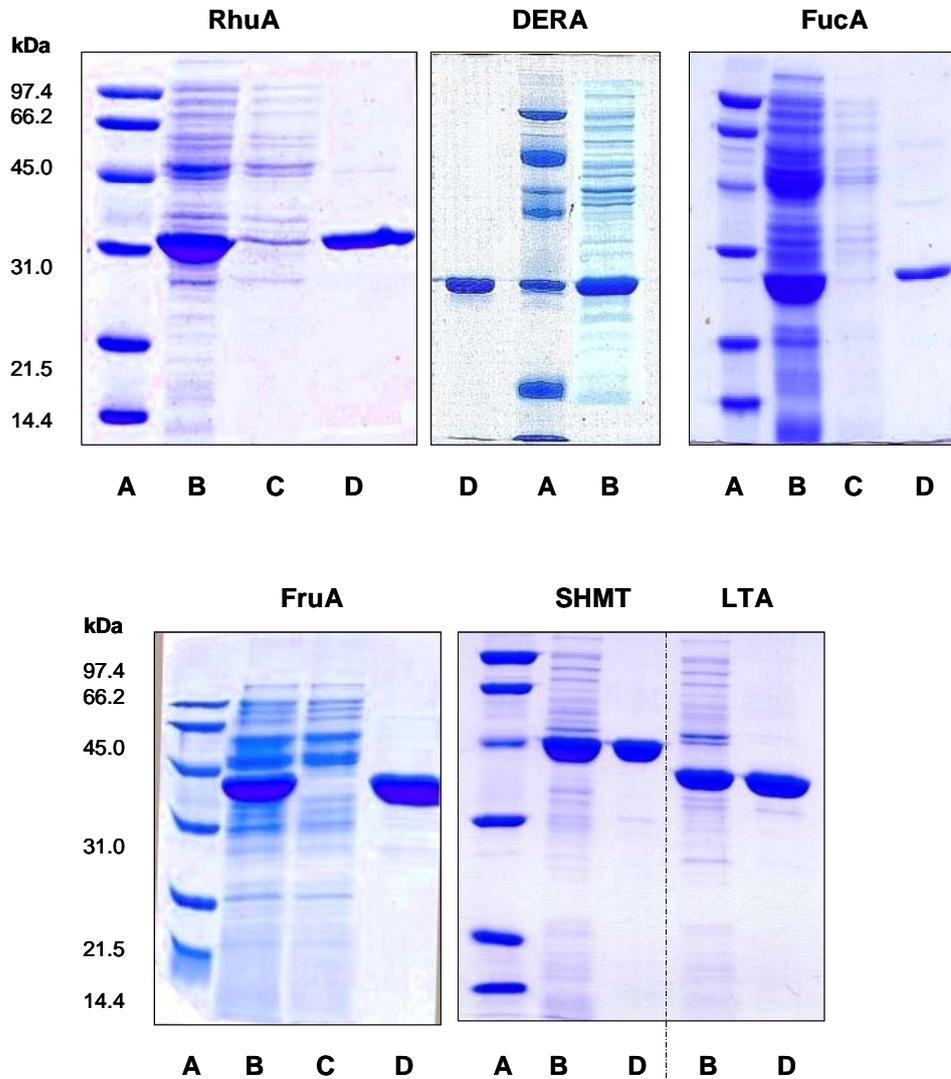


Figura 5.5. Geles al 7.5 % de SDS-PAGE de la purificación de diferentes aldolasas por cromatografía de afinidad. Líneas A = Marcador de peso molecular; B = Extracto crudo del sobrenadante de células de *E. coli* M15 inducidas con IPTG y sonicadas. C = Fracción no retenida de la columna de afinidad (10 mM imidazol); D = Fracción de elución 400 mM imidazol conteniendo la aldolasa pura.

5.2 PURIFICACIÓN DE ALDOLASAS DEPENDIENTES DE DHAP (RhuA, FucA, FruA)

5.2.1 Purificación de RhuA

El esquema general empleado para purificación de RhuA está basado en un paso por cromatografía de afinidad y posterior eliminación del tampón fosfato-imidazol mediante gel permeación. Debido a que ésta fue la primera enzima objetivo del presente trabajo, solo se disponía de columnas preempacadas, por lo que el solo se trabajo a pequeña escala. Los resultados de la purificación empleando la estrategia señalada se muestran en la tabla 5.1.

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Grado purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	84.7	25.4	3.3	1	100
Cromatografía afinidad	57.4	9.6	5.3	1.5	68
Cromatografía gel permeación	43.5	7.8	5.6	1.7	76
				GLOBAL	52

Tabla 5.1. Purificación de RhuA recombinante de *E. coli*. La actividad se determinó mediante el método descrito en materiales y métodos. Los rendimientos de purificación son referidos a cada etapa, excepto el global.

Debido a que la resina IDA funciona como un agente quelante de metales, es factible que las pérdidas de actividad enzimática observadas en el paso de cromatografía de afinidad (69 % de rendimiento) se asocien a pérdidas parciales del ión zinc del centro activo de la enzima, el cual es esencial para mantener su actividad catalítica. En el siguiente punto, se abordará este aspecto en mayor profundidad.

Para eliminar el Imidazol presente en las fracciones con la proteína RhuA recombinante se empleó la cromatografía de gel permeación (figura 5.6). Para ello, las fracciones conteniendo la proteína RhuA pura se colectaron y se almacenaron a 4°C por 24 horas. Luego, el imidazol y el tampón fosfato presente en la solución se eliminaron empleando el sistema HisTrap™ Desalting (materiales y métodos, 3.16.6.1)

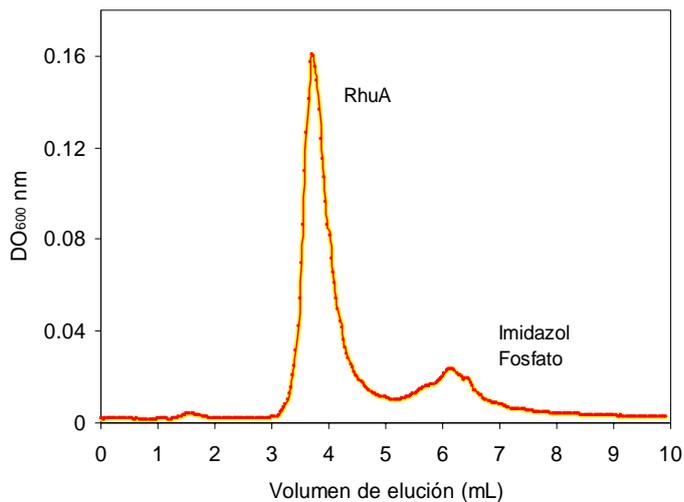


Figura 5.6. Cromatografía de gel permeación de RhuA empleando columnas preempacadas HisTrap™ Desalting. Perfil de elución de la columna HisTrap™ Desalting (Pharmacia Biotech) empleando como fase móvil tampón Tris.HCl 10 mM pH 7.5 (flujo de operación 5 ml min⁻¹). Se observa un pico de proteínas que eluye antes del imidazol y que se identificó como RhuA después del análisis por SDS-PAGE. Tanto el imidazol como el fosfato eluyeron en las fracciones posteriores a 5 ml.

El rendimiento obtenido en la etapa de *desalting* por gel permeación es ligeramente más elevado (76 %) comparado con la etapa de afinidad. El análisis por SDS-PAGE de la fracción pura final muestra una banda muy intensa de RhuA que sugiere una alta concentración de la misma en la solución (figura 5.7). Esta solución se alicuotó en fracciones de 250 µl en tupos Eppendorf y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

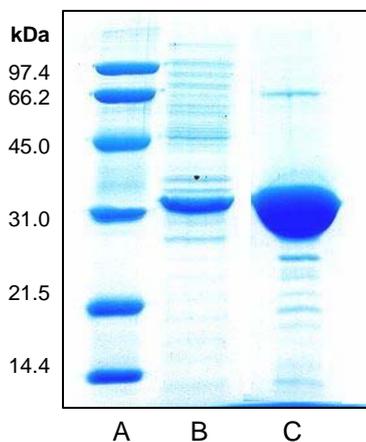


Figura 5.7. Análisis de proteínas por SDS-PAGE de:

- A. Marcador de Peso Molecular.
- B. Extracto crudo del sobrenadante de células de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas con IPTG y sonicadas.
- C. Fracción de elución de la cromatografía de permeación de geles con la proteína RhuA.

La fracción pura y desalada de RhuA se congeló a -80°C como sistema de almacenamiento. Sin embargo, este sistema tiene varios inconvenientes, entre los cuales se mencionan: i) el volumen de disolución es elevado, ii) la actividad disminuye con el congelamiento y descongelamiento de la muestra, lo que obliga a almacenarlas en alícuotas iii) La enzima puede precipitar después de descongelarla. Ello obligó a buscar otros métodos alternativos de almacenamiento de enzimas, los cuales se discutirán más adelante.

5.2.2 PURIFICACIÓN DE FucA

La FucA obtenida a partir de *E. coli* M15 (pQEfucA) se purificó utilizando el mismo protocolo optimizado para FucA recombinante obtenido a partir de *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfucA), el cual fue desarrollado en trabajos anteriores por el grupo de investigación de aldolasas del Departamento de Ingeniería Química de la UAB.

A partir de la observación de la disminución del rendimiento después del paso de cromatografía de afinidad IMAC, donde se planteó el secuestro parcial del ión zinc del centro activo de la enzima por parte de la matriz funcional de la resina de afinidad IDA, Ardao (Ardao 2006) decidió estudiar el efecto que tenía sobre la purificación y la actividad enzimática la utilización de cobalto en lugar de zinc como metal divalente en la resina IDA. Para ello, se usó cloruro de cobalto en lugar de sulfato de zinc para equilibrar la columna antes de realizar la purificación de la enzima recombinante. Los resultados mostraron un incremento del 109 % de rendimiento, comparado con el 51 % obtenido cuando se empleaba zinc como catión divalente. El análisis elemental de la proteína pura demostró que el zinc del centro activo de la enzima se intercambiaba con el cobalto, resultando un incremento de actividad de la enzima (Dreyer and Schulz 1996).

Los resultados de la purificación de FucA recombinante por cromatografía de afinidad (obtenida a partir de cultivos con *E. coli* M15 pQEfucA) equilibrando la columna con cobalto en lugar de zinc mostraron también un incremento del rendimiento (285 %) (tabla 5.2), lo que sugiere que también se ha producido un intercambio de metales divalentes de la enzima.

Curiosamente, la actividad específica de la enzima pura disminuye durante el paso de precipitación. Ello podría explicarse por un nuevo intercambio de metales (cobalto por zinc) durante la etapa previa a la precipitación, donde se incubaba la enzima con sulfato de zinc con el objetivo de reponer el cofactor secuestrado por la columna (Garcia-Junceda et al. 1995).

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Grado purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	240	174.6	1.4	1	100
Cromatografía afinidad (Co ²⁺)	683	59.3	11.5	8.2	285
Precipitación*	318	62.4	5.09	3.6	47
GLOBAL					134

* Para el paso de precipitación, se incluyó una incubación previa con sulfato de zinc heptahidratado (2.2 mg por ml de fracción pura).

Tabla 5.2. Resultados de la purificación de FucA

La enzima FruA precipitada con sulfato de amonio ha mostrado una estabilidad de hasta un año almacenada a 4°C

5.2.3 PURIFICACIÓN DE FruA

La FruA obtenida a partir de *E. coli* M15 (pQEfdA) se purificó utilizando el mismo protocolo optimizado para FucA. Tratándose de una aldolasa de clase II, se empleó también cobalto como metal divalente para el soporte IDA, bajo la hipótesis de que el intercambio de zinc por cobalto en el centro activo de la enzima produciría un efecto beneficioso sobre la actividad. Los resultados de la purificación de esta enzima se muestran en la tabla 5.3. Al igual que con FucA, la utilización de una columna equilibrada con cobalto incrementa la actividad de la enzima FruA (rendimiento de 132 % en la etapa de cromatografía de afinidad), posiblemente por el intercambio de metales del centro activo de la enzima. Además, la incubación con sulfato de zinc en la etapa previa la precipitación, también disminuye la actividad específica de la enzima, posiblemente por volver a intercambiar cobalto por zinc en el centro activo.

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Grado purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	783	188.5	4.2	1	100
Cromatografía afinidad (Co ²⁺)	1033	79.5	13.0	3.3	132
Precipitación*	696	85.1	8.2	2.1	67
GLOBAL					88

* Para el paso de precipitación, se incluyó una incubación previa con sulfato de zinc heptahidratado (2.2 mg por ml de fracción pura).

Tabla 5.3. Resultados de la purificación de FruA

5.3 PURIFICACIÓN DE ALDOLASAS DEPENDIENTES DE GLICINA (SHMT, LTA)

5.3.1 PURIFICACIÓN DE SHMT

En la purificación de esta enzima, posterior del paso de cromatografía de afinidad, se introdujeron otras operaciones como la precipitación con sulfato de amonio y la diálisis como métodos alternativos a gel permeación para la eliminación del tampón fosfato imidazol. Los resultados de la tabla 5.4 muestran que cerca del 83 % de actividad aldolásica se recuperaron en el primer paso de purificación, obteniéndose una fracción altamente purificada que representa cerca del 55 % de la proteína soluble intracelular.

Estos valores corresponden con los datos obtenidos a partir del análisis densitométrico de SDS-PAGE. Esta fracción presenta como característica un color amarillo y exhibe un pico de máxima absorción alrededor de 280 y 420 nm. El pico de 420 nm es característico de un enlace azometina entre la coenzima y la proteína (Schirch and Mason 1962).

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Grado purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	443	704	0.63	1	100
Cromatografía afinidad	366	386	0.95	1.5	83
Precipitación (opción 1)	144	180	0.80	-	79
Diálisis + liofilización (opción 2)	132	189	0.70	-	72
GLOBAL Precipitación					66
GLOBAL Diálisis/Liofilización					60

Tabla 5.4. Purificación de SHMT recombinante de *S. thermophilus* YKA-184. La actividad treonina aldolasa se determinó empleando L-treonina como sustrato, tal como se describe en materiales y métodos. La fracción pura obtenida a partir de la cromatografía de afinidad se dividió en dos fracciones de igual volumen, empleándose cada una para precipitación (opción 1) o liofilización (opción 2). Los datos de rendimiento son referidos a cada etapa, excepto el global.

Para la posterior eliminación del imidazol presente en la fracción pura se estudiaron dos alternativas: i) precipitación con sulfato de amonio y ii) diálisis y liofilización. Como se puede ver en la tabla anterior, se obtuvo un alto rendimiento con ambas opciones, siendo la opción 1 la mejor (rendimiento 66 %). Otras ventajas que presenta la precipitación con sulfato de amonio son: sencillez, no requiere de costosos ni sofisticados equipos y bajo consumo energético, por lo que en general, resulta más económico.

Tanto la enzima precipitada como la liofilizada se estudiaron en base a su estabilidad a diferentes temperaturas de almacenamiento (figura 5.8). Se observa que ambas presentaciones, liofilizada y precipitada, son estables al menos 10 semanas cuando se almacenan a 4°C y -20°C respectivamente.

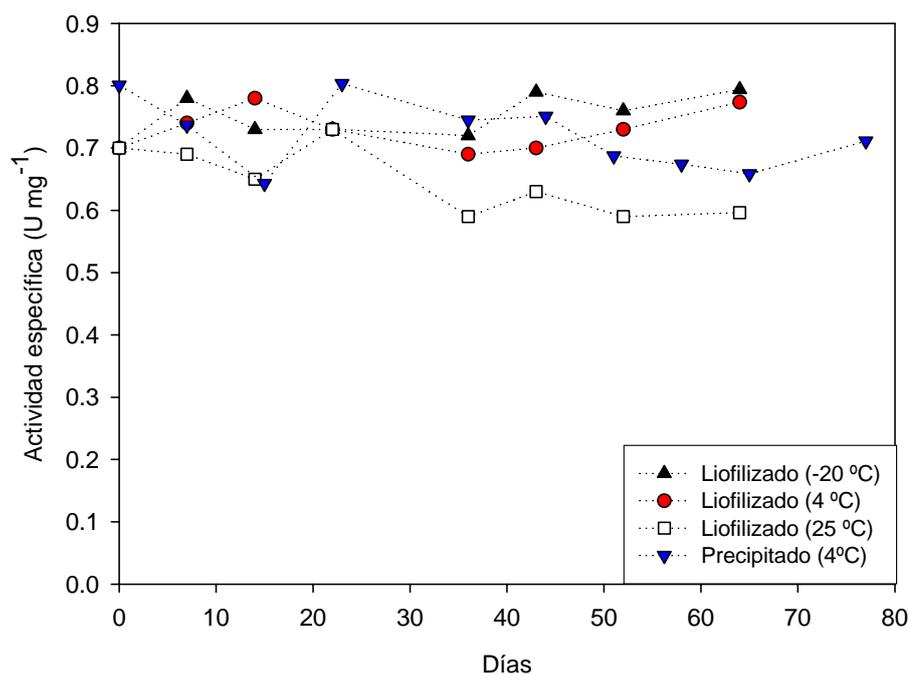


Figura 5.8. Estabilidad de diferentes formas de almacenamiento de SHMT recombinante

En resumen, la precipitación de SHMT después de su purificación por cromatografía de afinidad representa la mejor estrategia operacional para su almacenamiento por dos motivos: i) mayor rendimiento comparado con la diálisis/liofilización y ii) menor número de pasos y posibilidad real de escalado. En base a esto, se decidió emplear la precipitación con sulfato de amonio como método de elección para el procesamiento y almacenamiento de ésta enzima.

5.3.2 PURIFICACIÓN DE LTA

Para la purificación de LTA se utilizó un esquema similar al anterior. Los resultados de la tabla 5.5 muestran una pérdida del 30 % de actividad después del paso de cromatografía de afinidad. Sin embargo, hay una compensación debido a un incremento significativo de la actividad específica después del paso de la precipitación.

Este hecho puede ser debido a dos factores: i) regeneración del cofactor fosfato de piridoxal (PLP) del centro catalítico de la enzima durante la incubación previa con PLP a la adición de la sal y ii) el imidazol tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática. Teniendo en cuenta que para el ensayo enzimático la muestra sufre una dilución 1:20, la concentración efectiva del imidazol en la mezcla de reacción sería de 20 mM, y ésta sería suficiente para producir la inhibición de la enzima. Este fenómeno también se observó al

dializar 135 unidades de LTA (obtenida por cromatografía de afinidad) para eliminar el imidazol, resultando en un incremento de actividad del 276 %. Estos datos sugieren la posibilidad de un efecto inhibitorio del imidazol, aunque para demostrarlo, habría que hacer ensayos de inhibición sobre la enzima purificada.

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Grado purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	399	191	2.1	1	100
Cromatografía afinidad	282	126	2.2	1.1	71
Precipitación (opción 1)	431	95.2	4.5	2.2	153
				GLOBAL	109

Tabla 5.5. Purificación de LTA recombinante de *E. coli*. La actividad treonina aldolasa se determinó empleando L-treonina como sustrato, tal como se describe en materiales y métodos. Los datos de rendimiento son referidos a cada etapa, excepto el global.

El efecto de la liofilización sobre esta enzima se estudió sobre la muestra dializada, resultando en una disminución de actividad del 67 % respecto al inicial (datos no incluidos en la tabla). Además, se estudió la estabilidad de las presentaciones liofilizado y precipitado de LTA purificadas y almacenadas a diferentes temperaturas (figura 5.9). Se ha estimado que cerca del 50 % de LTA precipitada decae gradualmente en 12 semanas cuando se almacena a 4°C. Por otro lado, la enzima liofilizada presenta menor estabilidad comparada con la precipitada. Alrededor del 60 % de actividad decae gradualmente cuando el liofilizado es almacenado a -20°C o 4 °C, presentando efectos mas drásticos cuando se almacena a temperatura ambiente (90 % de pérdida de actividad)

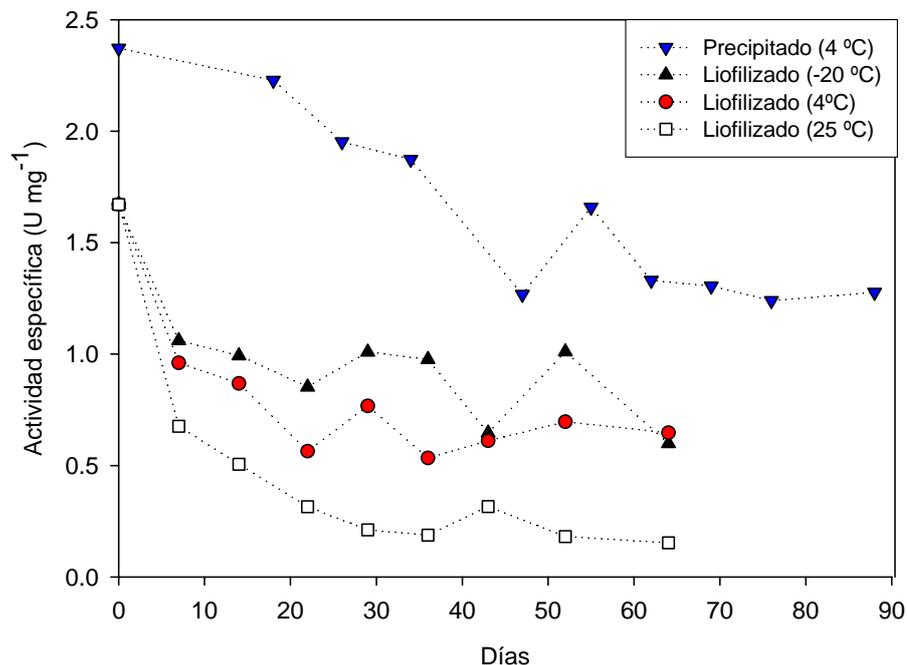


Figura 5.9. Estabilidad de LTA recombinante almacenada bajo diferentes presentaciones y condiciones.

Estos resultados, junto con los estudios de estabilidad de las diferentes presentaciones, sugieren que la mejor opción para el proceso de purificación/recuperación de LTA es la vía de precipitación con sales y posterior almacenamiento a 4°C.

5.4 PURIFICACIÓN DE ALDOLASAS DEPENDIENTES DE ACETALDEHÍDO (DERA)

5.4.1 Purificación de DERA

La DERA clonada a partir de *E. coli* es una aldolasa de clase I que, a diferencia de las aldolasas de clase II, no posee un átomo metálico en el centro activo. El proceso de purificación de DERA siguió el camino de cromatografía de afinidad y precipitación por sales, ya que la experiencia obtenida con otras enzimas en el laboratorio demostraba ser el mejor, rápido y sencillo. En este caso particular, se eliminó el paso de incubación con $ZnSO_4$ anterior a la precipitación debido a la ausencia del átomo metálico del centro activo. Los resultados de purificación se pueden ver en la tabla 5.6, el cual es una media de los resultados obtenidos a partir de diferentes purificaciones.

Paso	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Grado purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	45576	1676	27.2	1	100
Cromatografía afinidad	43252	900	48.1	1.8	95
Precipitación	38320	812	47.2	1.7	89
				GLOBAL	85

Tabla 5.6. Purificación de DERA recombinante de *E. coli*. La actividad DERA se determinó empleando 2-desoxiribosa 5-fosfato como sustrato, tal como se describe en materiales y métodos. Los datos de rendimiento son referidos a cada etapa, excepto el global.

Cabe destacar que en la purificación de DERA las pérdidas son mínimas en el paso de cromatografía de afinidad, lo cual podría ser debido a la ausencia de átomos metálicos en su estructura, a diferencia de lo que sucede con las aldolasas de clase II. Respecto al paso de precipitación con sales, el rendimiento también es elevado (89 %), lo que sugiere una gran robustez de esta enzima desde el punto de vista estructural. Además, la DERA precipitada conserva el 90 % de la actividad inicial después de un año de almacenamiento a 4°C

5.5. CONCLUSIONES

La utilización de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) con resinas de tipo IDA para la purificación de las aldolasas cola de histidinas en N-terminal, es una estrategia adecuada, tanto a escala de laboratorio como preparativa, para la obtención de proteínas recombinantes con un alto grado de pureza en un solo paso de purificación

La utilización de cobalto en lugar de zinc como metal divalente en la resina IDA permite incrementar la actividad específica de las aldolasas dependientes de DHAP, a través de un mecanismo de intercambio de iones metálicos en el centro activo de la enzima.

Si bien la permeación de geles es una estrategia que permite la eliminación del tampón fosfato-imidazol con un alto rendimiento, presenta el inconveniente de que no reduce el volumen de la muestra, haciendo inviable la congelación como método de almacenamiento.

La precipitación por sulfato de amonio es un sistema sencillo y con buenos rendimientos para la eliminación del tampón fosfato-imidazol para FucA, FruA, DERA, SHMT y LTA.

Para las adolasas dependientes de glicina (LTA y SHMT), la precipitación con sulfato de amonio como método de almacenamiento es una mejor alternativa comparada con la diálisis y liofilización, ya que involucra un menor número de pasos y el rendimiento en el procesamiento es mayor.

5.6. BIBLIOGRAFIA

- Ardao I, Benaiges, M.D., Caminal, G., Álvaro, G. 2006. One step purification-inmovilization of fuculose 1-phosphate aldolase, a class II DHAP dependant aldolase, by using metal-chelate supports. *Enzyme Microb. Technol.* Artículo en prensa.
- Dreyer MK, Schulz GE. 1996. Refined high-resolution structure of the metal-ion dependent L-fuculose-1-phosphate aldolase (class II) from *Escherichia coli*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 52:1082-1091.
- Durany O. 2000. Desenvolupament de Metodologia per la producció de fuculosa 1-fosfat aldolasa. Universitat Autònoma de Barcelona. Memoria de Máster.
- Garcia-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong CH. 1995. A New Strategy for the Cloning, Overexpression and One-Step Purification of 3 DHAP-Dependent Aldolases - Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* 3(7):945-953.
- Schirch L, Mason M. 1962. Serine Transhydroxymethylase - Spectral Properties of Enzyme-Bound Pyridoxal-5-Phosphate. *J. Biol. Chem.* 237(8):2578-&.
- Suau T. 2001. Estudi de la purificació de Fuculosa 1-P aldolasa recombinant de *E. coli*. Universitat Autònoma de Barcelona. Memoria de Máster

6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DE ALDOLASAS RECOMBINANTES

Un aspecto importante para la producción de cualquier enzima es la disposición de una metodología exacta y precisa que permita conocer la funcionalidad de la enzima con la cual se está trabajando. La capacidad de evaluar un proceso de producción, de cualquier aldolasa, desde la manufactura por parte de microorganismos, hasta su recuperación y almacenamiento, es un factor clave a la hora de diseñar estrategias para optimizar procesos, así como evaluar la viabilidad económica de los mismos.

Este capítulo se ha centrado en la instauración de una metodología específica para cuantificar la actividad de cada una de las aldolasas clonadas en este trabajo, así como su validación y determinación de algunas propiedades bioquímicas de las enzimas recombinantes purificadas.

Los resultados se muestran en función del tipo de aldolasas:

6.1 ALDOLASAS DEPENDIENTES DE DHAP: RhuA, FucA, FruA

6.1.1. Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de RhuA

La determinación de la actividad enzimática de RhuA se determinó por el método descrito en materiales y métodos, y que tiene como fundamento la determinación de la velocidad de formación de DHAP/NAD⁺ a partir de L-ramnulosa 1-fosfato.

Estudio del efecto de cationes sobre la actividad de RhuA.

Conociendo que los cationes monovalentes afectan la actividad enzimática, especialmente el K⁺, se determinó la concentración de potasio óptima para el ensayo de actividad. Adicionalmente, se estudió el efecto del sodio sobre la actividad enzimática, ya que el mismo se encuentra presente en cantidades importantes en la sal de ciclohexilamina de ramnulosa 1-P. Se realizaron determinaciones de una misma muestra de RhuA purificada variando las concentraciones del catión a estudiar. Los resultados. Basándose La figura 6.1 muestra que el K⁺ ejerce un efecto estimulador de la actividad de la enzima mucho mayor que el Na⁺. Por ello, se decidió emplear K⁺ a una concentración de 100 mM en el ensayo de actividad como catión activador.

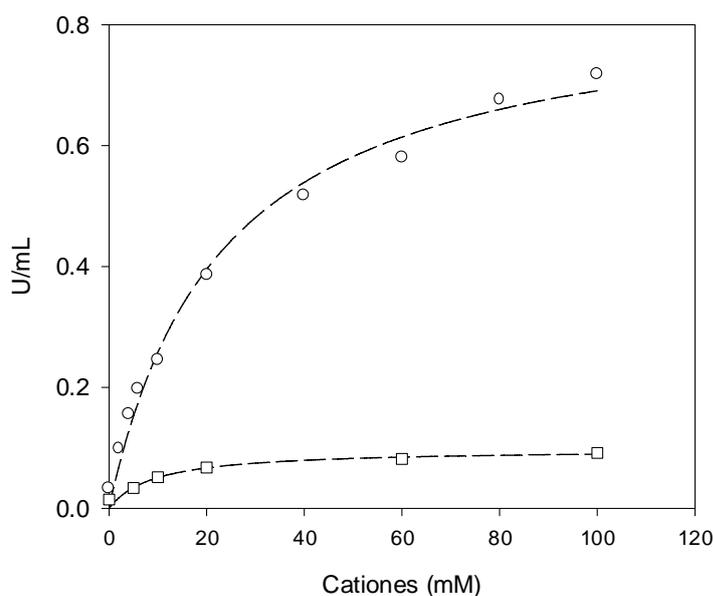


Figura 6.1. Efecto de la concentración de cationes monovalentes sobre la actividad de RhuA.
K⁺ (-○-); Na⁺ (-□-)

Nivel de saturación del sustrato

Se estudió el nivel de saturación de sustrato específico L-ramnulosa 1-P para el ensayo de actividad propuesto con el fin de determinar la concentración de sustrato óptima para el ensayo.

Se examinó la velocidad inicial (v_0) en función de diferentes concentraciones de sustrato. Los resultados obtenidos experimentalmente se ajustan a un modelo de Michaelis-Menten y se evaluaron por el modelo lineal Eadie-Hofstee. Este último consiste en una representación lineal de la cinética enzimática en la cual, la velocidad de reacción es graficada como una función de la razón velocidad/ concentración de sustrato:

$$v = -Km \frac{v}{[S]} + V_{\max}$$

Donde v representa la velocidad de reacción, K_m es la constante de Michaelis-Menten, $[S]$ es la concentración de sustrato y V_{\max} la velocidad máxima de reacción. Como otras técnicas que linealizan la ecuación de Michaelis-Menten, el gráfico de Eadie-Hofstee permite una rápida identificación de los términos cinéticos importantes, tales como la K_m y V_{\max} . También es más robusta contra los errores comparados con el gráfico de Lineweaver-Burke, particularmente porque proporciona un peso igual a todos los datos en cualquier intervalo de concentración de sustrato o de velocidad de reacción. En la linealización de Eadie-Hofstee, ni las ordenadas ni las abscisas representan variables independientes, sino que ambas son dependientes de la velocidad de reacción. Así, cualquier error experimental estará presente en ambos ejes.

Los valores de los parámetros cinéticos a partir de los puntos experimentales se muestran en la figura 6.1 y tabla 6.1:

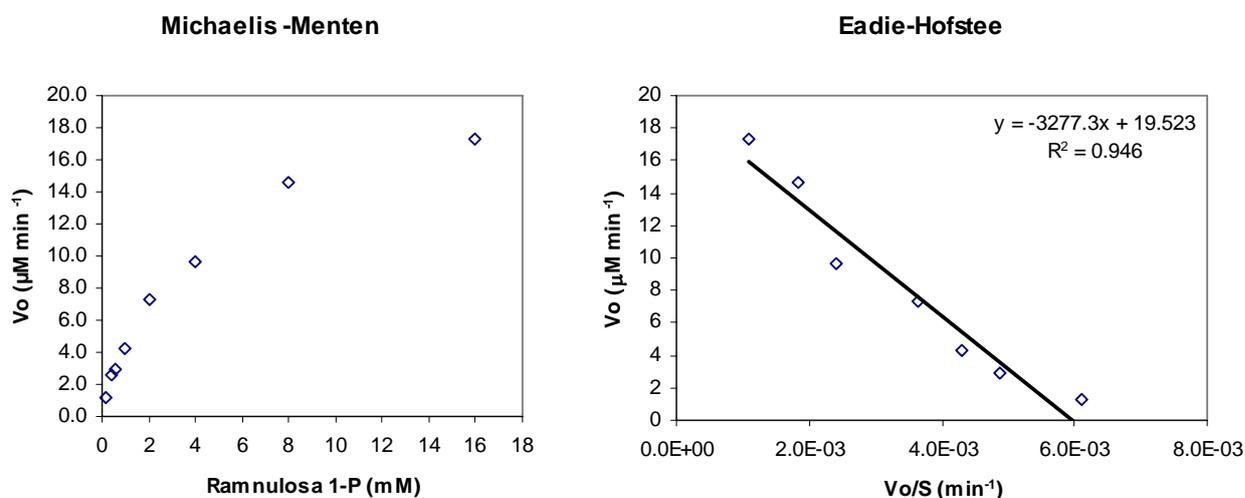


Figura 6.1. Nivel de saturación de sustrato de sustrato (ramnulosa 1-P) para la enzima recombinante RhuA.

	K_m (mM)	V_{max} (µM min ⁻¹)	V_{max} (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max}/K_m (U mg ⁻¹ mM ⁻¹)
Sustrato: Ramnulosa 1-P (CHA) ₂	3.3	19.5	16.3	4.9

Tabla 6.1. Parámetros cinéticos de la enzima recombinante RhuA.

Basándose en la ecuación de la recta calculada en el modelo de Eadie-Hofstee, se estimó que la concentración de sustrato que se necesita para saturar la enzima debe ser al menos de 16 mM. Ello permitiría que en los ensayos, la actividad medida fuera función directa de la concentración de enzima ($v_o \propto [E_o]$) tal como se demuestra en la siguiente ecuación:

$$v_o = \frac{k_{cat} \cdot [E_o] \cdot [S_o]}{K_m + [S_o]} \quad ; \quad \text{si } [S_o] \gg K_m, \text{ tendremos que } v_o = k_{cat} \cdot [E_o]$$

Sin embargo, ello supone el empleo de una gran cantidad de sustrato en el ensayo, lo que limitaría el número de determinaciones debido a la disponibilidad limitada de la ramnulosa 1-P. Así, se fijó una concentración de compromiso que permitiese obtener resultados reproducibles, trabajar con cantidades pequeñas del sustrato y que a su vez, se facilite la toma de volúmenes exactos a partir de una solución patrón de 40 mM de ramnulosa 1-P.

Se decidió emplear una concentración de sustrato en el ensayo igual a 2 mM, de fácil cálculo y cercana al K_m de la enzima. A este valor, la lectura de actividad se vería afectada por pequeñas variaciones en la concentración del sustrato en el ensayo, lo que crea la necesidad de determinar la reproducibilidad del método en estas condiciones. Utilizando esta concentración (2 mM) se determinó el error del ensayo, incluyendo la variación que produce la pesada para la preparación de la solución madre de la ramnulosa 1-P.

Para ello, se prepararon 10 soluciones patrón de ramnulosa 1-P (40 mM) con la finalidad de incorporar el error de la pesada al error del ensayo. Se realizaron 10 determinaciones tomando cada vez de una preparación de sustrato diferente y se determinó la actividad de una misma muestra aldolásica, obteniéndose un valor medio ($n = 10$) = 0.71 U ml^{-1} y una desviación estándar (S) = $\pm 0.04 \text{ U ml}^{-1}$. Ya que el coeficiente de variación se encuentra dentro de márgenes aceptables (cercaos al 5 %), se puede aceptar que las condiciones establecidas son reproducibles y que la medida de la actividad siempre estará en función de la concentración de enzima en la muestra.

Estos resultados indican que se pueden obtener resultados reproducibles y que el error que se pudiese cometer por la variación de la pesada no afecta considerablemente el resultado final del ensayo de actividad. De esta forma, se fijó la concentración del sustrato en el ensayo en 2 mM.

Linealidad

Para determinar el intervalo lineal de respuesta del ensayo, se siguió el protocolo definido variando las cantidades de enzima RhuA purificada, tal como se muestra en la figura 6.2:

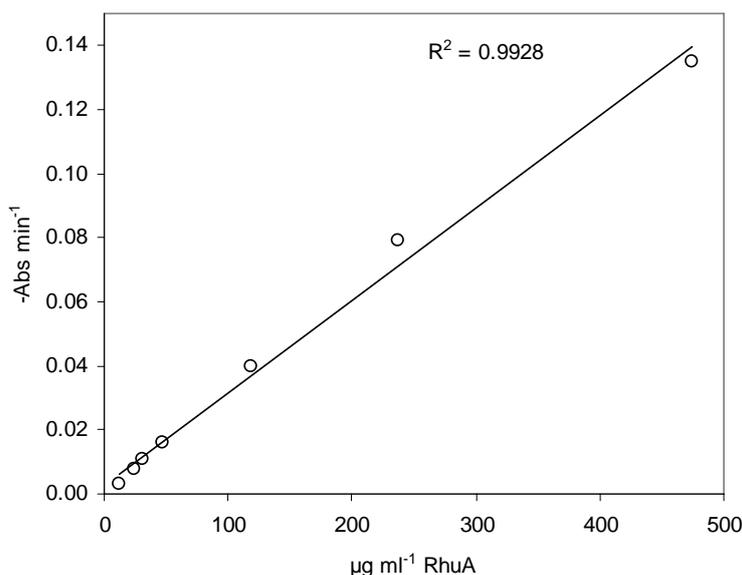
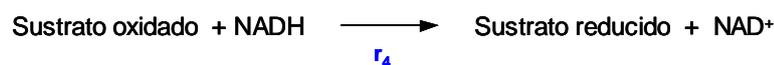
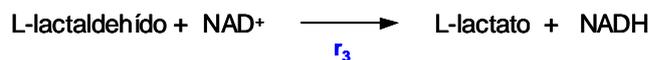
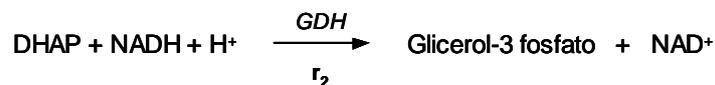
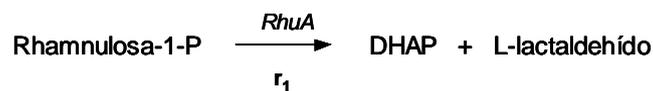


Figura 6.2. Linealidad del ensayo enzimático propuesto para RhuA.

Se observa que los valores de actividad que produzcan una tasa de disminución de absorbancia (340 nm) 0.003 y 0.135 son proporcionales a la cantidad de enzima presente en la muestra ($r^2 = 0.993$)

Estudio de reacciones inespecíficas sobre la cuantificación de la actividad de RhuA

Los resultados obtenidos para la validación del método enzimático son producto de la actividad de una solución de la enzima RhuA purificada. Sin embargo, en los trabajos posteriores de monitoreo de la expresión de RhuA en cultivos, se empleó un extracto crudo de células ajustado a DO = 3.0 y sonicadas. Este extracto puede contener otras actividades enzimáticas que, al entrar en contacto con la mezcla de reacción, pueden generar reacciones inespecíficas que conlleven a una determinación inexacta de la actividad de RhuA. A partir de las reacciones del sistema acoplado para la determinación de la actividad aldolásica (r_1 y r_2), se pueden establecer otros dos tipos de reacciones diferentes (r_3 y r_4)



La presencia de las reacciones 3 y 4 en la mezcla de reacción, conllevaría a una modificación en la tasa de consumo de NADH, enmascarando el verdadero valor de RhuA.

En el caso de r_3 , la reacción sería catalizada por la enzima L-lactaldehído deshidrogenasa (Baldoma and Aguilar 1988). Esta enzima es inducible solo en condiciones aeróbicas y al menos, por tres tipos diferentes de moléculas: L-fucosa, L-ramnosa y glutamato (Baldoma and Aguilar 1987). En este sentido, los cultivos aeróbicos de *E. coli* en medio LB podrían inducir su síntesis, presentándose junto con RhuA en los extractos crudos de células de *E. coli* M15 (pQErham). La aparición de L-lactaldehído, producto de la actividad de RhuA sobre la L-ramnulosa 1-P de la mezcla de reacción, proporcionaría el sustrato para la

enzima L-lactaldehído deshidrogenasa, la cual lo reduciría generando NADH, generando una subestimación del valor real de la actividad de RhuA.

En el caso de r_4 , la reducción de moléculas por la acción de deshidrogenasas dependientes de NAD presentes en el extracto crudo de células de *E. coli* sonicadas conllevaría a una mayor tasa de consumo del NADH de la mezcla de reacción e incrementaría finalmente los valores de actividad de RhuA. Una de estas actividades podría ser la enzima L-1,2 propanediol oxidoreductasa, la cual se ha descrito como una enzima inducible por el crecimiento anaeróbico de *E. coli* en fucosa o ramnosa (Boronat and Aguilar 1981). A pesar de que las condiciones de cultivo realizados con la cepa *E. coli* M15 (pQErham) difieren de las condiciones de inducción, Boronat encontró, usando anticuerpos específicos, la enzima L-1,2 propanediol oxidoreductasa intracelular en forma inactiva en células de *E. coli* crecidas aeróbicamente, por lo que no se descarta la posibilidad de que esta actividad se encuentre presente en las células de *E. coli* M15 (pQErham) crecidas en nuestras condiciones de trabajo

Tomando en consideración la posibilidad de que se generen reacciones tipo r_3 y r_4 en la mezcla de reacción con extractos crudos de células de *E. coli* sonicadas, el balance global de reacciones inespecíficas para la determinación de la actividad aldolásica será la diferencia de las velocidades $r_4 - r_3$.

Luego, suponiendo que estas reacciones se comportan según una cinética de tipo Michaelis-Menten, tendremos que su velocidad dependerá tanto de la concentración de la enzima como del sustrato en la mezcla de reacción. De esta forma, si la cantidad de las enzimas que catalizan las reacciones inespecíficas es muy baja en comparación con los niveles de la enzima recombinante (RhuA), éstas tendrán poca influencia sobre el resultado final de la determinación de la actividad de RhuA. La cantidad de sustratos que aporte el extracto crudo y que podrían intervenir en las reacciones de reducción (r_4) sería despreciable en comparación con el sustrato específico L-ramnulosa 1-P (2 mM).

En resumen, en una determinación de RhuA tendremos que

$$(r_1 + r_2) - (r_4 - r_3) = r_{\text{observada}}$$

donde:

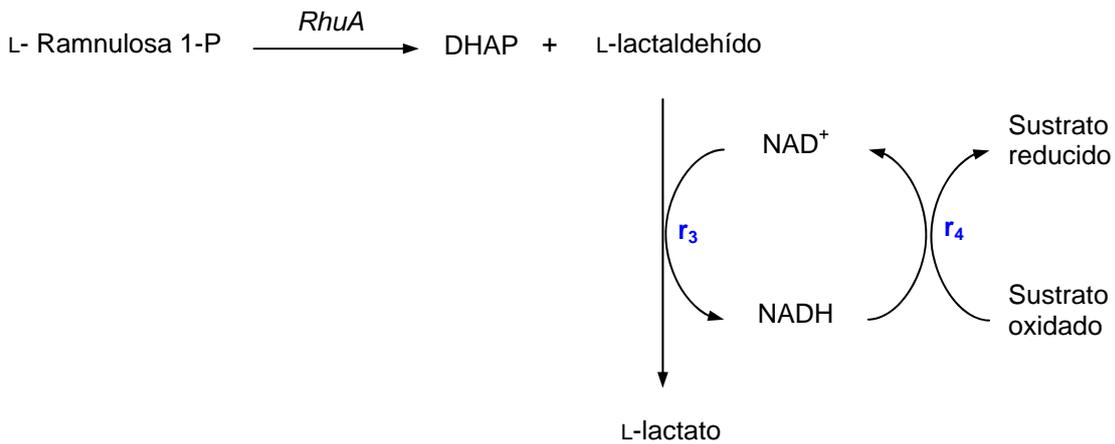
$$(r_1 + r_2) = r_i$$

que correspondería con las reacciones específicas para RhuA en la mezcla de reacción,
y

$$(r_4 - r_3) = r_i$$

que correspondería con el balance global de las reacciones inespecíficas.

Para determinar la velocidad global de las reacciones inespecíficas (r_i), se procedió a realizar la determinación de la actividad aldolásica de una extracto crudo de células de *E. coli* M15 (pQErham) crecidas en condiciones aerobias en medio LB. En este caso, no se agregó la enzima GDH a la mezcla de reacción, de manera que la disminución en la absorbancia 340 nm sea consecuencia de la diferencia de las velocidades r_4-r_3 , tal como se muestra en el siguiente esquema:



La figura 6.3 muestra que, para las células de *E. coli* inducidas con IPTG, la variación de actividad específica producto de reacciones inespecíficas es menor del 2 %, por lo que no se justifica la adición de un blanco de reacciones para la determinación de la actividad de RhuA en los estudios con inducción del presente trabajo.

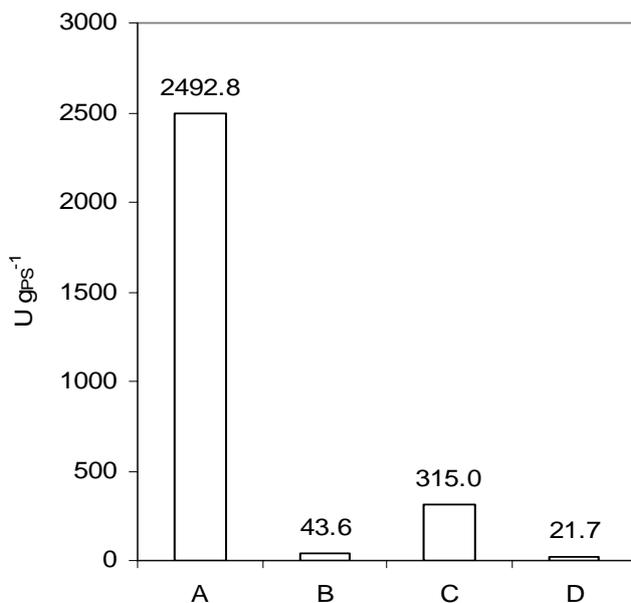


Figura 6.3. Valoración de las reacciones inespecíficas en el método enzimático propuesto para la determinación de RhuA en extractos de células de *E. coli* M15 (pQErham) crecidas en medio LB inducidas (A – B) y no inducidas (C – D). Tanto en B como en D no se agregó GDH a la mezcla de reacción.

6.1.2 Ensayo enzimático para cuantificación de la actividad fructosa 1,6 bifosfato aldolasa

Se empleó el método publicado por Berry (Berry and Marshall 1993) ligeramente modificado, el cual mide la tasa de formación de DHAP/NAD⁺ a partir de fructosa 1,6-bifosfato. Se utilizó la proteína FruA purificada por cromatografía de afinidad, precipitada con sulfato de amonio y almacenada a 4°C.

Nivel de saturación del sustrato

Se determinó si la concentración de sustrato establecida en el método de Berry se encontraba en la zona de saturación de la enzima, para lo cual se procedió a determinar el K_m en las condiciones de ensayo establecidas (figura 6.4).

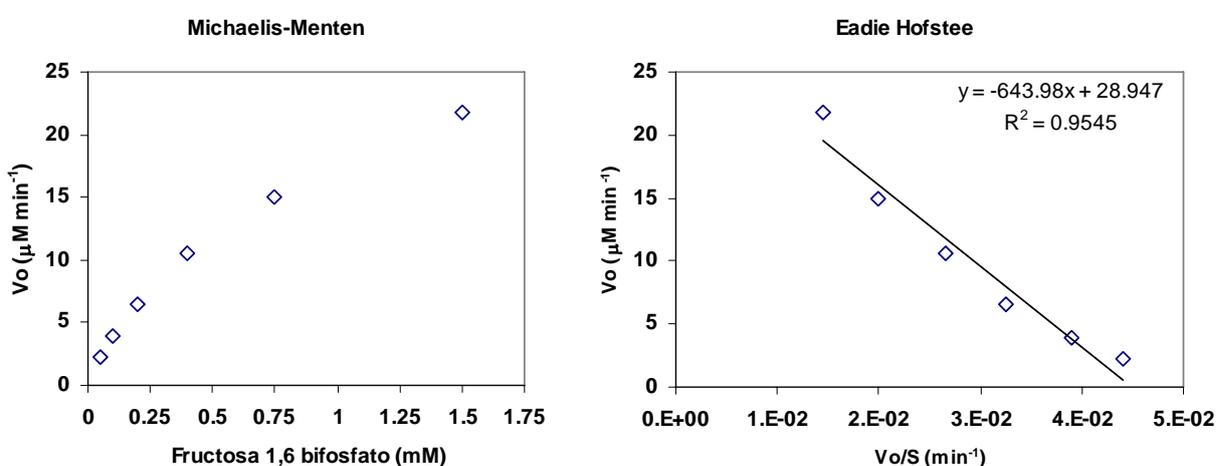


Figura 6.4. Nivel de saturación de sustrato (fructosa 1,6 bifosfato) para la enzima recombinante FruA.

Los valores de los parámetros cinéticos a partir de los puntos experimentales se muestran en la tabla:

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\text{U mg}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
Sustrato: D-Fructosa 1,6- bifosfato	0.64	29.0	12.3	19.2

Tabla 6.2. Parámetros cinéticos de la enzima recombinante FruA.

La concentración de sustrato utilizada en el método descrito es 4.5 veces superior al K_m de la enzima, por lo que podemos afirmar que nos encontramos en la zona de saturación y que la actividad medida es función de la concentración de enzima.

6.1.3 Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de FucA

El grupo de investigación de aldolasas del Departamento de Ingeniería Química de la UAB había venido trabajando con la enzima FucA recombinante desde hace varios años, por lo que la validación del método de cuantificación de la actividad FucA ya estaba establecido (Durany 2000).

6.2 ALDOLASAS DEPENDIENTES DE GLICINA: SHMT, LTA

6.2.1 Ensayo enzimático para cuantificación de la actividad treonina aldolasa

Para la determinación de la actividad treonina aldolasa, se utilizó el método de Liu (Liu et al. 1998c) ligeramente modificado, el cual mide la tasa de formación de acetaldehído/NAD⁺ a partir de L-treonina.

Determinación de temperatura óptima de actividad

La escasa información sobre LTA de *E. coli* y SHMT de *S. thermophilus* obligó en una primera instancia a determinar algunas características de las mismas para poder implementar un método enzimático sensible para cuantificar su actividad. La temperatura óptima del enzima fue el primer parámetro que se determinó, para lo cual se utilizó SHMT y LTA purificadas por cromatografía de afinidad, dializadas y almacenadas en alícuotas a -80°C.

El protocolo de ensayo descrito en materiales y métodos permitió estudiar la velocidad de reacción (v_0) frente a L-treonina a diferentes temperaturas, obteniendo los siguientes resultados (figura 6.5):

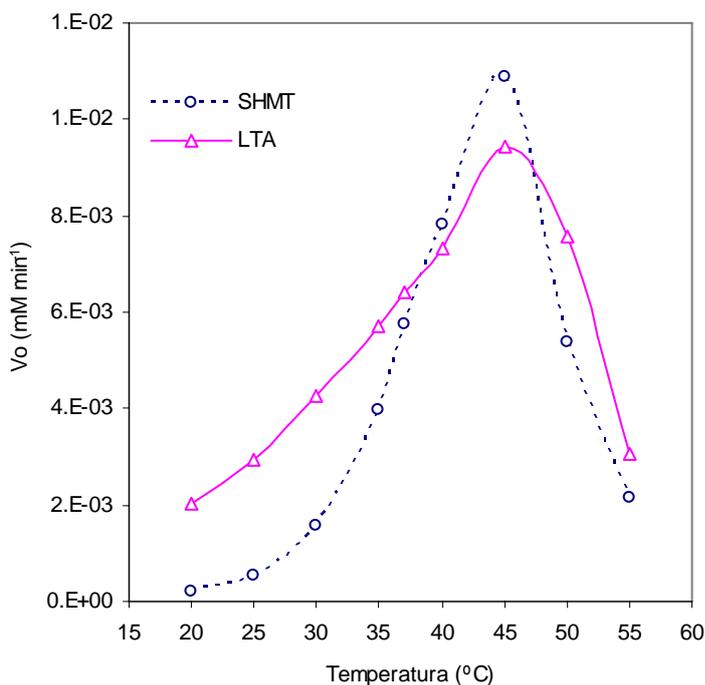


Figura 6.5. Comparación de V_0 a diferentes temperaturas para SHMT y LTA. Concentraciones en la mezcla de reacción: NADH, 0.15 mM; L-treonina, 50 mM; PLP, 0.05 mM; tampón, Tris.HCl 200 mM pH 8.0; ADH, 30 U ml⁻¹.

Se observa que la actividad máxima antes de la desnaturalización de la enzima por efecto del calor es, en ambos casos, alrededor de 45°C. Sin embargo, esta temperatura no es adecuada para su aplicación en el ensayo enzimático, ya que la actividad de la enzima a 45°C decae con el tiempo (figura 6.5). Por este motivo, se escogió para el ensayo una temperatura inferior donde la enzima presentaba una mayor estabilidad (37°C) n.

Determinación pH óptima de actividad

La figura 6.6 muestra la velocidad de reacción (V_o) a diferentes pH para ambas enzimas recombinantes. El pH óptimo encontrado para la LTA se encuentra entre 8 – 8.5, el cual coincide con el pH reportado para las treonina aldolasas descritas (Liu et al. 2000). Sin embargo, la SHMT posee un pH óptimo de acción ligeramente ácido (6 – 6.5), siendo hasta ahora la única treonina aldolasa reportada con esta característica. Así, se establece que el tampón apropiado para la determinación de la LTA es Tris.HCl 200 mM pH 8.0 y para SHMT, fosfato de potasio 200 mM pH 6.5, manteniendo el resto de las condiciones del ensayo constantes (temperatura 37°C).

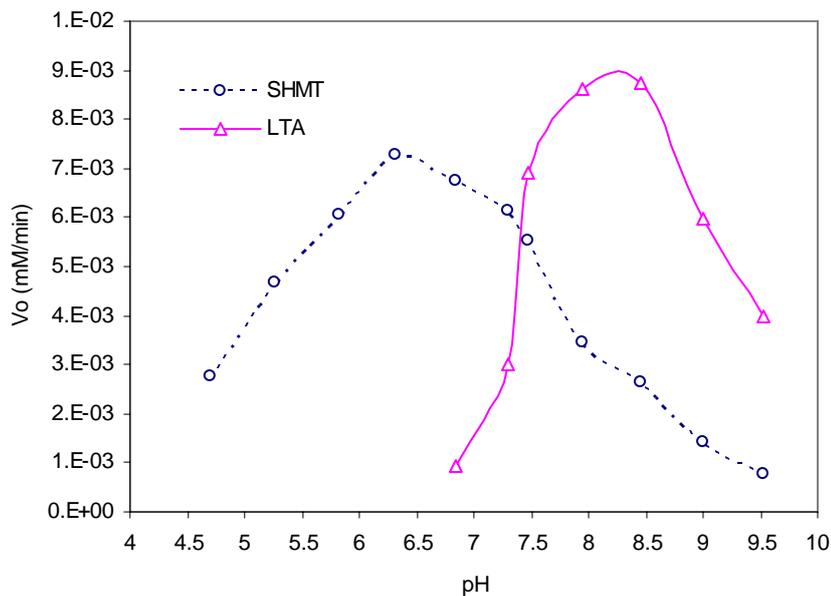


Figura 6.6. Comparación de la velocidad de reacción (V_o) medida por el método normalizado, usando L-treonina como sustrato, a diferentes pH para SHMT y LTA. Concentraciones en la mezcla de reacción: NADH, 0.15 mM; L-treonina, 50 mM; PLP, 0.05 mM; tampón, 200 mM; ADH, 30 U ml⁻¹. Temperatura de ensayo: 37 °C. Tampones: tris-HCl (pH 9.5 – 7.5), fosfato de potasio (7.0-6.0) y acetato (pH 4.5- 5.5).

Determinación del K_m y V_{max} para L-treonina, L-*allo* treonina y D-treonina

Tomando como base el protocolo normalizado de ensayo en base a la temperatura y el pH para cada enzima, se determinó la velocidad de reacción para diferentes concentraciones de L-treonina, L-*allo* treonina y D-treonina. La tabla 6.3 y la figura 6.7 muestran los resultados obtenidos frente a diferentes sustratos.

	Sustrato	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{max}/K_m ($\text{U mg}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
SHMT	L-treonina	24.6	13.4	1.49	0.061
	L- <i>allo</i> treonina	0.7	49.0	5.44	7.8
	D-treonina	-	-	-	-
LTA	L-treonina	3.3	8.22	4.94	1.5
	L- <i>allo</i> treonina	0.049	20.3	12.19	248
	D-treonina	-	-	-	-

Tampones utilizados: LTA: Tris.HCl 200 mM pH 8.0 y para SHMT: fosfato de potasio 200 mM pH 6.5
 Condiciones del ensayo: T = 37°C, λ = 340 nm, camino óptico 1 cm, vol. total del ensayo 1 ml
 No se detectó actividad D-treonina aldolasa en ambas enzimas

Tabla 6.3. Parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes SHMT y LTA.

Los resultados muestran que ambas enzimas actúan sobre L-treonina y L-*allo* treonina, y no sobre D-treonina, por lo que podrían ser clasificadas dentro de la familia de L-TA de baja especificidad. Sin embargo, la afinidad de SHMT y LTA por L-*allo* treonina es 35 y 67 veces más alto, respectivamente, que por L-treonina bajo las condiciones de ensayo establecidas.

Considerando que la razón de K_m para treonina/*allo* treonina de otras treonina aldolasa de baja especificidad (incluyendo L y D estereoisómeros) descritas en la literatura está entre 0.3 - 13 (Kataoka et al. 1997; Liu et al. 1998a; Liu et al. 1998b; Liu et al. 2000; Liu et al. 1997; Liu et al. 1998c; Liu et al. 1998d), podríamos sugerir que estas enzimas sean consideradas como L-*allo* específicas más que de baja especificidad. Curiosamente, la L-*allo* treonina no es un compuesto que se encuentre en la naturaleza, por lo que no encontramos una significación fisiológica razonable de ésta característica.

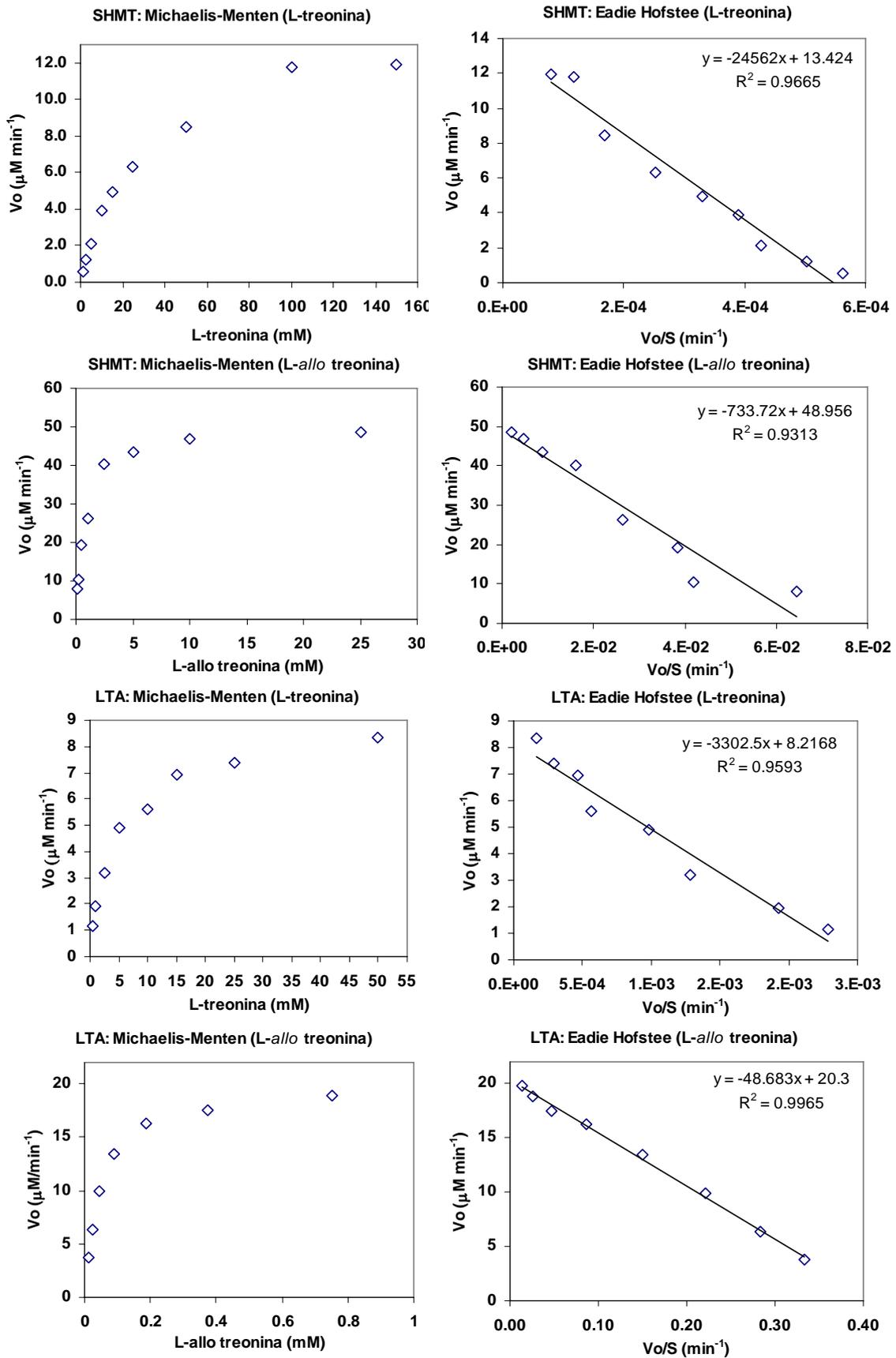


Figura 6.4. Nivel de saturación de sustrato para las enzimas recombinantes SHMT y LTA

Determinación de la estabilidad de LTA y SHMT a diferentes temperaturas

Para determinar la estabilidad de SHMT y LTA, las enzimas purificadas se colocaron en el tapón de pH óptimo respectivo, incubándose a diferentes temperaturas durante 6 horas. Se seleccionaron 3 temperaturas diferentes a partir de la temperatura de máxima actividad obtenida: 45, 37 y 30°C (figura 6.5).

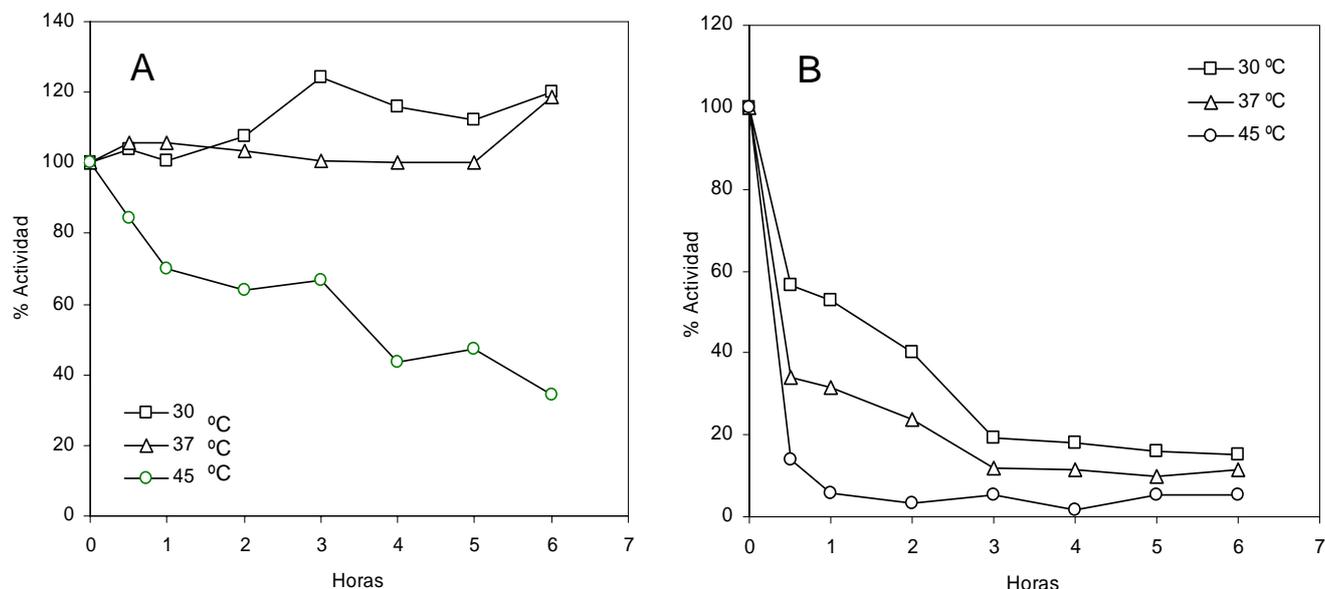


Figura 6.5. . A.-Estabilidad de SHMT en tampón fosfato de potasio 200 mM pH 6.5 a diferentes temperaturas. B - de LTA en tampón Tris.HCl 200 mM pH 8.0 a diferentes temperaturas

La figura 6.5 (A) muestra que SHMT es estable a 30 y 37°C durante las 6 horas cuando se encuentra en solución a pH 6.5. Sin embargo, cuando la enzima es incubada a 45 °C, la actividad decrece progresivamente. La alta estabilidad de esta enzima podría estar asociada a la ausencia de residuos cisteína en la estructura primaria del enzima (anexo 3) los cuales son susceptibles a ser oxidados, causando daños en la enzima.

A diferencia de SHMT, LTA es menos estable cuando es incubada en las temperaturas estudiadas, y que su actividad decae progresivamente con el tiempo. También se observa que a medida que se incrementa la temperatura de incubación, disminuye la actividad enzimática (figura 6.5-B)

6.3 ALDOLASAS DEPENDIENTES DE ACETALDEHÍDO: DERA

6.3.1 Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de DERA

Se empleó el método publicado por Valentín-Hansen (Valentin-Hansen et al. 1982) ligeramente modificado, el cual consiste en un método enzimático acoplada que mide la

tasa de formación de acetaldehído/NAD⁺ a partir de 2-desoxiribosa 5-fosfato. Se utilizó la proteína DERA purificada por cromatografía de afinidad, desalada por cromatografía de gel permeación y almacenada en alícuotas a -80°C.

Nivel de saturación del sustrato

Se determinó si la concentración de sustrato establecida en el método de Valentín-Hansen se encontraba en la zona de saturación de la enzima, para lo cual se procedió a determinar el Km en las condiciones de ensayo establecidas (figura 6.6).

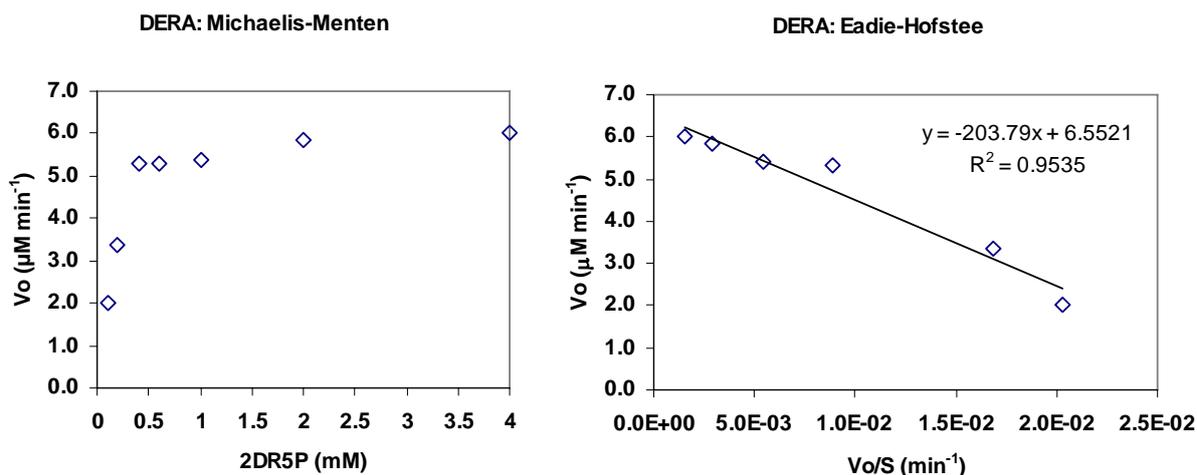


Figura 6.6. Nivel de saturación de sustrato (2-desoxiribosa 5-fosfato) para la enzima recombinante DERA.

Los valores de los parámetros cinéticos a partir de los puntos experimentales se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6.4):

	K _m (mM)	V _{max} (µM min ⁻¹)	V _{max} (µmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	V _{max} /K _m (U mg ⁻¹ mM ⁻¹)
Sustrato: 2-Desoxiribosa 5- fosfato	0.2	6.6	44	220

Tabla 6.4. Parámetros cinéticos de la enzima recombinante DERA.

Se estimó que la concentración de sustrato que se necesita para saturar la enzima, debe ser al menos de 0.5 mM. Ello permitiría que en los ensayos, la actividad fuera función de la concentración de enzima, tal como se demuestra en la siguiente ecuación:

$$V_o = \frac{k_{cat} \cdot [E_o] \cdot [S_o]}{K_m + [S_o]} \quad ; \quad \text{si } S_o \gg K_m, \text{ tendremos que } V_o = k_{cat} \cdot [E_o]$$

De esta forma, al trabajar a una concentración de sustrato en el ensayo de 2 mM, nos aseguramos que la medida de la actividad estará en función de la concentración de enzima en la muestra y que pequeñas variaciones en la concentración del sustrato no afectarán de manera significativa la medida de la actividad.

Para determinar el intervalo lineal de respuesta del ensayo (figura 6.7), se siguió el protocolo definido variando las cantidades de enzima DERA purificada, tal como se muestra en la siguiente figura:

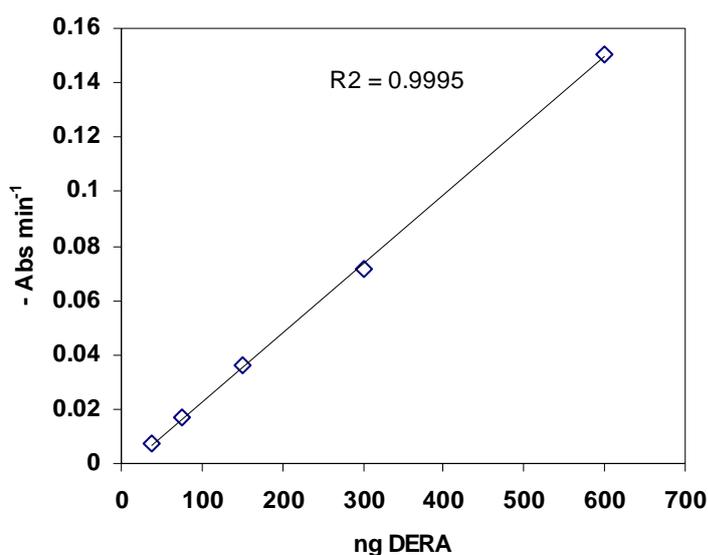


Figura 6.7. Linealidad del ensayo enzimático propuesto para DERA

Se observa que los valores de actividad que produzcan una tasa de disminución de absorbancia (340 nm) entre 0.007 y 0.151 son proporcionales a la cantidad de enzima presente en la muestra ($r^2 = 0.999$)

6.4. CONCLUSIONES

Se han puesto a punto diferentes ensayos enzimáticos para la cuantificación de las siguientes actividades aldolásicas: RhuA, FruA, DERA, LTA y SHMT. Todos ellos son métodos enzimático espectrofotométricos acoplados en los que se mide que mide, indirectamente, la actividad aldolásica en función de la tasa de consumo de NADH_2 a partir los sustratos específicos para cada una. Además, los ensayos enzimáticos propuestos son reproducibles y tienen un amplio margen de validez de actividad aldolásica específica.

6.5. BIBLIOGRAFIA

- Baldoma L, Aguilar J. 1987. Involvement of Lactaldehyde Dehydrogenase in Several Metabolic Pathways of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 262(29):13991-13996.
- Baldoma L, Aguilar J. 1988. Metabolism of L-Fucose and L-Rhamnose in *Escherichia coli* - Aerobic-Anaerobic Regulation of L-Lactaldehyde Dissimilation. *J. Bacteriol.* 170(1):416-421.
- Berry A, Marshall KE. 1993. Identification of Zinc-Binding Ligands in the Class-I Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 318(1):11-16.
- Boronat A, Aguilar J. 1981. Metabolism of L-Fucose and L-Rhamnose in *Escherichia coli* - Differences in Induction of Propanediol Oxidoreductase. *J. Bacteriol.* 147(1):181-185.
- Durany O. 2000. Desenvolupament de Metodologia per la producció de fuculosa 1-fosfat aldolasa. Universitat Autònoma de Barcelona. Memoria de Màster.
- Kataoka M, Wada M, Nishi K, Yamada H, Shimizu S. 1997. Purification and characterization of L-allo-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39. *FEMS Microbiol. Lett.* 151(2):245-248.
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 1998a. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 255(1):220-226.
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 1998b. A novel metal-activated pyridoxal enzyme with a unique primary structure, low specificity D-threonine aldolase from *Arthrobacter sp.* strain DK-38 - Molecular cloning and cofactor characterization. *J. Biol. Chem.* 273(27):16678-16685.
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 2000. Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 10(1-3):107-115.
- Liu JQ, Dairi T, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 1997. L-allo-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39: Gene cloning, nucleotide sequencing, and identification of the pyridoxal 5'-phosphate-binding lysine residue by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* 179(11):3555-3560.
- Liu JQ, Ito S, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 1998c. Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas sp.* strain NCIMB 10558. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2):549-554.

Liu JQ, Ito S, Dairi T, Itoh N, Shimizu S, Yamada H. 1998d. Low-specificity L-threonine aldolase of *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558: purification, characterization and its application to beta-hydroxy-alpha-amino acid synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49(6):702-708.

Valentin-Hansen P, Aiba H, Schumperli D. 1982. The Structure of Tandem Regulatory Regions in the *deoC* Operon of *Escherichia coli*-K12. *EMBO J.* 1(3):317-322.

7. INTRODUCCION A LA PRODUCCION DE ALDOLASAS RECOMBINANTES.

Este capítulo se centra en el diseño de un proceso general dirigido a producción de las adolasas recombinantes, tanto DHAP dependientes (RhuA, FucA, TagA, FruA), así como las aldolasas dependientes de glicina (LTA y SHMT) y acetaldehído (DERA).

Un factor importante a considerar para la producción de las aldolasas objetivo del presente trabajo, es que todas ellas se encuentran clonadas en un mismo vector de expresión (pQE40) y transformadas en la misma cepa (*E. coli* M15). Esta uniformidad, con algunas variantes, tales como el sistema de expresión constitutiva diseñado para DERA (*E. coli* DH5 α pBRdeoC2to), no ha sido objeto del azar, sino de una estrategia diseñada para solamente utilizar una de estas cepas recombinantes como modelo, de forma de estudiar todos los aspectos que podrían influir en la optimización de la producción de la aldolasa recombinante, así como las diferentes estrategias de cultivo del microorganismo.

En este sentido, se ha escogido la cepa *E. coli* M15 (pQErham) como modelo, partiendo de la base del *background* del grupo de investigación sobre la producción de otra aldolasa dependiente de DHAP: fuculosa 1-fosfato aldolasa. Los resultados obtenidos con RhuA, teóricamente, podrían extrapolarse a cualquiera de las otras aldolasas clonadas en pQE40, asumiendo que:

- Todas las aldolasas se expresan intracelularmente en forma soluble.
- Las proteínas recombinantes no son tóxicas para la célula.
- La carga metabólica impuesta por parte de los diferentes plásmidos, los cuales son aproximadamente del mismo tamaño, sobre *E. coli* M15 es similar. De esta forma, los requerimientos energéticos, los coeficientes de mantenimiento y los rendimientos intrínsecos biomasa/sustrato serán similares para todas las cepas recombinantes.
- El efecto de la expresión de las diferentes aldolasas recombinantes sobre la carga metabólica celular es similar. Además no existen problemas asociados a cuerpos de inclusión, y los niveles de expresión observados para cada una son parecidos.

La uniformidad en el sistema de expresión de las aldolasas es muy importante, ya que ya que una vez optimizada la producción con uno de ellos (en el caso concreto, *E. coli* M15 (pQErham)), solo sería necesario la introducción de mínimos ajustes en las condiciones de cultivo (si el caso lo amerita) para producir otras aldolasas, permitiendo un ahorro considerable de esfuerzo, tiempo y dinero.

El objetivo general de este capítulo consiste en desarrollar una estrategia de cultivo que permita maximizar la producción y productividad de RhuA mediante el sistema de expresión *E. coli* M15 (pQErham). En líneas generales, el estudio de la producción de RhuA se ha centrado en los siguientes aspectos:

- Selección del medio de cultivo: medio complejo (LB) y medio definido (MD)
- Optimización de la concentración del inductor químico IPTG, así como la temperatura y tiempo de inducción
- Búsqueda de una estrategia operacional dirigida a la obtención de cultivos de alta densidad celular

7.1 ESTUDIOS PRELIMINARES DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RhuA EN *E. coli* M15 (pQErham) Y *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham)

Una vez puesto a punto una metodología fiable y reproducible para la determinación de la actividad de RhuA, se procedió a realizar estudios cuantitativos en relación con el nivel de actividad de esta enzima en las dos construcciones recombinantes de los que se disponía en el laboratorio: *E. coli* M15 (pQErham) y *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham). La primera, construida por Vidal (Vidal 2002), y la segunda, construida por Garcia-Junceda (Garcia-Junceda et al. 1995). Para determinar el grado de expresión de RhuA en ambas cepas, se realizaron cultivos en Erlenmeyer con medio LB y antibióticos, tal como se describe en materiales y métodos. La figura 7.1 muestra los resultados obtenidos en relación con el seguimiento del crecimiento y expresión de RhuA de las cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) y *E. coli* M15 (pQErham) en medio LB.

Generalmente, la inducción de cultivos de *E. coli* con IPTG puede disminuir el crecimiento (Bentley et al. 1990; Miao and Kompala 1992). Sin embargo, el efecto opuesto se observó en los ensayos preliminares en *E. coli* M15 (pQErham), donde la biomasa calculada en cultivos inducidos era superior que en los controles no inducidos. En base a esta observación, se planteó hacer una determinación experimental del factor de conversión $DO_{600nm}/g_{PS} l^{-1}$ para *E. coli* M15 (pQErham), tanto de las células inducidas como no inducidas

El método empleado de rutina para medir la biomasa de los cultivos se basa en la determinación espectrofotométrica a 600 nm de la turbidez de la solución del medio de cultivo. Luego, se puede convertir este valor a concentración de biomasa ($g_{PS} l^{-1}$) multiplicando el valor de $DO_{600 nm}$ por un factor obtenido a partir de una correlación entre turbidez y peso seco celular, tal como se describe en materiales y métodos (apartado

3.11.1). Inicialmente, este factor se determinó experimentalmente para células de *E. coli* M15 recombinantes no inducidas, obteniendo un factor de $0.37 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. Sin embargo, para células de *E. coli* M15 recombinantes inducidas, se encontró un factor experimental de $0.26 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. Cuando este factor se aplicó para calcular la biomasa de células inducidas se observó que la concentración de biomasa era similar al control no inducido (figura 7.1-A). En el siguiente punto se discutirá más detalladamente sobre este fenómeno.

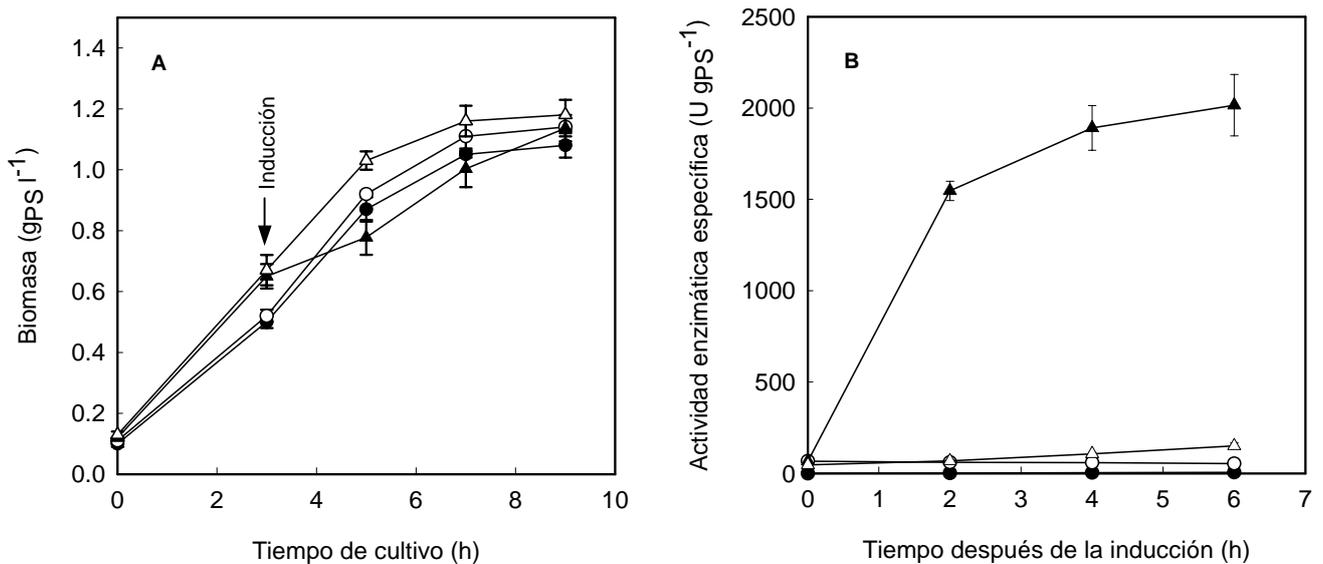


Figura 7.1. A - Comparación del crecimiento de las cepas de *E. coli* en medio LB en cultivos en Erlenmeyer e inducidas con IPTG (concentración final 50 μM - inducción a las 3 horas de cultivo). - \blacktriangle - *E. coli* M15 (pQErham) inducida; - \triangle - *E. coli* M15 (pQErham) no inducida; - \bullet - *E. coli* XL1 Blue MRF' (ptrcrham) inducida; - \circ - *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) no inducida. **B -** Comparación de la expresión de RhuA en cultivos en medio LB después de la inducción con IPTG (concentración final 50 μM). El tiempo = 0 corresponde al momento en que se agrega IPTG (excepto los controles) y se baja simultáneamente la temperatura de incubación a 30 $^{\circ}\text{C}$. Los resultados son el promedio de tres cultivos. Factor de conversión para células no inducidas: $0.37 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. Factor de conversión para células inducidas: $0.26 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$.

La figura 7.1-B muestra los valores de actividad específica RhuA para ambas cepas recombinantes después de la inducción. La actividad específica RhuA en células de *E. coli* M15 (pQErham) muestra un incremento de 13 veces respecto a las células no inducidas, y 21 veces respecto a las células inducidas de *E. coli* XL1 Blue MRF' (tabla 7.1). A partir de estos resultados, se descartó la utilización del sistema pTrc como vector de expresión de aldolasas, utilizando el sistema pQE como vector de elección para la expresión de RhuA y el resto de las aldolasas objetivo.

	<i>E. coli</i> M15 (pQErham)		<i>E. coli</i> XL1 Blue MRF' pTrcrham	
	+ IPTG	- IPTG (control)	+ IPTG	- IPTG (control)
Biomasa ($g_{PS} l^{-1}$)	1.13 ± 0.04	1.18 ± 0.05	1.08 ± 0.04	1.14 ± 0.03
Actividad aldolásica específica ($U g_{PS}^{-1}$)	2015 ± 168.2	151 ± 16.9	95.5 ± 8.8	53.8 ± 7.2

Tabla 7.1. Comparación del crecimiento y actividad aldolásica de las cepas de *E. coli* en medio LB e inducidas con IPTG (concentración final 50 μ M - inducción a las 3 horas de cultivo).

7.2. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE CONVERSIÓN $DO_{600nm}/Biomasa$ PARA CÉLULAS INDUCIDAS Y NO INDUCIDAS DE *E. coli* M15 (pQErham)

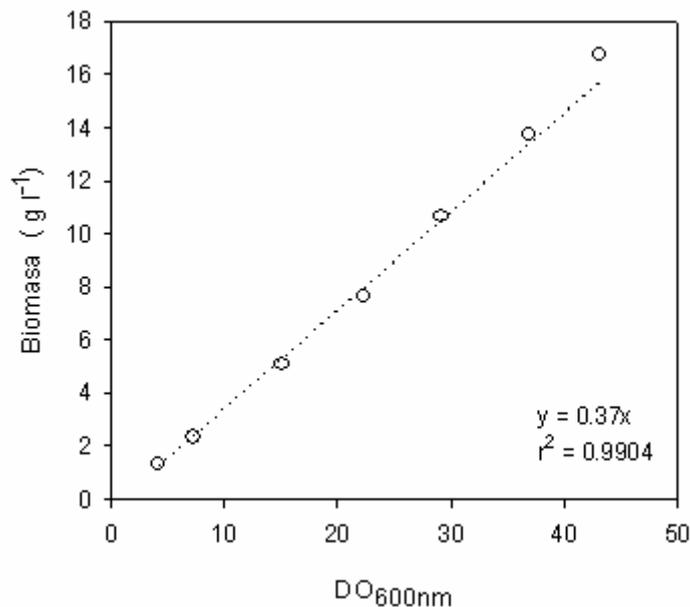


Figura 7.2. Curva de calibración de biomasa para *E. coli* M15 (pQErham) sin inducir en medio MD

La figura 7.2 representa la calibración de DO_{600nm} vs. $g_{PS} l^{-1}$ de células no inducidas de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD. Se observa que los datos se ajustan a una recta de pendiente 0.37 con una $r^2 = 0.99$ y que pasa por cero.

Se decidió estudiar si la inducción afectaba la relación $g_{PS} l^{-1}/DO_{600nm}$ para lo cual, se tomaron por duplicado 200 ml de un cultivo con células inducidas (DO_{600nm} final 18.1, actividad específica 1279 $U g_{PS}^{-1}$, 8.5 h cultivo, 37 $^{\circ}C$.), y se procedió a realizar el peso seco de las células según el mismo protocolo seguido para la curva de calibración de biomasa. Por otro lado, se procesó un control tomando 200 ml de un cultivo con células

no inducidas (DO_{600nm} 17.07, 7.45 h cultivo, 37 °C). Los resultados se muestran en la tabla 7.2:

	Factor esperado ($g_{PS} l^{-1} DO_{600nm}^{-1}$)	Factor experimental ($g_{PS} l^{-1} DO_{600nm}^{-1}$)
Células <i>E. coli</i> M15 (pQErham) no inducidas	0.37	0.35
Células <i>E. coli</i> M15 (pQErham) inducidas	0.37	0.26

Tabla 7.2. Factores de conversión DO_{600nm} /Biomasa para células de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas y no inducidas.

Basándonos en que el factor se obtiene de la siguiente relación:

$$Factor = \frac{g_{PS} l^{-1}}{DO_{600nm}}$$

la discrepancia que se observa entre células inducidas y no inducidas podría ser atribuible a:

- i) Cambios morfológicos de la bacteria: ello sería posible por un incremento del volumen celular a raíz de la gran cantidad de proteína recombinante que se acumula en el citoplasma (hasta 40 % de la proteína soluble intracelular). Luego, una célula inducida tendría una mayor tamaño y concomitantemente, una mayor $DO_{600 nm}$ que una no inducida, disminuyendo el factor.
- ii) Cambios en la composición celular: si el volumen celular es constante en ambas condiciones, la masa de las células inducidas debe ser menor, disminuyendo también el factor.

Para determinar si la acumulación de RhuA producía algún efecto sobre la morfología de las células que explicase este fenómeno, se realizó microscopia electrónica de *scanning* y transmisión de células de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas y no inducidas. La figura 7.3 revela la ausencia de cambios morfológicos significativos, por lo que la modificación se atribuyó a cambios intrínsecos a la composición celular, específicamente asociados a la acumulación de la proteína recombinante expresada.

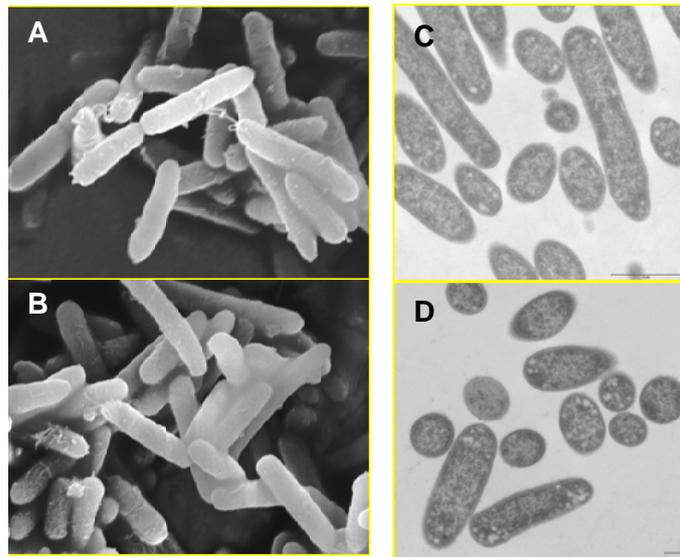


Figura 7.3. Microscopia electrónica de *scanning* y transmisión de células de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas (A, C) y no inducidas (B, D). Modo de operación: discontinuo alimentado.

Para evaluar si el nuevo factor para células inducidas era constante, se realizó un cultivo en discontinuo con medio MD, de manera de evaluar la evolución del cambio de factor después de la inducción. Para ello, se tomó 50 ml de muestra a diferentes tiempos después de la inducción, dividiéndose en 2 tubos (25 ml c/u), determinándose la DO_{600nm} y siguiendo el protocolo descrito para la calibración de biomasa. Los resultados después de la inducción se muestran en la tabla 7.3:

t (h)	$g_{PS} l^{-1}$	DO_{600nm}	Factor
7.17	4.00	14.0	0.29
	4.08	14.0	0.29
8.42	3.45	16.1	0.21
	4.31	16.1	0.27
9.83	4.89	17.5	0.28
	4.30	17.5	0.25

Tiempo de inducción = 5.1 h

Tabla 7.3. Factor de conversión $DO_{600nm}/Biomasa$ de *E. coli* M15 (pQErham) después de la inducción. Tiempo de inducción: 5.1 h.

Los resultados de la tabla anterior indican que, una vez inducidas las células, la relación $g_{PS} l^{-1}/DO_{600nm}$ se mantiene relativamente constante desde las dos hasta cinco horas después de la inducción. El promedio de los factores para células inducidas después de la inducción es $0.26 g_{PS} l^{-1} DO_{600nm}^{-1} \pm 0.03$.

Así, para los cálculos de concentración de biomasa ($g l^{-1}$) de células inducidas a partir de las lecturas de densidad óptica a 600 nm, se utilizó el valor de 0.26 en lugar de 0.37. Esto

permitió calcular los valores reales de concentración de biomasa ($g_{PS} l^{-1}$) y de actividad específica ($U g_{PS}^{-1}$) de todos los ensayos en discontinuo.

7.3 ESTUDIOS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RHUA EN *E. coli* M15 (pQErham) EN MEDIO COMPLEJO (LB) Y MEDIO DEFINIDO (MD) EN ERLLENMEYERS

Uno de los objetivos del proyecto de investigación es la obtención de grandes cantidades de aldolasas para ser utilizadas como biocatalizadores en la síntesis de sintonas quirales. Durany (Durany et al. 2004) trabajó con la producción de la enzima fuculosa 1-fosfato aldolasa de *E. coli* a partir de la cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) en cultivos por lote alimentado (*fed-batch*). Los resultados obtenidos mostraban la factibilidad de obtener cultivos de alta densidad celular en bioreactores empleando un medio definido y además, altas productividades bajo condiciones de inducción optimizadas.

Con la finalidad de extrapolar la misma estrategia operacional, se realizaron estudios preliminares en Erlenmeyers de la cepa *E. coli* M15 (pQErham) con medio MD, comparándose con cultivos realizados con otro medio de cultivo (LB) (figura 7.4).

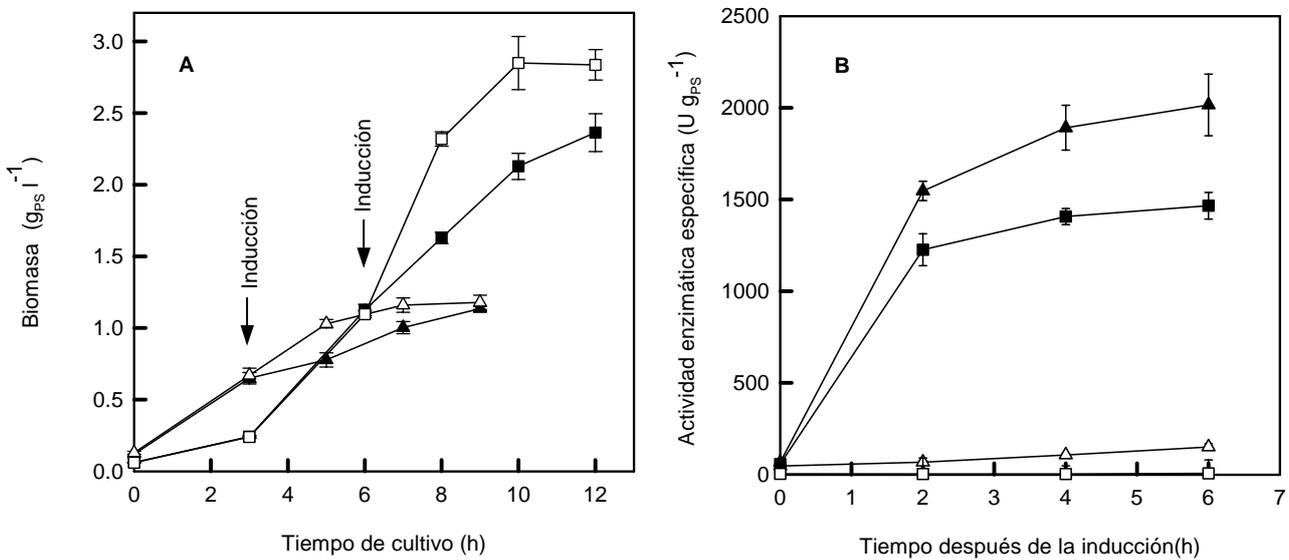


Figura 7.4. Comparación del crecimiento (A) y actividad aldolásica específica (B) de la cepa *E. coli* M15 (pQErham) en medio LB y MD en cultivos en Erlenmeyer. (-■-) Medio definido (inducción); (-□-) Medio definido (sin inducción); (-▲-) Medio LB (inducción); (-△-) Medio LB (sin inducción). La inducción con IPTG (concentración final 50 μ M) se realizó a las 3 h (LB) y 6 h (MD) del inicio del cultivo. Los resultados son el promedio de tres cultivos. En la figura B, el tiempo "0" corresponde al momento en que se agrega IPTG (excepto los controles) y se baja simultáneamente la temperatura de incubación a 30 °C. Factor de conversión para células no inducidas: 0.37 $g_{PS} l^{-1}/DO_{600nm}$. Factor de conversión para células inducidas: 0.26 $g_{PS} l^{-1}/DO_{600nm}$

En la figura 7.4-A se muestra que el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD es 2 veces superior comparado con el medio LB, aunque presenta una fase de latencia más larga. Esto podría ser debido a que el medio del inóculo utilizado es LB, por lo que las células requerirían un período de adaptación para las nuevas condiciones de crecimiento. Después de este periodo de latencia, la velocidad específica de crecimiento es mayor en MD. El criterio de inducción para ambos medios se basó en la adición de IPTG en la mitad de la fase exponencial de crecimiento (50 μM concentración final; 3 horas para LB y 6 horas para MD). Después de la inducción se observó una disminución de la velocidad específica de crecimiento en ambos medios comparada con el control no inducido, siendo la disminución mayor en medio MD

En relación con los niveles de expresión de RhuA, la figura 7.4-B muestra que, después de 2 horas de la inducción en medio LB y MD a 30 °C, se alcanza aproximadamente el 80 % de la actividad específica máxima de RhuA. También se observa que la actividad específica en medio LB (2016 U $\text{g}_{\text{PS}}^{-1}$) es 1.4 veces mayor que en medio definido (MD) (1466 U $\text{g}_{\text{PS}}^{-1}$).

Una posible explicación a este fenómeno vendría dada por una menor concentración de Zn^{2+} en el medio MD en comparación con el medio LB, el cual es necesario para la formación de la holoenzima activa. Así, si la concentración de Zn^{2+} en el medio MD no es adecuada, es posible que parte de las proteínas recombinantes que se produzcan sean inactivas.

En este sentido, se decidió estudiar el efecto de la concentración de Zn^{2+} en el medio definido y su influencia sobre la síntesis de RhuA. Para ello, se probaron concentraciones crecientes de Zn^{2+} en el medio de cultivo y se indujo a las 6 h con IPTG a una concentración final de 50 μM (figura 7.5).

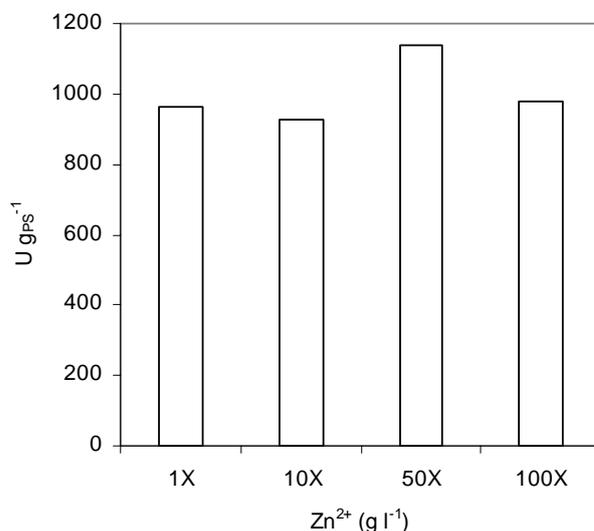


Figura 7.5.. Efecto del incremento de Zn^{2+} en el medio de cultivo MD sobre la síntesis de RhuA.

1X = 5.9×10^{-4} g l⁻¹ de Zn^{2+}

Se utilizó como fuente de zinc la sal $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Los cultivos se realizaron por duplicado para cada condición.

Los resultados obtenidos (figura 7.5) muestran que, aparentemente, la cantidad de zinc que aporta el medio MD es suficiente para sintetizar RhuA en su forma activa cuando se realizan cultivos en Erlenmeyer. Esto se deduce porque el incremento de la concentración de zinc (10X, 50X, 100X) en el medio no produce cambios significativos sobre la actividad específica de RhuA en células de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas.

Otra posible hipótesis para explicar la disminución en la actividad específica en MD comparada con la obtenida en LB estaría relacionada con la carga energética celular. En el caso del crecimiento en MD, la célula ha de sintetizar *de novo* todos los bloques moleculares necesarios para su integridad y funcionalidad, mientras que en el caso del medio LB, la célula utiliza parte de estos elementos básicos ya elaborados directamente del medio de cultivo, por lo que su capacidad energética será mayor comparada con las células que crecen en MD.

La tabla 7.4 muestra la producción enzimática ($U\ l^{-1}$), así como la productividad ($U\ l^{-1}\ h^{-1}$) para ambos medios en cultivos en Erlenmeyer.

	Medio MD		Medio LB	
	+ IPTG	- IPTG (control)	+ IPTG	- IPTG (control)
Biomasa ($g_{PS}\ l^{-1}$)	2.36 ± 0.13	2.84 ± 0.11	1.14 ± 0.04	1.18 ± 0.05
Actividad aldolásica específica ($U\ g_{PS}^{-1}$)	1466 ± 63	54 ± 7	2016 ± 169	151 ± 17
Producción global ($U\ l^{-1}$ de cultivo)	3460 ± 63	151 ± 14	2292 ± 218	179 ± 13
Productividad ($U\ l^{-1}\ h^{-1}$)	288 ± 5	13 ± 1	255 ± 24	20 ± 1

Tabla 7.4. Biomasa, actividad enzimática específica, producción volumétrica y productividad de *E. coli* M15 (pQErham) en medio LB y MD en cultivos en Erlenmeyer. La inducción se realizó a las 3 h (LB) y 6 h (MD) con 50 μ M IPTG. Los cultivos fueron realizados por triplicado, mostrándose los valores promedios y la desviación estándar. Para el cálculo de productividad, los tiempos finales de cultivo son: LB = 9 h; MD = 12 h. Factor de conversión para células no inducidas: 0.37 $g_{PS}\ l^{-1}/DO_{600nm}$. Factor de conversión para células inducidas: 0.26 $g_{PS}\ l^{-1}/DO_{600nm}$

A pesar de que el cultivo de *E. coli* M15 (pQErham) en MD muestra ser menos eficiente que el medio LB para la producción específica de RhuA recombinante, la producción y la productividad son mayores que en medio LB (tabla 7.4). Ello se debe a que se obtienen más células en medio MD y por consiguiente, más unidades de actividad aldolásica por volumen de cultivo.

Estos resultados sugieren que la utilización del medio MD como estrategia para la obtención de grandes cantidades de la enzima RhuA recombinante es mejor que el LB. Además, hay otras ventajas, tales como: i) es un medio más económico ii) permite la monitorización y control de los componentes del medio de cultivo y iii) se podría adaptar el sistema de cultivo en semicontinuo (*fed-batch*) optimizado por Durany (Durany et al. 2005) para la obtención de cultivos de alta densidad celular.

7.4 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INDUCTOR QUÍMICO IPTG

La optimización de la concentración de IPTG para la expresión de proteínas recombinantes es otro factor importante a considerar (Durany et al. 2004). En estudios de expresión a pequeña escala es habitual fijar una concentración de inductor que resulte en exceso y que asegure la total inducción del sistema. Sin embargo, bajo estas condiciones, existe el riesgo de inhibición del crecimiento de *E. coli* como resultado de la carga metabólica impuesta por la alta tasa de transcripción y traducción de la proteína recombinante (Bentley et al. 1991).

La concentración de IPTG más habitualmente utilizada cuando se trabaja con promotores tipo *lac* y derivados para la expresión de proteínas recombinantes citoplasmáticas solubles es alrededor de 1 mM (Donovan et al. 1996). Pero los criterios para fijar la concentración del inductor cambian cuando se plantea llevar a escala de producción un proceso de expresión de proteínas basado en este sistema. En estos casos, cabe considerar que:

1. Las concentraciones celulares finales obtenidas en bioreactor son superiores a las obtenidas en Erlenmeyer. Luego, mantener la misma concentración de inductor no garantiza la completa inducción del sistema. Se han publicado trabajos en que la concentración del inductor utilizada a nivel de Erlenmeyer para la total inducción del sistema resulta ineficiente cuando se aplica a cultivos de alta densidad celular, obteniéndose mejoras de productividad muy considerables cuando se incrementaba esta concentración del inductor en el medio (Kweon et al. 2001)
2. El IPTG es un inductor de alto coste, por lo que se hace necesario optimizar su concentración para disminuir los costes de proceso.

En este sentido, se realizó un estudio preliminar en Erlenmeyers para encontrar la concentración mínima necesaria de IPTG en función de la concentración celular que se espera llegar al final del crecimiento, de forma de obtener el máximo de actividad específica. Luego, la estimación de la cantidad de inductor utilizado por unidad de

biomasa permitiría, en un principio, establecer un criterio fiable de inducción bajo cualquier modo operacional.

Como se puede observar en la figura 7.6, se requieren aproximadamente 18 $\mu\text{moles IPTG/g}_{\text{PS}}$ (correspondientes a 30 $\mu\text{M IPTG}$ de concentración final) para obtener el máximo de actividad específica en cultivos en Erlenmeyer. Además, se observa que por encima de este valor, el incremento en la concentración de IPTG no conduce a un incremento de la actividad específica. Esta concentración, significativamente menor que la recomendada por QIAGEN (1000 μM), permitió establecer un criterio inicial para obtener, utilizando la mínima cantidad de IPTG, una eficiente sobreexpresión de RhuA en los cultivos en bioreactor, tanto en operaciones en discontinuo como discontinuo alimentado,

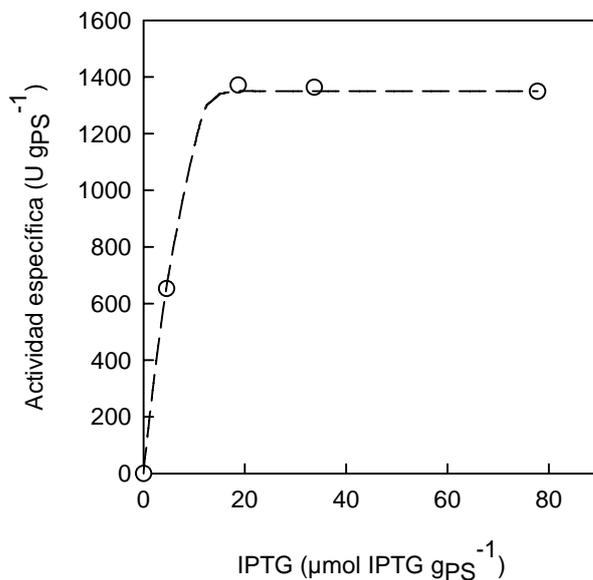


Figura 7.6. Niveles de actividad específica de RhuA en células de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD inducidas con diferentes cantidades de IPTG, normalizadas por la biomasa presente a las 4 h después de la inducción. Factor de conversión para células inducidas: $0.26 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1} / \text{DO}_{600\text{nm}}$

7.5 ENSAYOS EN BIOREACTOR. OPERACIÓN EN DISCONTINUO.

El objetivo de estos ensayos es extrapolar los resultados obtenidos en Erlenmeyer a un fermentador (Biostat B) de 2 l. Para ello, se utilizaron medios y condiciones similares a las empleadas en los ensayos con Erlenmeyer, tales como la disminución de la temperatura después de la inducción a 30°C y el medio MD (materiales y métodos, apartado 3.8.5). A diferencia de los cultivos en Erlenmeyer, se empleó una concentración mayor de glucosa (22.5 g l^{-1}), se controló la concentración de O_2 disuelto, fijándola en 50 % (agitación en cascada) y el pH, fijándose en 7.0 ± 0.05 mediante la adición de NH_4OH .

7.5.1 Estudio del efecto del tiempo de inducción sobre el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) y la expresión de RhuA

Estrategia de inducción: la inducción se realizó en la fase exponencial de crecimiento, evaluando el efecto sobre el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) y la actividad específica de RhuA en cultivos en discontinuo con un volumen operacional de 0.8 l, utilizando medio MD. Por otro lado, se evaluó el efecto de la inducción a diferentes tiempos de la fase exponencial de crecimiento:

- a. Fase temprana: inducción al inicio de la fase exponencial de crecimiento
- b. Fase tardía: inducción al final de la fase exponencial de crecimiento

Al igual que en los ensayos en Erlenmeyer, la temperatura se redujo desde 37 °C a 30 °C en el momento de inducción de la proteína recombinante para minimizar la posibilidad de formación de cuerpos de inclusión y favorecer un correcto plegamiento de la proteína.

Cantidad de IPTG: en base al estudio del efecto del IPTG sobre la actividad específica de *E. coli* M15 pQErham en Erlenmeyer, se determinó que se requerían al menos de 18 $\mu\text{moles de IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$ para alcanzar el nivel de saturación de enzima intracelular (aproximadamente 1400 U $\text{g}_{\text{PS}}^{-1}$). Para los cultivos en bioreactor con inducción se tomó como valor de referencia 20 $\mu\text{moles de IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$ con el objetivo de utilizar la mínima cantidad indispensable para asegurar una completa inducción de las células. La adición en exceso de IPTG, por un lado, no permite obtener un mayor nivel de actividad específica, y por otro, podría tener efectos tóxicos sobre las células.

El promedio final de biomasa obtenido en cultivos preliminares no inducidos en bioreactor operando en discontinuo con medio MD es de $8.8 \text{ g}_{\text{PS}} \pm 0.2 \text{ g}_{\text{PS}}$ al final del proceso ($n = 5$ fermentaciones; $\text{DO}_{600\text{nm}}$ final = 29.7 ± 0.6 ; factor = 0.37; biomasa: $11.0 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1} \pm 0.2 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$; volumen = 0.8 l). Luego, para inducir $8.8 \text{ g}_{\text{PS}}$ se necesitarían 176 $\mu\text{moles de IPTG}$. De esta forma, la concentración final de IPTG (aproximada) en el fermentador será de 220 μM .

7.5.2 Efecto del tiempo de inducción (fase temprana y tardía de crecimiento exponencial)

La figura 7.7-A muestra el crecimiento de células inducidas y no inducidas de *E. coli* M15 (pQErham) en bioreactor con medio MD. Se estudiaron dos tiempos de inducción (5.6 h y 6.8 h), los cuales corresponden a la fase temprana y tardía de crecimiento exponencial respectivamente. Se observó que la velocidad específica de crecimiento disminuía en ambos casos después de la inducción, deteniéndose el crecimiento a las 12.0 h y 10.8 h

respectivamente y que la concentración de biomasa final fue inferior para la inducción en fase temprana ($5 \text{ g g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$) comparada con la fase tardía ($8 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$). Ya que la concentración de biomasa final para ambos experimentos fue inferior comparada con el control no inducido ($11.5 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$), se sugirió que la cantidad de IPTG que se utiliza en los ensayos en bioreactor afectaba el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham). Sin embargo, la disminución en la velocidad de crecimiento, así como la menor concentración de biomasa en cultivos inducidos, pueden ser efecto de i) la disminución de la temperatura del cultivo a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en la inducción, y ii) el cambio de factor utilizado para transformar unidades de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a $\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$. Luego, para determinar el efecto del IPTG sobre el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham), se compararon solamente los experimentos inducidos. De los resultados obtenidos, se deduce que, efectivamente, el IPTG puede afectar el crecimiento cuando se adiciona en fase temprana de crecimiento.

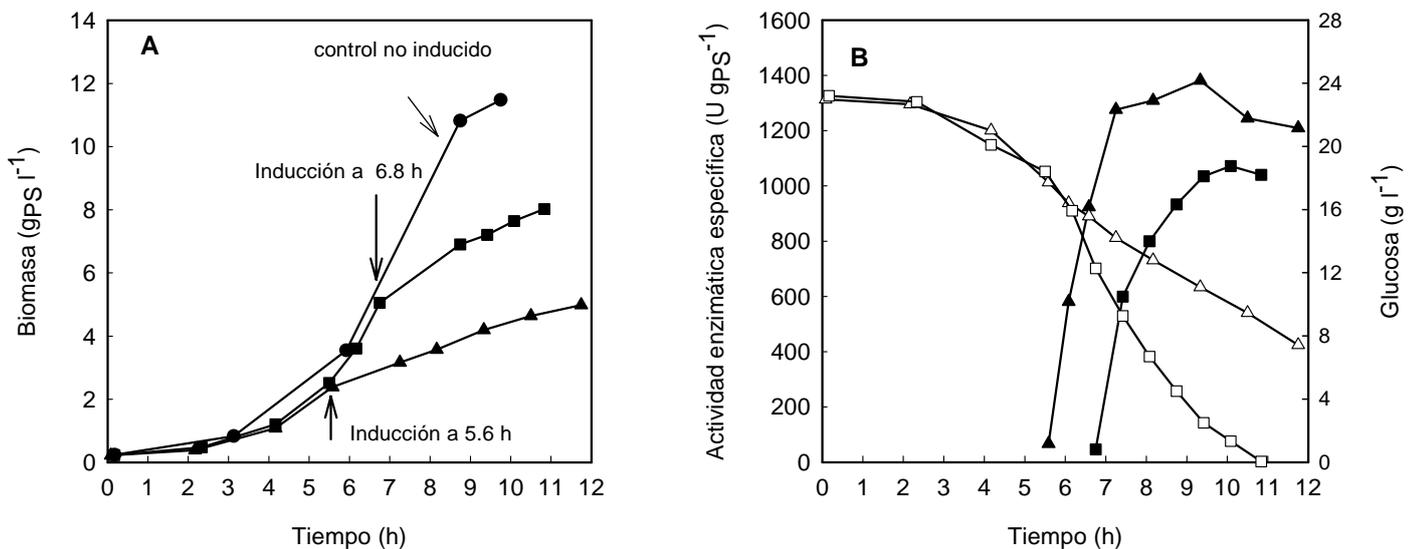


Figura 7.7. A - Curva de crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD en bioreactor de 2 l (volumen operacional 0.8 l) a diferentes tiempos de inducción. B- Concentración de glucosa y actividad específica de RhuA. La inducción se realizó con $176 \mu\text{mol}$ de IPTG. Los símbolos negros corresponden a la biomasa y actividad específica y los símbolos vacíos a la concentración de glucosa. -●- Cultivo no inducido (control); -■- cultivo inducido a las 6.8 h; -▲- cultivo inducido a las 5.6 h. Factor de conversión para células no inducidas: $0.37 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. Factor de conversión para células inducidas: $0.26 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$

La actividad específica RhuA y el perfil de consumo de glucosa se presentan en la figura 7.7-B. Se observa una mayor actividad específica final cuando la inducción se realiza a las 5.6 h ($1250 \text{ U g}_{\text{PS}}^{-1}$) comparado con la inducción a las 6.8 h ($1040 \text{ U g}_{\text{PS}}^{-1}$). Estas diferencias pudieran ser causadas por una limitación de glucosa al final de la fermentación.

La tabla 7.5 muestra la relación $\mu\text{moles IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$ en el ensayo de inducción en fase tardía (FERM-tardía) y temprana (FERM-temprana). Se observa que en ambos caso, la relación no está por debajo del límite establecido para obtener la completa inducción de las células ($20 \mu\text{moles de IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$) ni en el momento de la inducción ni al final del ensayo. Así, los valores de actividad específica de RhuA de ambos experimentos dependerán de otros factores diferentes a la concentración del inductor.

	INICIO INDUCCIÓN				FINAL INDUCCIÓN		
	Tiempo de inducción (h)	$\mu\text{moles IPTG adicionados}$	Biomasa (g_{PS})	$\mu\text{mol IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$	Tiempo (h)	Biomasa (g_{PS})	$\mu\text{mol IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$
FERM-tardía	6.8	176	3.9	45	10.8	6	29
FERM-temprana	5.6	176	1.8	98	12.0	3.7	48

Tabla 7.5. Relación $\mu\text{moles de IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$ en los ensayos en bioreactor bajo condiciones de inducción temprana/tardía de la fase exponencial de crecimiento. Medio utilizado: MD. Volumen operacional: 0.8 l. Factor de conversión para células no inducidas: $0.37 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$. Factor de conversión para células inducidas: $0.26 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$

La tabla 7.6 muestra que la producción volumétrica de RhuA es mayor al inducir tardíamente (8320 U l^{-1}) comparado con la inducción temprana (6250 U l^{-1}), sugiriendo que, a la hora de evaluar un proceso, la obtención de grandes cantidades de biomasa pueden tener un peso relevante para tomar decisiones a la hora de definir una estrategia para obtener grandes cantidades de enzima recombinante.

	Tiempo de inducción (h)	Biomasa final ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$)	Actividad específica RhuA ($\text{U g}_{\text{PS}}^{-1}$)	Producción (U l^{-1})
FERM-tardía	6.8	8.0	1040	8320
FERM-temprana	5.6	5.0	1250	6250

Tabla 7.6. Comparación de la producción de RhuA a diferentes tiempos de inducción en bioreactor. Medio utilizado: MD. Volumen operacional: 0.8 l. Factor de conversión para células inducidas: $0.26 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}/\text{DO}_{600\text{nm}}$

7.5.3 Comparación de la composición elemental de Zn^{2+} entre células inducidas y no inducidas

En el ensayo realizado en el apartado 7.3 se demostró que el incremento en la cantidad de zinc en el medio definido en cultivos en Erlenmeyer no producía un incremento en la actividad específica de RhuA. De ello se dedujo que la cantidad de zinc aportada por el medio definido era suficiente y no limitaba la formación de la holoenzima activa.

En los cultivos en bioreactor, la cantidad de biomasa generada es, al menos, 3 veces mayor comparada con un cultivo en Erlenmeyer. Por ello, se hace necesario determinar la cantidad de zinc que contiene una célula inducida para saber si el medio definido es capaz de cubrir los requerimientos celulares de zinc. Utilizando las células inducidas del ensayo anterior, se determinó la composición elemental para conocer su composición en zinc (tabla 7.7)

	Teórico ^a	FERM-tardía ^b	FERM-temprana ^c
Contenido de zinc en las células (mg Zn^{2+} /100 g_{PS})	5.0	7.9	10.3
Actividad específica (U g_{PS}^{-1})	-	1040	1250

^a (Kenneth et al. 1995)

^b Fermentación en medio MD con inducción a las 6.8 h (176 μ mol IPTG)

^c Fermentación en medio MD con inducción a las 5.6h (176 μ mol IPTG)

Tabla 7.7. Composición de zinc de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas

Se observa que, para células inducidas, el porcentaje de Zn^{2+} en la biomasa es mayor que para células no inducidas (valor teórico). También se observa que las células con mayor actividad específica (1250 U g_{PS}^{-1}) poseen mayor cantidad de Zn^{2+} en la biomasa comparadas con la que posee una menor actividad (1040 U g_{PS}^{-1}). De ello se deduce que los requerimientos de zinc de las células *E. coli* M15 (pQErham) se encuentran en función de su composición basal más la cantidad de proteína recombinante RhuA producida.

En resumen, para cultivos en bioreactor, especialmente para experimentos de inducción, debe haber como mínimo 0.1 mg de Zn^{2+} g_{PS}^{-1} para que *E. coli* M15 (pQErham) pueda sintetizar la holoenzima RhuA en su forma activa.

La tabla 7.8 muestra el aporte de zinc del medio MD en cultivos en bioreactor (volumen operacional 0.8 l) y la cantidad requerida para la formación de la holoenzima activa. Se observa que el zinc aportado por el medio de cultivo se aproxima al valor requerido para sintetizar la holoenzima activa, sugiriendo que sería necesario incrementar la aportación de zinc en los cultivos donde se obtengan mayores valores de biomasa.

	Biomasa final (g _{PS})	Concentración de Zn ²⁺ en medio MD (mg l ⁻¹)	mg Zn ²⁺ aportados por el medio MD (V = 0.8 l)	mg Zn ²⁺ teóricos para formación holoenzima activa
FERM-tardía	6.0	0.6	0.5	0.6
FERM-temprana	3.7	0.6	0.5	0.4

Tabla 7.8. Cálculo de la cantidad de zinc que se necesitaría para formación de la holoenzima RhuA activa (enzima + cofactor) en cultivos inducidos de *E. coli* M15 (pQErham) utilizando medio MD. Para el cálculo de la cantidad de zinc requerida se utilizó la relación experimental 0.1 mg de Zn²⁺ g_{PS}⁻¹

7.5.4 Estudio del efecto de la temperatura sobre la expresión de RhuA

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la expresión de RhuA se realizó un cultivo comparativo sin reducción de la temperatura al momento de la inducción. La figura 7.8 muestra los resultados de dos cultivos llevados a cabo en condiciones similares e inducidos al mismo tiempo (fase exponencial temprana de crecimiento: 5.6 h), pero con diferentes temperaturas de cultivo después de la inducción: 37 y 30 °C. Se observa que, aunque se alcanzan valores similares de biomasa en ambas condiciones (figura 7.8-A), el tiempo para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento es diferente (9 h a 37 °C y 12 h a 30 °C).

Por otro lado, el crecimiento en el cultivo a 37 °C se detiene antes que el cultivo a 30 °C después de la inducción (2.5 h y 6.5 horas respectivamente). La actividad específica final de RhuA en ambos casos es similar: 1250 U g_{PS}⁻¹, mostrando un perfil de producción similar en ambos ensayos (figura 7.8-B). Estos resultados sugieren que la temperatura, en el intervalo estudiado, no ejerce un efecto importante sobre los niveles de actividad enzimática específica y de la tasa de producción de enzima, por lo que la disminución de la temperatura no sería necesaria después de la inducción.

A la hora de definir cual sería la temperatura de inducción para un proceso de producción de RhuA, se consideró no solamente la actividad específica obtenida, sino también la productividad. En este sentido, el tiempo requerido para alcanzar la máxima producción enzimática volumétrica (6000 U l⁻¹) es menor a 37°C (figura 7.8-C), lo que implica una mayor productividad (750 U l⁻¹ h⁻¹) comparada con la inducción a 30 °C (500 U l⁻¹ h⁻¹). En base a estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron a 37°C sin modificar la temperatura a la hora de inducir.

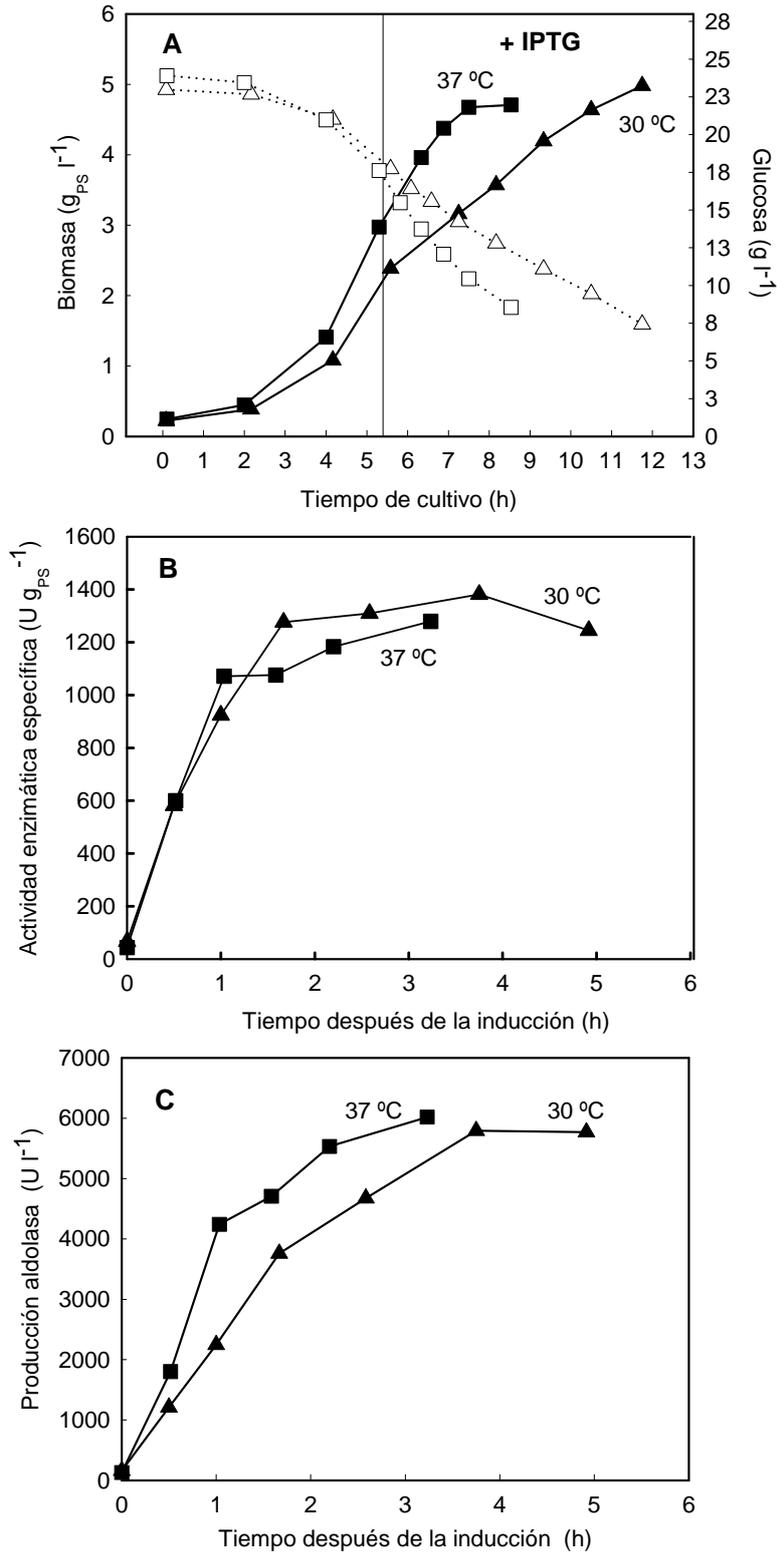


Figura 7.8. Efecto de la temperatura después de la inducción sobre (A) crecimiento y consumo de glucosa, (B) actividad específica RhuA y (C) producción volumétrica de RhuA para *E. coli* M15 (pQErham) en cultivos en bioreactor de 2 l con medio MD (volumen operacional 0.8 l). La inducción se realizó con 176 μ moles de IPTG a las 5.6 h. Los símbolos negros corresponden a la biomasa, producción enzimática volumétrica y actividad específica de RhuA. Los símbolos vacíos corresponden a la concentración de glucosa. (-■-) Temperatura de cultivo después de la inducción de 37 °C. (-▲-) Temperatura de cultivo de 30 °C después de la inducción.

7.5.5 Comparación de la velocidad de crecimiento y rendimiento aparente de los cultivos en bioreactor

La tabla 7.9 muestra las velocidades de crecimiento (μ) y el rendimiento aparente biomasa-glucosa ($Y_{X/S}$) antes y después de la inducción para todos los experimentos en discontinuo en bioreactor. La velocidad específica de crecimiento antes de la inducción corresponde a μ_{max} ya que la inducción se realizó en la etapa temprana de la fase exponencial de crecimiento; μ_{ind} corresponde a la velocidad específica de crecimiento después de la inducción (1.5 h aproximadamente). Se observa que hay una disminución importante en la μ y en $Y_{X/S}$ después de la inducción con IPTG en todos los casos, asociado a la respuesta metabólica de la célula por la inducción de la expresión de la proteína recombinante.

	Temperatura (°C)		Velocidad de crecimiento (μ)		Rendimiento aparente $Y_{X/S}$ ($\frac{g_{PS}}{g_{glucosa}}$)	
	FC	FI	FC (μ_{max})	FI (μ_{ind})	FC	FI
Control (sin inducción)	37	---	0.52	----	0,43	----
FERM-tardía	37	30	0.53	0.16	0.46	0.26
FERM-temprana	37	30	0.53	0.16	0.45	0.25
FERM – temprana (sin reducción de temperatura)	37	37	0.57	0.25	0.43	0.19

Tabla 7.9. Temperatura de cultivo, velocidad específica de crecimiento (μ) y rendimiento aparente biomasa-glucosa ($Y_{X/S}$) durante la fase de crecimiento (C) y durante la fase de inducción (I) para diferentes fermentaciones en discontinuo. Cada cultivo se realizó en bioreactor con 0.8 l (volumen operacional) de medio MD. Para las fermentaciones B,C,D, se utilizó 176 μ moles de IPTG para inducir en cada caso. FC: fase de crecimiento. FI: fase de inducción.

7.6. CONCLUSIONES

- a. La síntesis de RhuA depende en gran medida del crecimiento de la bacteria y, por ende, a la presencia de una fuente de carbono y energía en el medio de cultivo.
- b. El IPTG puede afectar el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) cuando se adiciona en fase temprana de crecimiento en cultivos con medio MD, posiblemente por un efecto de la carga metabólica impuesta por brusca producción de la proteína recombinante.
- c. La utilización de un promotor fuerte (T5) para la síntesis de la proteína recombinante permite que más del 80 % de la misma se sintetice a las dos horas de haber inducido cuando el cultivo se realiza a 30 °C. En cambio, este valor se reduce a 1 hora cuando la inducción se realiza a 37 °C
- d. La cantidad mínima de IPTG necesaria para la inducción de *E. coli* M15 (pQErham) en cultivos en discontinuo es aproximadamente 18 $\mu\text{mol g}_{\text{PS}}^{-1}$. La adición de IPTG por encima de este valor no incrementa la síntesis de la proteína recombinante.
- e. La adición de IPTG en fase exponencial temprana de crecimiento afecta el crecimiento de *E. coli* M15.
- f. La composición de Zn^{+2} en células de *E. coli* M15 (pQErham) inducidas es 10.3 mg de Zn^{2+} por 100 g de biomasa, y que este valor debe ser tomado en consideración para la formulación del medio de cultivo en ensayos en bioreactor.
- g. La máxima actividad específica de RhuA en *E. coli* M15 (pQErham) es independiente de la temperatura de inducción (en el intervalo entre 30 y 37 °C), siempre y cuando no haya limitaciones de nutrientes ni inhibidores del crecimiento. Sin embargo, la productividad de los cultivos es mayor a 37 °C.
- h. La inducción modifica la densidad de las células *E. coli* M15 (pQErham) debido a cambios intrínsecos a la composición celular asociados a la acumulación de la proteína recombinante expresada. Luego, se debe considerar un factor de conversión $\text{DO}_{600\text{nm}}/\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$ de 0.37 para células no inducidas y de 0.26 para células inducidas con una actividad RhuA alrededor de 1250 $\text{U g}_{\text{PS}}^{-1}$.

7.7. BIBLIOGRAFIA

- Bentley WE, Davis RH, Kompala DS. 1991. Dynamics of Induced cat Expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 38(7):749-760.
- Bentley WE, Mirjalili N, Andersen DC, Davis RH, Kompala DS. 1990. Plasmid-Encoded Protein - the Principal Factor in the Metabolic Burden Associated with Recombinant Bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 35(7):668-681.
- Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. 1996. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol.* 16(3):145-154.
- Durany O, Caminal G, de Mas C, Lopez-Santin J. 2004. Studies on the expression of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry* 39(11):1677-1684.
- Durany O, de Mas C, Lopez-Santin J. 2005. Fed-batch production of recombinant fuculose-1-phosphate aldolase in *E-coli*. *Process Biochemistry* 40(2):707-716.
- Garcia-Junceda E, Shen GJ, Sugai T, Wong CH. 1995. A New Strategy for the Cloning, Overexpression and One-Step Purification of 3 DHAP-Dependent Aldolases - Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase, Fuculose-1-Phosphate Aldolase and Tagatose-1,6-Diphosphate Aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* 3(7):945-953.
- Kenneth WY, Miranda GS, Wah KT. 1995. Formulation and optimization of two culture media for the production of tumor necrosis factor- β in *Escherichia coli*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62:289-294.
- Kweon DH, Han NS, Park KM, Seo JH. 2001. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 36(6):537-542.
- Miao F, Kompala DS. 1992. Overexpression of Cloned Genes Using Recombinant *Escherichia coli* Regulated by a T7-Promoter .1. Batch Cultures and Kinetic Modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 40(7):787-796.
- Vidal L. 2002. Producción de ramnulosa 1-fosfato aldolasa recombinante de *E. coli* mediante el sistema de expresión pQE-40. Memoria de Master, Universitat Autònoma de Barcelona.

8. SELECCIÓN DE UNA ESTRATEGIA OPERACIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE RhuA EN *E. coli* M15 (pQErham)

8. 1. INTRODUCCION

La optimización de procesos para la obtención de productos recombinantes tiene como objetivo principal no solamente obtener la máxima cantidad del producto en un volumen dado de trabajo sino también mejorar las condiciones de producción y expresión para conseguirlo en el menor tiempo posible (productividad).

Para conseguir este objetivo es necesario en primer término, el estudio de la optimización de una estrategia de cultivo que permita conseguir cultivos de alta densidad celular, y segundo, en un lapso de tiempo razonable para que el coste del proceso sea económicamente viable.

Trabajar con técnicas que permitan obtener cultivos de alta densidad celular (CADC) supone, entre otras ventajas, la reducción del volumen de cultivo. Este aspecto es de mucha importancia para hacer un escalado del proceso, ya que facilita la manipulación final del caldo de fermentación para la recuperación de productos de interés, se reduce el volumen de agua residual (que generalmente necesitan tratamientos especiales) y se reducen los costos de inversión en equipo. Todo esto, en conjunto, permite una reducción global del coste del proceso.

En este capítulo se pretende establecer un proceso de fermentación reproducible para obtener CADC de *E. coli* M15 (pQErham) y las condiciones de inducción y de operación óptimas para maximizar la concentración final de RhuA y la productividad del proceso.

La introducción de este capítulo se centra en la revisión de diferentes estrategias que se han utilizado para la obtención de CADC de *E. coli*.

8.1.1 Estrategias para la obtención de CADC

Para obtener cultivos de alta densidad celular es necesario trabajar con estrategias semicontinuas limitando el crecimiento del cultivo mediante la adición controlada de un sustrato esencial. De esta manera, es posible solucionar los principales problemas que se presentan al intentar incrementar la concentración celular, entre los cuales se enumeran:

1. La baja solubilidad de algunos sustratos sólidos o gaseosos en el medio acuoso que limita su disponibilidad para el crecimiento
2. El efecto inhibitorio asociado a altas concentraciones de sustratos (glucosa, amonio, etc.) o de productos derivados del propio metabolismo celular en

determinadas condiciones de crecimiento (para *E. coli*, principalmente ácido acético)

3. La creciente demanda de oxígeno para mantener el crecimiento celular, así como el incremento de la viscosidad del medio. Estos dos aspectos harán que la velocidad de transferencia de oxígeno del medio a la célula sea cada vez más crítico, limitando el crecimiento celular.

Una fermentación semicontinua para obtener CADC consta, generalmente, de dos etapas: una inicial discontinua, y a continuación, una segunda etapa alimentada. La etapa discontinua se caracteriza por tener un medio de cultivo con concentraciones altas de nutrientes, pero no inhibitorias. En esta etapa, se consiguen velocidades de crecimiento máximas. La segunda etapa comienza cuando se agota en el medio de cultivo inicial el nutriente fijado como limitante para el crecimiento, típicamente la fuente de carbono. Durante esta etapa hay que alimentar este nutriente limitante para mantener un crecimiento controlado. Para obtener CADC resultan críticos tanto la selección de la estrategia de alimentación como la composición del medio de cultivo: inicial y alimento.

8.1.2. Desarrollo de medios de cultivo para estrategia semicontinuas de cultivo de *E. coli*

Algunos componentes esenciales del medio de cultivo, tales como la fuente de carbono y de amonio, pueden inhibir el crecimiento celular de *E. coli* cuando sobrepasan ciertas concentraciones (tabla 8.1). Esto explica que, para conseguir CADC, incrementar la concentración de nutrientes en un cultivo discontinuo no resulte una estrategia viable

Compuesto	Efecto inhibitorio (g l ⁻¹)
Glucosa	50
Amonio	3
Hierro	1.15
Magnesio	8.7
Fósforo	10
Zinc	0.038
Acetato	5

Tabla 8.1. Concentraciones por sobre las cuales se han descrito efectos inhibitorios para el crecimiento de *E. coli* (Riesenberg 1991; Riesenberg et al. 1991).

Teniendo en cuenta estos aspectos, se hace necesario el diseño de un medio de cultivo equilibrado que contenga todos los elementos necesarios para el crecimiento en cada una de las etapas pero que, al mismo tiempo, evite la acumulación de ningún componente hasta concentraciones inhibitorias. La tendencia general se dirige hacia simplificar la composición del alimento y cargar al máximo el medio inicial, intentando que no sea necesario alimentar más que la fuente de carbono y nitrógeno. Así, alimentando solamente con disoluciones concentradas de glucosa, amonio, magnesio y los componentes necesarios según las auxotrofías puntuales de la cepa en estudio, se han conseguido concentraciones celulares superiores a 100 g l^{-1} con diferentes cepas recombinantes de *E. coli* (Riesenberg 1991; Yee and Blanch 1993b)

Los medios definidos, al permitir conocer la concentración de cada nutriente durante el proceso, son los que han conseguido densidades celulares superiores. Además, permiten el desarrollo de estrategias de control robustas basadas en el seguimiento analítico del proceso (Riesenberg and Guthke 1999). La suplementación de nutrientes complejos que puedan variar en su composición y calidad entre lotes, hace que los procesos seña menos reproducibles y dificulta su seguimiento analítico. Sin embargo, en muchas ocasiones, la mejora en los rendimientos de expresión recombinante justifica su elección (Kweon et al. 2001; Li et al. 1998). La máxima concentración de biomasa en cultivo semicontinuo y medio semicomplejo es de 86 g l^{-1} (Macaloney et al. 1996), pero fue posible gracias a un complicado sistema de control basado en espectroscopia de infrarrojos cercano (NIR) para el control de la fuente de carbono, amonio y otros productos simultáneamente. En general, los trabajos publicados en que se describen concentraciones celulares superiores a 50 g l^{-1} empleando soluciones complejas son escasos, mientras que cuando se trabaja con medios definidos, éstas son ampliamente superadas (tabla 8.2)

Un aspecto importante a considerar tanto en la elección del medio de cultivo como en la estrategia de alimentación es la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Los problemas derivados de la acumulación de ácido acético, principal producto inhibitorio del crecimiento de *E. coli*, se intensifican en procesos semicontinuos al alargarse el tiempo de fermentación respecto a los procesos discontinuos. Su acumulación afecta disminuyendo la velocidad de crecimiento, rendimientos celulares y producción de proteína recombinante. En procesos semicontinuos para la obtención de CADC, la velocidad de acumulación de acético depende básicamente de la composición del medio de cultivo y la velocidad de crecimiento. Algunos trabajos indican que la inhibición por acético se acentúa en medios de composición compleja frente a los de composición definida (Pan et al. 1987) y por otro lado, no se puede generalizar en relación con las

velocidades críticas para su producción, las cuales oscilan entre 0.05 h^{-1} y 0.4 h^{-1} , dependiendo de la cepa de trabajo, del medio de cultivo y la estrategia operacional.

Cepa de <i>E. coli</i>	Medio de cultivo (fuente de carbono)	Estrategia semicontinua	Biomasa final ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$)	Referencia
W33310	Definido (G)	Reactor de diálisis/Alimentación constante	190	Nakano, 1997
X90	Definido (G)	Exponencial prefijada (NR)	92	Yee, 1993b
TG1	Definido (G)	Exponencial prefijada (NR)	128	Korz, 1995
TG1	Definido (Gli)	Exponencial prefijada (NR)	148	Korz, 1995
JM105	Definido (G)	Exponencial prefijada (NR)	110	DeLisa, 1999
JM109	Definido (G)	Exponencial prefijada (NR)	100	Wilms, 2001
WSH-KE1	Semicomplejo (G)	Exponencial prefijada (NR)	59	Kweon, 2001
TG1	Definido	Control específico de μ por medición en línea f.c.	60	Riesenberg, 1990
TG1	Definido	Control específico de μ por medición en línea f.c.	145	Horn, 1996
K12	Semicomplejo (Gli)	Control específico de μ por medición en línea f.c.	86	Macaloney, 1996
XL1 Blue	Definido (G)	Glucosa-stat	25	Wang, 2001
XL1 Blue	Definido (Gli)	pH-stat	27	Wang, 2001
XL1 Blue	Definido (G)	pH-stat	120	Choi, 1999
BL21 DE3	Definido (G)	DO-stat	40	Akesson, 2001
TG1	Definido (G)	CER/DO-stat	110	Riesenberg, 1991
MC1061	Semicomplejo (G)	CER/DO-stat	58	Mendoza-Vega, 1995
XL1 Blue MRF'	Definido (G)	Exponencial prefijada (NR)	45	Durany, 2005
K12	Definido (G)	Reactor de diálisis/Glucosa-stat	190	Fuchs, 2002

Tabla 8.2. Resumen bibliográfico de estrategias semicontinuas utilizadas para el cultivo de *E. coli*. G: Glucosa; Gli: glicerina; f.c.: fuente de carbono; NR: sin control retroalimentado.

Experimentos en cultivos en continuo sugieren que la capacidad limitada del metabolismo oxidativo de *E. coli* pudiera ser responsable de la formación de acético (Han et al. 1992). A bajas tasas de crecimiento, los requerimientos anabólicos y catabólicos pudieran ser satisfechos por el metabolismo oxidativo, mientras que a altas tasas de crecimiento, estos dos requerimientos pudieran exceder la capacidad metabólica y, bajo estas circunstancias, *E. coli* reorganizaría el metabolismo produciendo acético, el cual constituye la segunda fuente de energía aeróbica de ATP y NADH (Han et al. 1992).

La figura 8.1 muestra un esquema de la vía de producción de acético en *E. coli*, donde se observa que el NADH_2 es oxidado durante la conversión de piruvato a etanol o ácido láctico, mientras que se genera NADH_2 y ATP durante la conversión de piruvato a ácido acético.

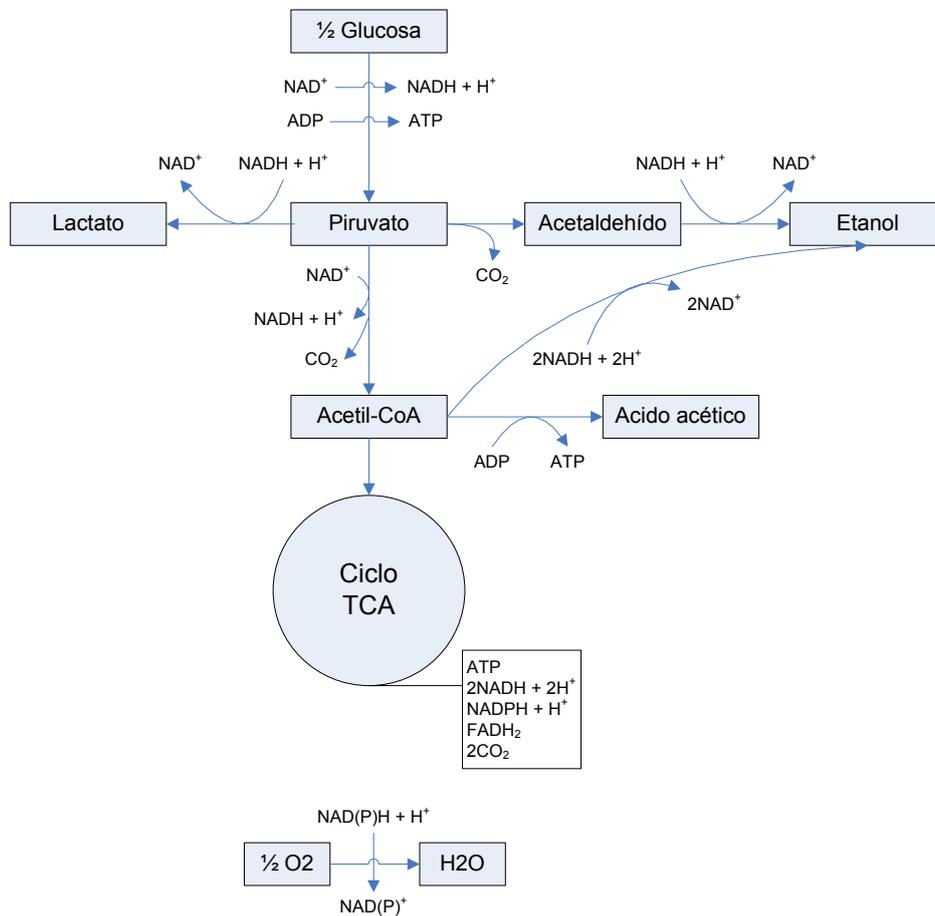


Figura 8.1. Esquema del metabolismo oxidativo de glucosa en *E. coli*

Así, una solución para evitar la acumulación de acético en procesos semicontinuos consistiría en trabajar con estrategias de alimentación que permitan controlar la velocidad de crecimiento, intentando mantenerlas constantes a valores bajos ($0.1 - 0.2 \text{ h}^{-1}$). Otros sistemas, más complejos y costosos, se basan en la remoción del ácido acético y otros metabolitos inhibidores del crecimiento celular por ultra y microfiltración, así como por medio de membranas de diálisis. Este proceso permite la remoción de sustancias inhibitorias de peso molecular pequeño, mientras los microorganismos son retenidos (Fuchs et al. 2002).

La glucosa es la fuente de carbono más fácilmente metabolizable por *E. coli* y con la que se obtiene los mejores rendimientos de biomasa (Yee and Blanch 1993a). Pero, al mismo tiempo, es la fuente de carbono en la que más se acentúan los problemas de producción de acético. Por ello, la búsqueda de estrategias que permitan modular la producción de acético a partir de medios definidos con glucosa como fuente de carbono es de gran importancia para conseguir CADC.

8.1.3 Estrategias de alimentación para procesos semicontinuos de cultivos de *E. coli*

Una buena estrategia es aquella en la que es posible alimentar el sustrato limitante a la misma velocidad que el microorganismo la utiliza para mantener su crecimiento, (Neubauer 2001). Así, sería posible evitar la acumulación de sustratos en el medio de cultivo, y además, controlar la velocidad de crecimiento del microorganismo. Si la velocidad de crecimiento se mantiene suficientemente baja, se asegura por un lado, mantener el crecimiento bajo un metabolismo oxidativo aeróbico, y por otro, no superar el valor crítico de velocidad de crecimiento por encima del cual se asocia la producción de acético.

Los métodos de alimentación se pueden clasificar básicamente en dos grandes grupos:

- a. Métodos con control retroalimentado
- b. Métodos sin control retroalimentado

A partir de aquí, se puede establecer el criterio de perfil de alimentación, el cual puede ser:

- a. Constante
- b. Lineal
- c. Exponencial
- d. Optimizado según la evolución real del proceso

8.1.3.1 Métodos sin control retroalimentado

Los métodos sin control retroalimentado se basan en seguir un perfil de adición prefijado con independencia de la evolución real del cultivo, y, en todo caso, en base al ajuste de un modelo matemático predeterminado del crecimiento del microorganismo.

Los más sencillos son los que mantiene un caudal de alimentación constante de forma que la cantidad alimentada será cada vez inferior en relación a la biomasa existente. A pesar de que la alimentación prefijada soporte inicialmente el crecimiento exponencial del cultivo, la velocidad específica de crecimiento disminuirá, primero bruscamente, cuando el alimento pase a ser insuficiente, y luego progresivamente en el tiempo, manteniendo un crecimiento lineal del cultivo. Los modelos matemáticos que explican el crecimiento del cultivo bajo esta estrategia han estado ampliamente estudiados y se encuentran en la bibliografía (Yamanè and Shimizu 1984), pero no se presentan en esta revisión ya que su uso es limitado y actualmente existen mejores métodos.

Dentro de este mismo grupo se encuentran los métodos que permiten prefijar un perfil de alimentación exponencial. El éxito de esta estrategia dependerá de la calidad del ajuste a un modelo matemático suficientemente exacto para simular la evolución real del crecimiento.

E. coli es uno de los microorganismos mejor estudiados a nivel metabólico, y la fiabilidad de los modelos que describen su crecimiento ha quedado probada en función de los resultados publicados trabajando sin control retroalimentado y con perfiles teóricos para el crecimiento exponencial. Esta estrategia ha permitido conseguir concentraciones celulares por encima de $100 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$ (tabla 8.2) sin necesidad de mecanismo de control retroalimentados sofisticados, previniendo la acumulación de niveles tóxicos de acético en el medio de cultivo.

La adición se puede controlar directamente con una función exponencial, o de una forma aún más sencilla, mediante escalones crecientes del caudal adicionado (DeLisa et al. 1999; Wilms et al. 2001; Yee and Blanch 1993b)

8.1.3.2. Métodos con control retroalimentado

Los métodos con control retroalimentado permiten decidir la adición en base al seguimiento, directo o indirecto, de la concentración de sustrato limitante en el medio mediante la medida en línea de algún parámetro del proceso relacionado. Estos métodos requieren sensores *in-situ* y un equipo de control acoplado y programado para decidir la adición en función de la lectura del sensor. Los parámetros típicamente utilizados para el seguimiento indirecto de la concentración del sustrato limitante son: i) concentración de O_2 disuelto, ii) pH, iii) turbidez, iv) velocidad de producción de CO_2 (CER) o de consumo de O_2 (OUR). El control retroalimentado directo puede no ser tan fiable debido a la dificultad en la obtención de medidas suficientemente confiables de la concentración de

sustratos en línea o, simplemente, por la ausencia de sensores para el sustrato que interesa controlar.

La principal ventaja del control retroalimentado es que permite la respuesta del sistema a algunas situaciones inesperadas, fuera del perfil teórico de crecimiento esperado, dando la posibilidad de adaptar la adición a la nueva situación.

El control de alimentación en base al nivel de oxígeno disuelto, denominado DO-stat, se basa en la observación de que la lectura de oxígeno disuelto aumenta bruscamente cuando se agota el nutriente limitante del crecimiento. Esta estrategia ha permitido mantener el crecimiento para la obtención de CADC (Akesson et al. 2001; Mori et al. 1979) pero, debido a que este parámetro de seguimiento no es sensible a los cambios en el coeficiente de consumo relativo de oxígeno (relación entre la velocidad de respiración y la asimilación de glucosa) y que este coeficiente no es constante (Lin et al. 2001), la tendencia habitual es a caer en la sobrealimentación y en la pérdida del control sobre la velocidad de crecimiento. Adicionalmente, los niveles de oxígeno disuelto a menudo se modifican por factores externos físicos o fisiológicos, tales como variaciones en la presión del vaso del fermentador, cambios en la composición del aire de entrada o la adición de agentes antiespumantes. Por este motivo, es más recomendable fijar la alimentación en función de la composición de los gases de salida, calculando los valores de CER o OUR en el tiempo, que no en base a los niveles de oxígeno disuelto. Las células consumen oxígeno y producen CO₂ durante el crecimiento, por lo que los valores de CER y OUR pueden relacionarse de una manera directa y proporcional al consumo de la fuente de carbono utilizada. En base a esta idea se ha obtenido buenos resultados combinando DO-stat y la medida de CER (Mendoza-Vega et al. 1995; Riesenbergl et al. 1991).

Otro método de control retroalimentado indirecto es el seguimiento del pH, denominado pH-stat, el cual se basa en la observación del aumento brusco del pH cuando se agota la fuente de carbono, principalmente por la excreción de iones amonio como resultado de la utilización de aminoácidos como fuente alternativa de carbono (Choi and Lee 1999; Suzuki et al. 1990; Wang et al. 2001).

Ambos métodos, pH-stat y DO-stat, son sencillos y no requieren de instrumentación adicional para el control de la alimentación. Se considera que el control del pH-stat es más adecuado para el control de alimentación en medios con suplementación compleja, mientras que el DO-stat da mejores resultados en medios definidos minerales (Lee 1996). La suplementación con extracto de levadura o peptonas supone una fuente alternativa compleja de carbono que, en el caso del DO-stat, suavizaría el cambio en la medida de

oxígeno disuelto porque el microorganismo puede crecer utilizando otra fuente de carbono diferente a glucosa. En cambio, en el caso del pH-stat, el cambio se hará más rápido y evidente, ya que el metabolismo de estas fuentes complejas tiene como subproducto amonio, el cual modificará el pH (Lee 1996).

Diversos autores han utilizado también la medición en línea de glucosa mediante equipos FIA como método para ejercer un control retroalimentado directo (Horn et al. 1996; Riesenberg et al. 1990). Otros han utilizado la espectroscopia de infrarrojos cercana (NIR) para el análisis de glucosa o glicerol (Macaloney et al. 1996), logrando mantener concentraciones bajas pero no limitantes de la fuente de carbono en el medio. También se ha trabajado en el control en línea de la concentración de acético en el medio de cultivo mediante HPLC (Turner et al. 1994).

Las concentraciones celulares más altas reportadas para el cultivo de *E. coli* recombinante, $190 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$, se han conseguido trabajando en un reactor con diálisis para la eliminación continua del ácido acético y otros productos tóxicos o inhibitorios acumulados en el medio de cultivo (Fuchs et al. 2002). Sin embargo, este método de cultivo se aleja de las configuraciones de reactores de tanque agitado convencionales, y además, implica el malgasto de cantidades considerables de nutrientes.

En los últimos años se ha venido desarrollando nuevos sensores en línea y estrategias de control robustas para conseguir un control estricto de la velocidad de crecimiento en cultivos semicontinuos y permitir su aplicación industrial. Por otra lado, la manipulación genética de *E. coli* ha permitido aislar mutantes con propiedades fisiológicas mejoradas para CADC, bien sea para incrementar el rendimiento biomasa/fuente de carbono, y/o disminuir la excreción de subproductos tóxicos, tal como el ácido acético.

Finalmente, el diseño de una estrategia de fermentación semicontinua vendrá determinado por la disponibilidad de modelos matemáticos que describan de forma fiable la evolución del crecimiento y de las posibilidades de seguimiento de variables directas o indirectas del proceso.

8.2. ELECCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA ESTRATEGIA OPERACIONAL PARA EL CULTIVO DE *E. coli* M15 (pQErham)

Basados en los resultados obtenidos en cultivos semicontinuos de *E. coli* XL1 Blue MRF' (Durany et al. 2005), se decidió utilizar un método sin control retroalimentado basado en un perfil de alimentación exponencial, de forma de mantener una velocidad específica de crecimiento constante y alcanzar CADC de *E. coli* M15 (pQErham).

El primer objetivo planteado era estudiar el crecimiento de la cepa *E. coli* M15 (pQErham) en bioreactor utilizando el medio MD optimizado por O. Durany, y además, siguiendo la técnica de cultivo por lote alimentado (semicontinuo o discontinuo alimentado). A pesar de que se conoce que las cepas de *E. coli* pueden comportarse de manera diferente, se tomó como punto de partida los datos que se habían obtenido para la cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfuc) para la obtención de CADC.

8.2.1. Modificaciones realizadas al medio MD de O. Durany.

El medio MD definido propuesto por O. Durany parte de su utilización en estrategia semicontinua para obtener CADC. Para ello, estimó las cantidades necesarias de cada uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento con el fin de generar una cantidad de biomasa determinada. Este cálculo se realizó a partir de la composición elemental teórico general de bacterias, y en base a los coeficientes individuales de rendimiento en biomasa para diferentes nutrientes esenciales (Yee and Blanch 1993a). Con esta información, se determinó la composición del medio MD en el vaso de fermentación para la etapa de crecimiento en discontinuo, así como la composición del alimento para la etapa de crecimiento semicontinuo, de forma de suministrar las cantidades suficientes de todos los nutrientes para evitar problemas de solubilidad o inhibiciones de crecimiento. Por otro lado, se añadieron ligeras modificaciones al medio descrito:

- a. Adicionalmente a la adición de ampicilina como marcador de selección del plásmido pQErham, se incluyó kanamicina para el manteniendo del plásmido pREP-4.
- b. Se preparó una solución de FeCl₃-Citrato para evitar la formación del precipitado que ocurre entre el hierro y la solución de macroelementos. El citrato forma un complejo con Fe³⁺ en relación 1:1. Las concentraciones molares de ambos en la solución stock con la que se prepara el medio MD es 0.031 mol l⁻¹ (equivalentes a 6.5 y 5 g l⁻¹ respectivamente), y las concentraciones molares finales de Fe³⁺ y citrato en el MD durante la etapa discontinua es de 0.141 mmol l⁻¹ cada una. Sabiendo que las concentraciones molares de otros metales (Zn²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, etc.) se encuentran alrededor de 0.150 mmol l⁻¹, parece poco probable que el citrato sea capaz de

acomplejar el Zn^{2+} , el cual debe estar disponible para la síntesis de la aldolasa en su forma activa.

- c. Se eliminó la sal de amonio $(NH_4)_2SO_4$ del alimento, ya que se consideró que la cantidad de amonio inicial aportada en la composición del medio MD (fuente de nitrógeno) era suficiente para sustentar el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) durante la etapa disocontinua, y por otro lado, durante la etapa semicontinua, su suministro estaría compensado por la adición de base (NH_4OH) .

8.2.2. Estudio y optimización del crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) en estrategias semicontinuas exponenciales sin inducción.

Una primera aproximación para fijar los parámetros en el programa de control de adición del alimento, específicamente del rendimiento aparente biomasa/glucosa ($Y_{x/s}$), se obtuvieron de los experimentos de Durany (Durany et al. 2005). En fermentaciones en semicontinuo de la cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (pTrcfucA) a velocidades de crecimiento fijadas ($\mu_{set} = 0.1 \text{ h}^{-1}$), el valor obtenido fue de $Y_{x/s} = 0.3 \text{ g}_{PS} \text{ g}^{-1}$. Este valor se utilizó en las diferentes simulaciones en operaciones en semicontinuo, según el siguiente modelo de alimentación exponencial:

$$Q = \frac{\mu \cdot V_0 \cdot X_0 \cdot e^{\mu t}}{S_0 \cdot Y_{x/s}}$$

Donde:

- Q = caudal volumétrico de alimentación (l h^{-1})
 μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
 V_0 = Volumen inicial de medio en el fermentador
 X_0 = Concentración de biomasa inicial (g l^{-1})
 t = Tiempo (h)
 S_0 = Concentración inicial de sustrato (g l^{-1})
 $Y_{x/s}$ = Rendimiento aparente biomasa/sustrato

Sin embargo, para CADC, la fracción de glucosa consumida para el mantenimiento celular puede ser relevante. En estos casos, el valor de rendimiento intrínseco ($\gamma_{x/s}$) puede ser mayor que el rendimiento aparente ($Y_{x/s}$), ya que éste último incluye el término de mantenimiento celular. Así, utilizando el valor de rendimiento aparente obtenido a partir de los ensayos de O. Durany, se realizaron cinco cultivos en semicontinuo fijando en el programa de control diferentes velocidades de crecimiento cada vez, variando desde 0.1 hasta 0.3 h^{-1} . Las tres primeras fermentaciones se realizaron a $\mu_{set} = 0.1 \text{ h}^{-1}$, de las cuales solo se presenta aquella donde se obtuvo la mayor concentración de biomasa (figura 8.2; figura 8.3). Las otras dos se realizaron a $\mu_{set} = 0.2 \text{ h}^{-1}$ (figura 8.4; figura 8.5) y $\mu_{set} = 0.3 \text{ h}^{-1}$ (figura 8.6; figura 8.7).

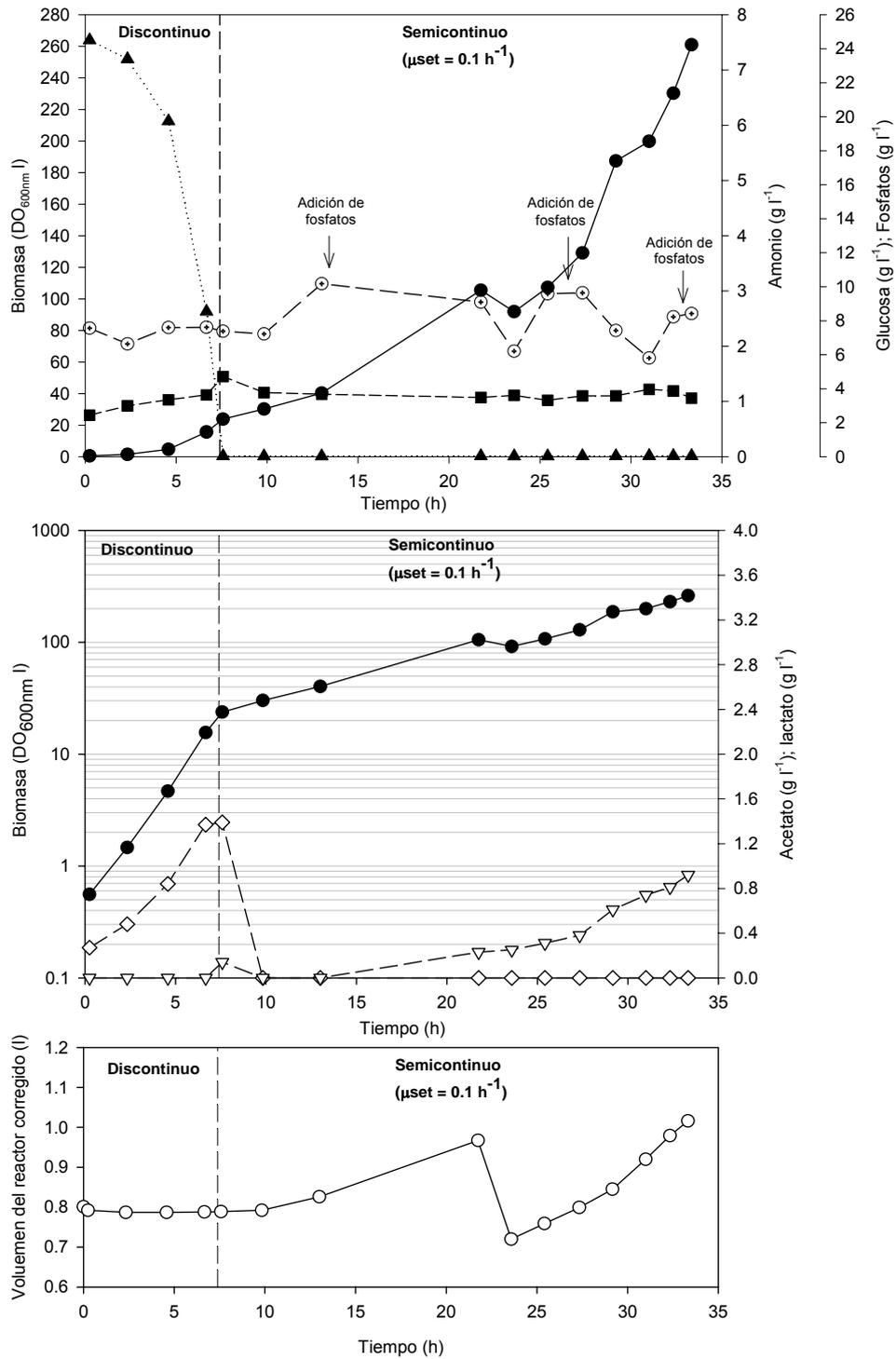


Figura 8.2. Evolución de una fermentación de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD a $\mu_{set} = 0.1 \text{ h}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Lactato (g l^{-1}). Volumen del reactor corregido (○). Al tiempo 22 h se drenaron 247 ml del reactor para hacer análisis de peso seco de la biomasa. El nuevo volumen se incorporó al programa de adición exponencial. Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u.

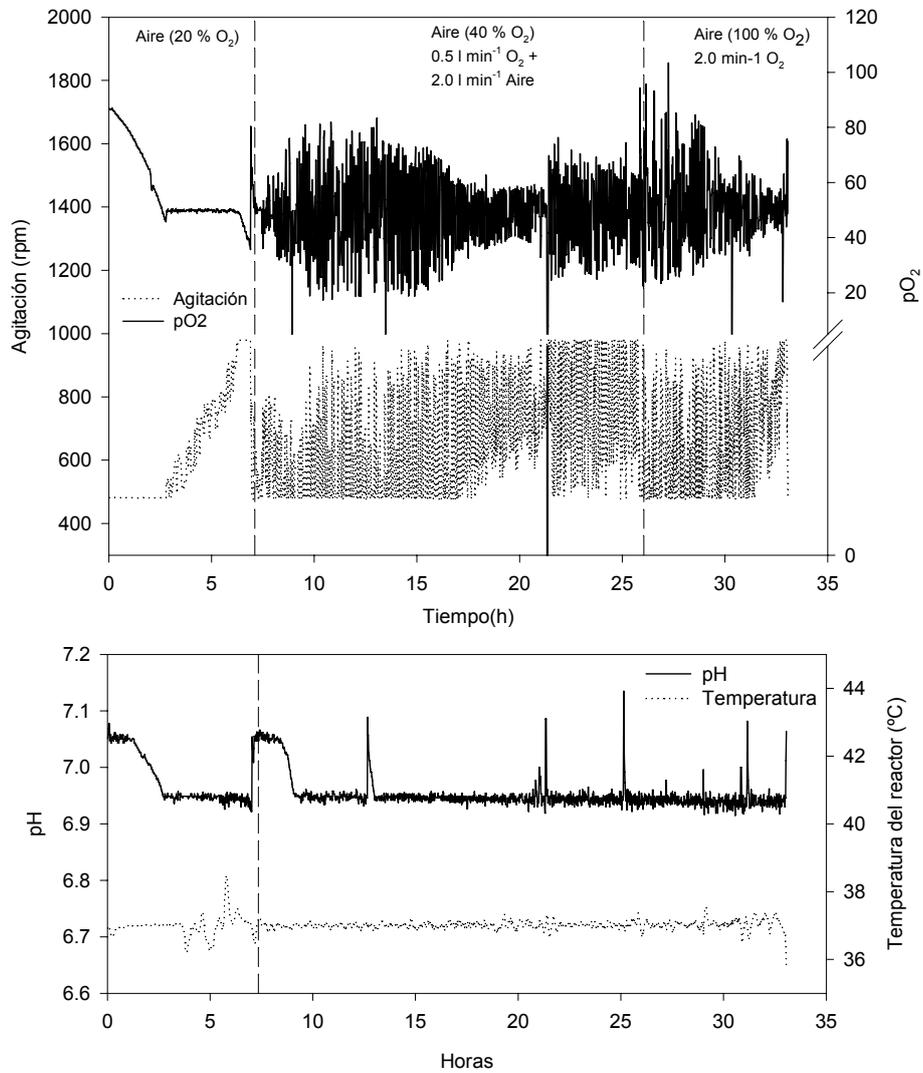


Figura 8.3. Perfil de agitación, concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura del reactor durante la fermentación de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD a $\mu_{\text{set}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$. El caudal de entrada de aire se fijó en 2 l min^{-1}

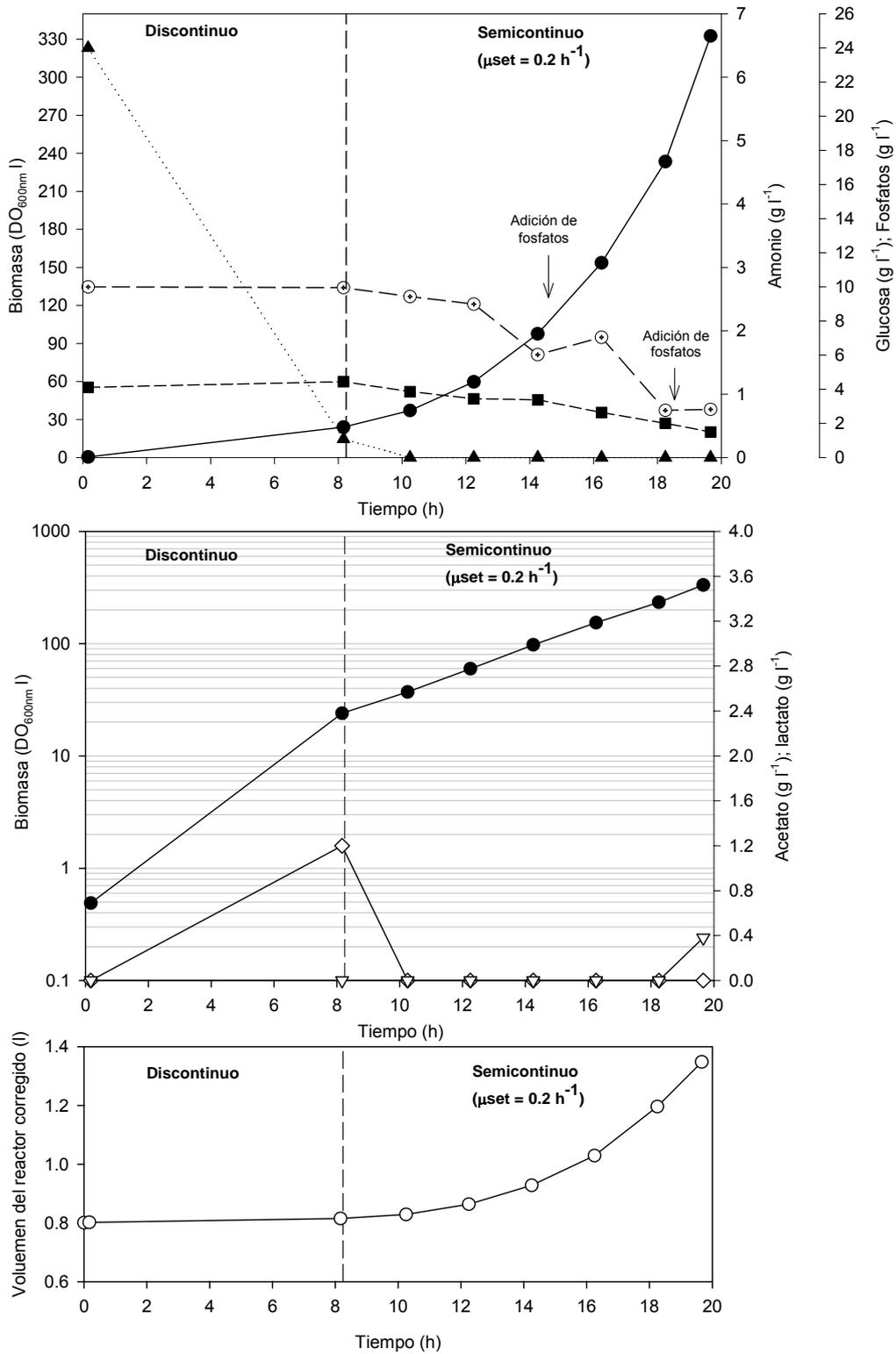


Figura 8.4. Evolución de una fermentación de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD a $\mu_{set} = 0.2 \text{ h}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Lactato (g l^{-1}). Volumen del reactor corregido (○). Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u.

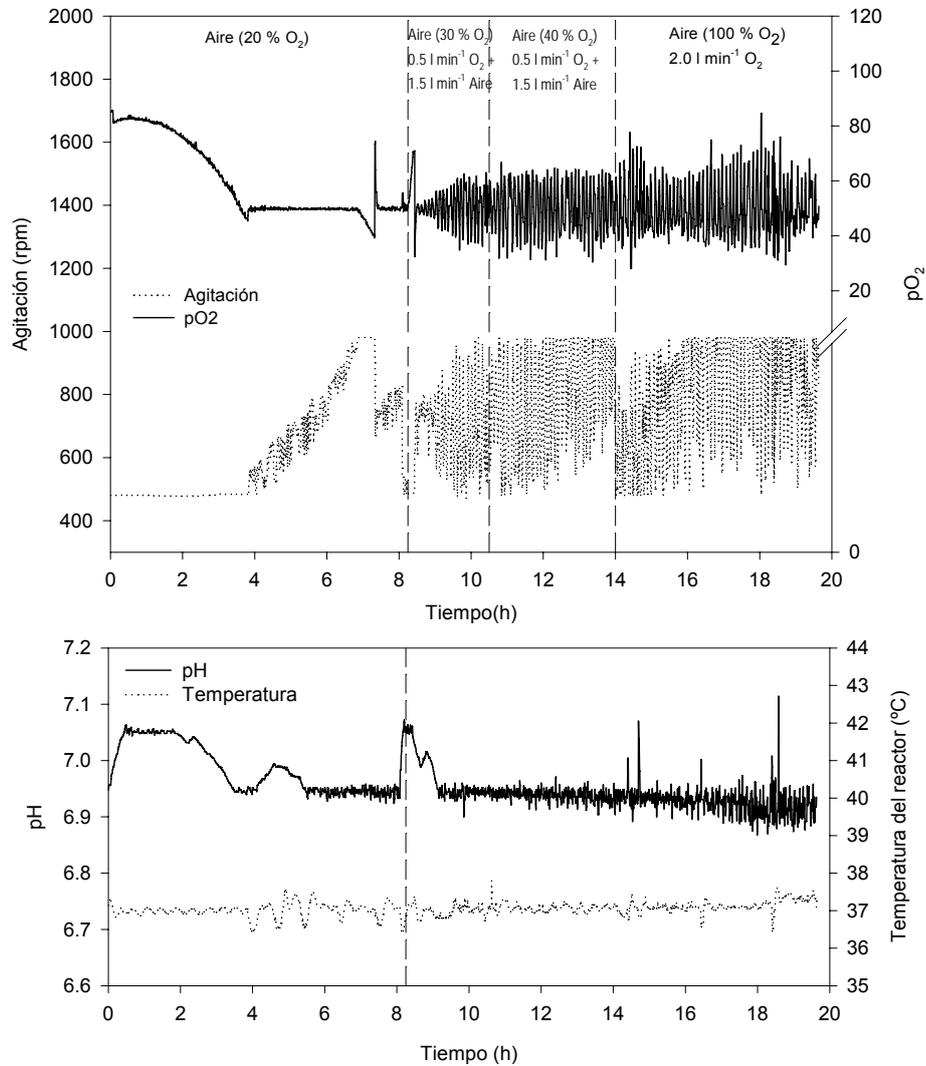


Figura 8.5. Perfil de agitación, concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura del reactor durante la fermentación de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD a $\mu_{set} = 0.2 \text{ h}^{-1}$. El caudal de entrada de aire se fijó en 2 l min^{-1}

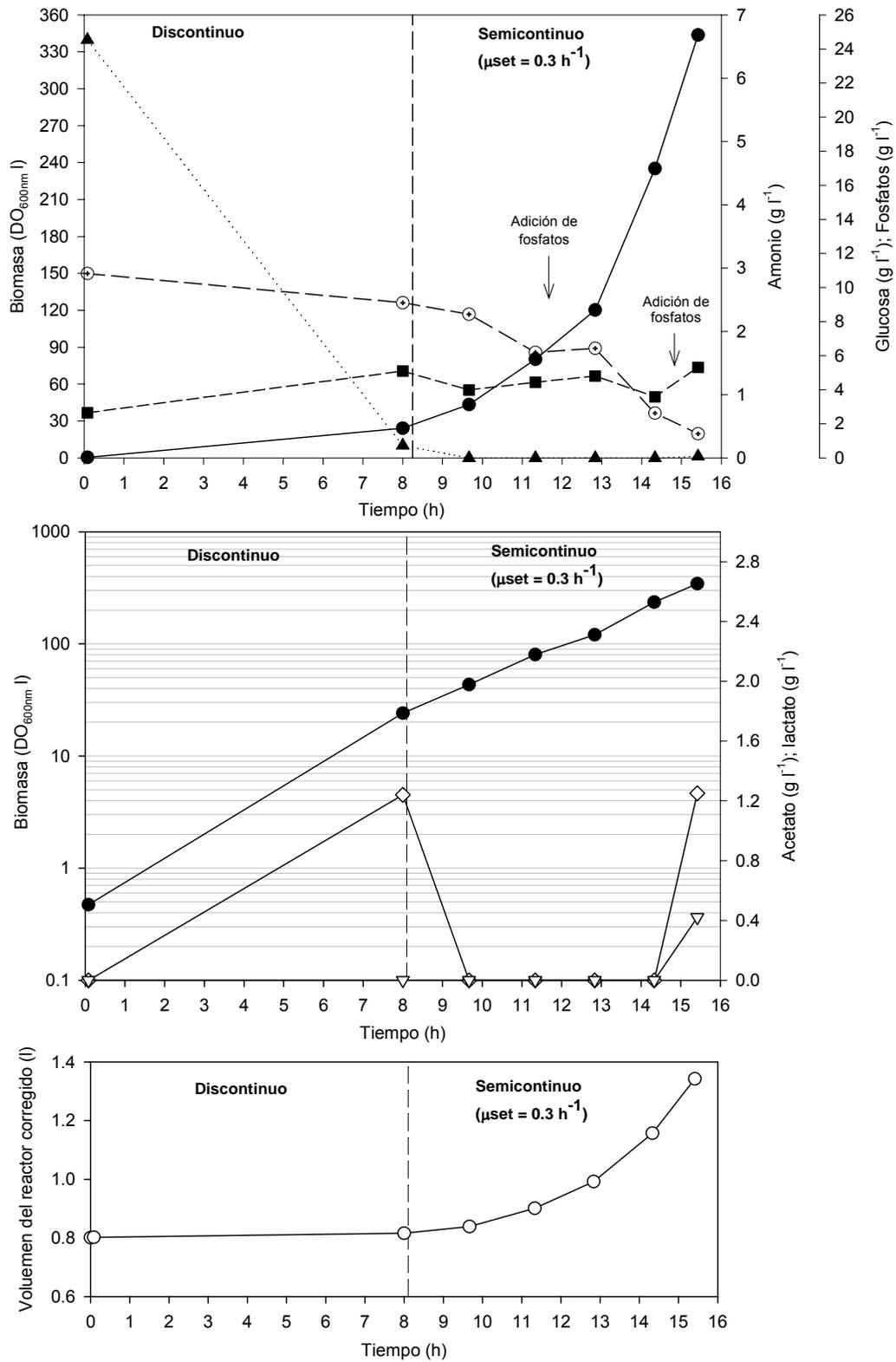


Figura 8.6. Evolución de una fermentación de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD a $\mu_{set} = 0.3 \text{ h}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Lactato (g l^{-1}). Volumen del reactor corregido (○). Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u.

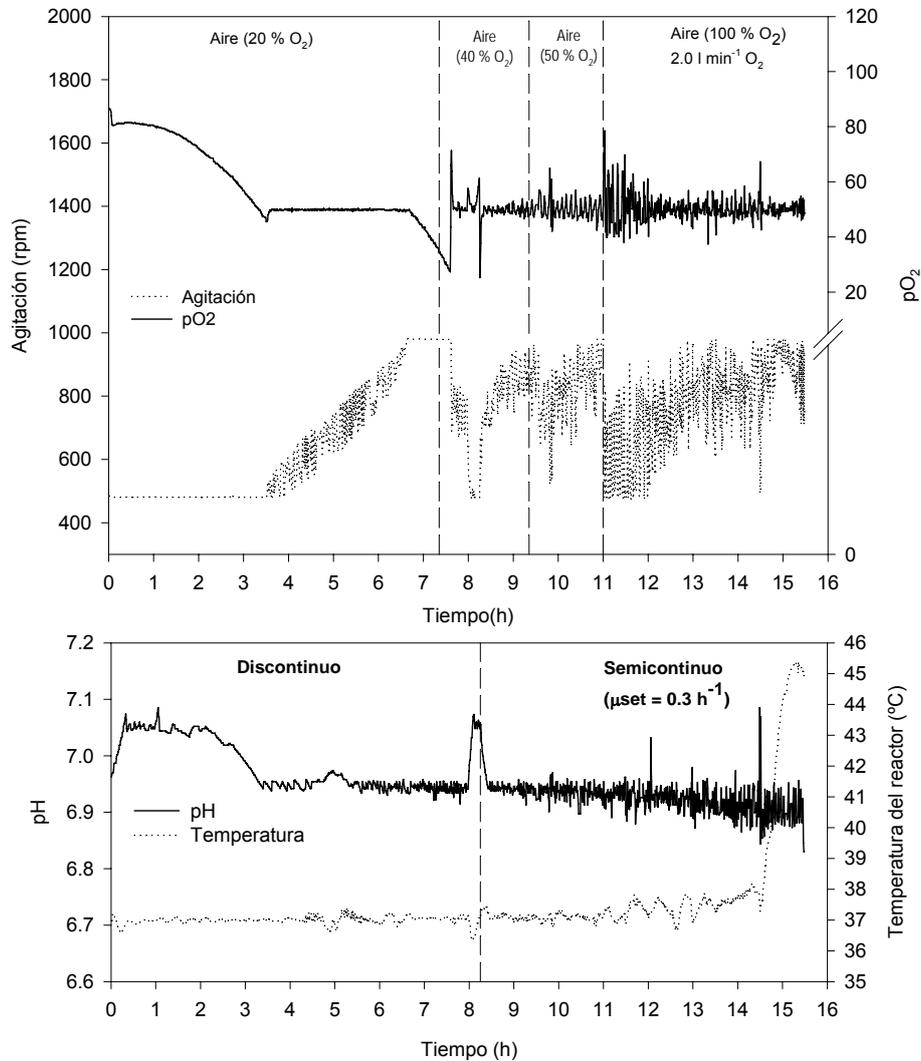


Figura 8.7. Perfil de agitación, concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura del reactor durante la fermentación de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD a $\mu_{set} = 0.3 \text{ h}^{-1}$. El caudal de entrada de aire se fijó en 2 l min^{-1} . Después de 14.5 h de cultivo, el controlador de temperatura del fermentador dejó de funcionar.

El rendimiento de biomasa/fósforo reportado por Yee (Yee and Blanch 1993a) en estudios con quimiostato para *E. coli* es de $Y_{x/s} = 34 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}_{\text{P}}^{-1}$, el cual coincide con la composición elemental teórica promedio de las bacterias (3 %). Basándose en estos datos, con 2.7 g de fósforo (suministrados en la formulación inicial del medio MD de cultivo para la etapa discontinua), soportaríamos un crecimiento aproximado de 90 g de biomasa. Sin embargo, este rendimiento puede variar entre diferentes cepas de *E. coli*. Así, se utilizó inicialmente un rendimiento teórico más bajo de biomasa/fósforo de $Y_{x/s} = 14$ (2.4 veces menor que el calculado por Yee (Yee and Blanch 1993a) o por composición elemental). Este rendimiento teórico se utilizó en el primer ensayo para calcular la necesidad de adicionar fosfatos durante el cultivo, de forma de asegurar que no hubiese limitaciones por este componente. Después del primer ensayo, este rendimiento pudo calcularse a partir de los datos experimentales.

A partir de los resultados de los cultivos no inducidos a diferentes velocidades de crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) usando la estrategia semicontinua (figuras 8.2; 8.3; 8.4; 8.5; 8.6; 8.7), se pueden discutir de manera general algunos aspectos, tales como el perfil de evolución de glucosa, fosfatos, amonio y ácidos orgánicos. A continuación, se enumeran los resultados extraídos de estos cultivos, separando cada una de las etapas:

Etapas discontinuas

- a. Para una concentración de glucosa inicial de 22.5 g l^{-1} , esta etapa tuvo una duración promedio de 8.1 horas, una velocidad de crecimiento promedio de 0.52 h^{-1} , y un rendimiento aparente de biomasa/glucosa de 0.46 (tabla 8.3).

	Tiempo (h)	μ_{max} (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$)
Fermentación 1	8.8	0.52	0.43
Fermentación 2	7.9	0.50	0.45
Fermentación 3	7.6	0.58	0.46
Fermentación 4	8.1	0.49	0.48
Fermentación 5	8.0	0.50	0.46
Promedio (n= 5)	8.1	0.52	0.46
SD	0.4	0.04	0.02

Tabla 8.3. Velocidad de crecimiento y rendimiento aparente de biomasa/glucosa de 5 fermentaciones en semicontinuo

- b. El suministro de aire (aproximadamente 20 % O_2) fue suficiente en la mayoría de los casos para mantener una concentración de oxígeno disuelto del 50 %.

- c. Se observa un incremento brusco en el pH desde 6.95 (límite inferior fijado a través de la unidad de control del fermentador) hasta 7.05 (límite superior) al final de la etapa, el cual coincide con el agotamiento de glucosa en el medio. Se plantea la hipótesis de que el microorganismo utiliza los ácidos orgánicos (principalmente ácido acético) presentes en el medio como fuente de carbono, lo que conlleva a un incremento del pH. Este parámetro fue utilizado como un indicador del final de la etapa semicontinua.
- d. El consumo de amonio (fuente de nitrógeno) es equivalente a la cantidad de amonio suministrada por la base (NH_4OH), por lo que los niveles no se modifican al final de esta etapa y permanecen similares a los iniciales (aproximadamente 1 g l^{-1}).
- e. La concentración final de ácido acético al final de esta etapa (discontinua) no sobrepasó los 1.3 g l^{-1} , valor que se encuentra por debajo de los niveles inhibitorios del crecimiento.

Etapa semicontinua

- a. El incremento del pH, como consecuencia del agotamiento de glucosa durante la etapa discontinua, sirvió como indicador para comenzar la adición del alimento a través de la microbureta controlada por el programa de adición (materiales y métodos, 3.10).
- b. La concentración de glucosa en el medio de cultivo se mantuvo en cero durante la etapa semicontinua, por lo que se cumple la condición de limitación del crecimiento por disponibilidad del sustrato.
- c. La cantidad de NH_4OH añadido al cultivo a través del control de pH es suficiente para, por un lado, controlar el pH dentro del intervalo fijado (7.00 ± 0.05), y por otro, sustentar el crecimiento del microorganismo sin que represente un elemento limitante ni inhibitorio del crecimiento. Los niveles promedio de NH_4^+ se mantuvieron entre 0.7 y 1.5 g l^{-1} .
- d. Se realizaron adiciones puntuales de fosfatos para evitar el agotamiento de fósforo. Los coeficientes de rendimiento promedio para amonio y fosfato calculados a partir de los datos experimentales durante la etapa semicontinua, independientes de la velocidad de crecimiento del microorganismo, son: $Y_{X/\text{NH}_4^+} = 8.1 \pm 1.1 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$ y $Y_{X/\text{PO}_4^{2-}} = 13.3 \pm 3.6 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$
- e. Para mantener una concentración de oxígeno disuelto alrededor del 50 % fue necesario enriquecer el aire de alimentación con oxígeno puro. Inicialmente, este

- enriquecimiento se hacía de forma progresiva. Si embargo, a medida que se operaba a velocidades de crecimiento mayores de $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$, se decidió usar oxígeno puro desde el inicio de la etapa semicontinua ya que el tiempo de operación era muy corto.
- f. La concentración de acético se mantuvo por debajo de niveles inhibitorios. Aún en el ensayo de mayor velocidad de crecimiento experimental ($\mu_{\text{exp}} = 0.36 \text{ h}^{-1}$), los valores de ácido acético y láctico al final de la fermentación no superaron los 1.3 y 0.5 g l^{-1} , respectivamente.
 - g. La máxima biomasa alcanzada fue de 95 $\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$ (equivalente a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 256). Ya que la composición del medio había sido formulada para alcanzar alrededor de 100 $\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$ de biomasa (tabla A4.1 y A4.2; anexo 4), y asumiendo que el diseño del reactor, en términos de transferencia de oxígeno, no permite sobrepasar esta concentración de biomasa, no se consideró reformular el medio de cultivo para intentar sobrepasar este valor. Por otro lado, se consideró que este valor de biomasa era suficiente para la producción de aldolasa recombinante.
 - h. Durante la etapa semicontinua se logró mantener una velocidad de crecimiento relativamente constante. Sin embargo, el valor calculado de μ_{exp} y el rendimiento aparente experimental biomasa/glucosa ($Y_{X/S}$) no coincidían con el valor fijado en el programa de adición exponencial (tabla 8.4). Este punto se discutirá a continuación.

$(Y_{X/S})_{\text{set}}$	$\mu_{\text{set}} (\text{h}^{-1})$	$\mu_{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	$(Y_{X/S})_{\text{exp}}$	Biomasa final ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$)	Tiempo (h)
0.3	0.1	0.086	0.294	30.9	23.5 ^a
0.3	0.1	0.087	0.289	43.4	25.0 ^b
0.3	0.1	0.107	0.329	95.4	33.3
0.3	0.2	0.234	0.376	91.6	19.7
0.3	0.3	0.361	0.385	95.1	15.4

Tabla 8.4. Velocidad teórica (set) y experimental (exp) y rendimiento aparente biomasa/glucosa ($Y_{X/S}$) para diferentes cultivos en reactor operando en semicontinuo. La concentración de biomasa mostrada corresponde al tiempo final del cultivo. La etapa inicial (discontinuo) de los diferentes cultivos tuvo los siguientes resultados promedio: $\mu_{\text{exp}} = 0.5 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0.45 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$ y una duración de 8 h. ^{a,b} La concentración de biomasa obtenida en los dos primeros ensayos a $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$, así como el tiempo total del cultivo son inferiores a lo esperado debido a problemas operacionales durante el transcurso de las fermentaciones.

8.2.3 Cálculo del rendimiento intrínseco y coeficiente de mantenimiento de *E. coli* M15 (pQErham)

A partir de los valores experimentales del rendimiento aparente biomasa/glucosa, $Y_{x/s}$, se observa como éstos se hacen inferiores con respecto al teórico cuando la μ es baja y superiores cuando ésta incrementa (tabla 8.4). La figura 8.8 representa el rendimiento aparente ($Y_{x/s}$) experimental en función de la velocidad de crecimiento experimental (μ_{exp}).

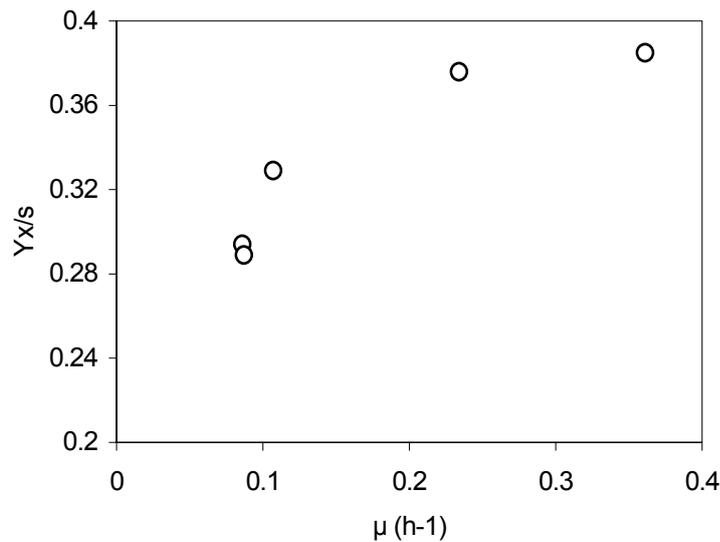


Figura 8.8. Relación entre los rendimientos aparentes biomasa/glucosa ($Y_{x/s}$) experimentales y las velocidades experimentales de crecimiento obtenidas (μ_{exp}) siguiendo al estrategia de alimentación exponencial en operaciones en semicontinuo con medio MD en fermentador.

Herbert (1959) demostró que es necesario considerar el denominado metabolismo endógeno a la hora de calcular o estimar la utilización de sustrato. Así, debe tenerse en cuenta que el sustrato suministrado proporciona, además de la fuente de carbono para la síntesis de biomasa, energía para su mantenimiento, y su consumo puede ser notable según las condiciones de crecimiento. Así, en un crecimiento rápido, por ejemplo, en la fase exponencial de un cultivo en discontinuo, la mayor parte del sustrato consumido se desvía al crecimiento, mientras que en un cultivo en fase estacionaria de crecimiento, el consumo de sustrato se utiliza básicamente para mantenimiento celular.

En el modelo considerado, el proceso global de crecimiento viene dado por la ecuación simple:

$$(2) \quad \gamma_{XS} = \frac{r_X}{r_S}$$

Donde r_X es la velocidad de producción de biomasa, y r_S a la velocidad de consumo de glucosa, y el coeficiente estequiométrico γ_{XS} (gX/gS) coincide con el rendimiento global del crecimiento Y_{XS} . Por otro lado, la velocidad de generación de biomasa (r_X) y la de consumo de sustrato (r_S) pueden escribirse como

$$(3) \quad r_X = \mu \cdot X$$

$$(4) \quad r_S = \frac{\mu \cdot X}{\gamma_{X/S}} + m_S \cdot X$$

Donde $\gamma_{X/S}$ es el coeficiente intrínseco biomasa/glucosa y m_S el coeficiente de mantenimiento, la cual es una constante empírica que engloba el consumo de sustrato destinado a procesos diferentes al crecimiento celular.

Sustituyendo las ecuaciones (3) y (4) dentro de la ecuación (2), tenemos que

$$(5) \quad Y_{X/S} = \frac{\mu \cdot X}{\frac{\mu \cdot X}{\gamma_{X/S}} + m_S \cdot X}$$

Simplificando por $\mu \cdot X$, nos queda la siguiente ecuación

$$(6) \quad Y_{X/S} = \frac{1}{\frac{1}{\gamma_{X/S}} + \frac{m_S}{\mu}}$$

Se observa claramente que el rendimiento global Y_{XS} no es una constante como lo sería v_{XS} , sino que depende de la velocidad específica de crecimiento. La ecuación (6) da una imagen razonable de lo que representa el consumo extra de sustrato para procesos con requerimiento energético y que no dan lugar a una formación neta de biomasa. Dentro de estos procesos los más importantes son:

- Mantenimiento de gradientes y potencial eléctrico a través de la membrana celular
- Ciclos fútiles
- Síntesis y degradación de macromoléculas.

La inversa de la ecuación (6) representa la ecuación de una recta (7) de pendiente m_S y ordenada en el origen de $1/Y_{X/S}$

$$(7) \quad \frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{\gamma_{X/S}} + m_S \cdot \frac{1}{\mu_{\text{exp}}}$$

Los experimentos en semicontinuo con estrategia de velocidad específica de crecimiento constante no permiten calcular con exactitud estos valores, ya que no nos encontramos en una operación de estado estacionario. Sin embargo, el hecho de haber mantenido el valor de μ relativamente constante, permiten hacer una aproximación de los mismos mediante una regresión entre el rendimiento $Y_{X/S}$ aparente calculado experimentalmente y el valor de μ experimental según la ecuación (7). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8.9

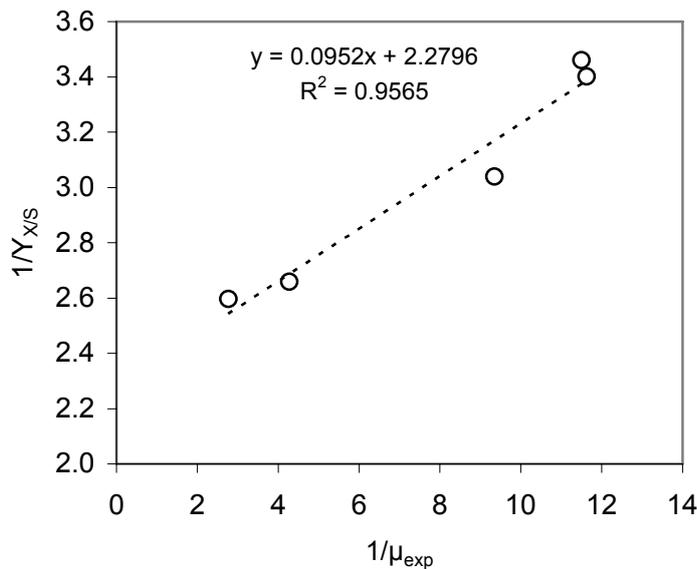


Figura 8.9. Representación de $Y_{X/S}$ experimental en función de la inversa de la velocidad específica de crecimiento (μ_{exp}).

La correlación lineal entre $(Y_{X/S})^{-1}$ y $(\mu_{\text{exp}})^{-1}$ permite calcular los siguientes coeficientes con una correlación de $r^2 = 0.96$

$$\gamma_{X/S} = 0.439 \text{ gX gS}^{-1} \quad m_S = 0.095 \text{ gS (gX}\cdot\text{h)}^{-1}$$

Estos valores introducidos en la ecuación 7 permitieron calcular un valor de rendimiento aparente más exacto para una μ_{set} .

Es importante resaltar que tanto el coeficiente de mantenimiento, como el rendimiento intrínseco, varían entre diferentes cepas de *E. coli*. Por ejemplo, se ha reportado un $m_s = 0.04 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $\gamma_{X/S} = 0.5 \text{ g g}^{-1}$ para una cepa de *E. coli* BL21 recombinante utilizada para la producción de L-carbamilasa (Wilms et al. 2001). Para la cepa de *E. coli* X90, en cultivos en quimiostato limitado en glucosa, $m_s = 0 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $\gamma_{X/S} = 0.42 \text{ g g}^{-1}$ (Yee and Blanch 1993a). Por lo tanto, es importante determinar estos coeficientes a la hora de trabajar con una cepa en particular, sobre todo si se trata de optimizar el crecimiento a través de modelos matemáticos.

8.3. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE RhuA RECOMBINANTE USANDO ESTRATEGIAS SEMICONTINUAS EXPONENCIALES

8.3.1 Criterios para la implementación de un cultivo semicontinuo de *E. coli* M15 (pQErham)

Una vez que determinadas las condiciones de crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) en cultivos en semicontinuo, se decidió realizar experimentos de inducción. Para ello, se plantearon previo a los ensayos las siguientes preguntas:

1. ¿Cual es la velocidad de crecimiento adecuada a fijar en el modelo de alimentación exponencial?

Para seleccionar una velocidad de crecimiento adecuada para la producción de RhuA, se tomó en consideración que, en el intervalo entre 0.1 y 0.36 h^{-1} en cultivos en semicontinuo sin inducción, la concentración de ácido acético no llegaba en ninguno de los casos al 50 % de los niveles inhibitorios (5 g l^{-1}). Con base a esta observación, se decidió trabajar a una μ_{set} de 0.3 h^{-1} para alcanzar rápidamente altos niveles de biomasa y, concomitantemente, incrementar la productividad del proceso ($\text{U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

2. ¿Cuándo se debe inducir el cultivo de *E. coli* M15 (pQErham): en la fase temprana o tardía de la etapa semicontinua?

En cultivos en discontinuo, empleando diferentes medios y condiciones de inducción, la velocidad de crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) disminuía rápidamente cuando se agregaba el inductor químico IPTG. Se conoce que el uso de un promotor fuerte dentro del sistema de expresión, a menudo conduce a una síntesis brusca de proteína recombinante. Esto tiene como resultado la inhibición del crecimiento celular debido a una carga metabólica o *metabolic burden* producto de la síntesis de una gran cantidad de proteína recombinante, en el cual, la reserva energética de la célula se agota, deteniéndose los procesos biosintéticos generales. (Hoffmann et al. 2002).

Luego, si para obtener una alta producción volumétrica de la enzima es fundamental alcanzar el máximo valor de biomasa posible, es lógico que, durante la etapa semicontinua, la inducción se realice cercana al final de la etapa discontinua de crecimiento.

Por otro lado, ya que después de las dos horas de inducción a 37 °C se alcanza el máximo de actividad específica en *E. coli* M15 (pQErham) (capítulo 7), se consideró inducir los cultivos dos horas antes de alcanzar el máximo de biomasa teórico ($95 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$), independientemente de la velocidad de crecimiento fijada.

Utilizando este criterio, se propone inducir los cultivos 2 horas antes de alcanzar el máximo de biomasa posible en las condiciones fijadas ($95 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$; $\text{DO}_{600\text{nm}} = 256$). Teniendo en cuenta la ecuación que describe el aumento de la concentración celular:

$$X_0 = \frac{X}{e^{\mu \cdot \Delta t}}$$

y estableciendo una $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$, podemos calcular la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (proporcional a la biomasa) a la cual se debe inducir. Así, se determinó que se debe inducir alrededor de 140 unidades de $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ ($52 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$) durante el cultivo semicontinuo para disponer de tiempo suficiente para la síntesis de RhuA antes de alcanzar el máximo de biomasa que permiten las condiciones de trabajo y el diseño del equipo utilizado.

3. ¿Cuanto IPTG se debe agregar para inducir los cultivos semicontinuos de *E. coli* M15 (pQErham)?

En los estudios en discontinuo en Erlenmeyer con medio MD, se estableció que la mínima cantidad de IPTG necesaria para lograr una inducción completa era de aproximadamente $20 \mu\text{mol IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$. Utilizando esta cantidad normalizada de IPTG, se lograba una inducción completa del sistema de expresión pQErham. Así, para un volumen de 0.8 l y una biomasa final de $95 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$, se requieren al menos de 1520 μmoles de IPTG para una inducción completa del sistema.

4. ¿Es suficiente la cantidad de zinc aportado por el medio definido y el alimento para la formación de la holoenzima activa?

Como se describe en la tabla A4.2 (anexos), la cantidad de Zinc^{2+} aportada tanto por el medio MD, como por el alimento, fue calculada para soportar una biomasa superior a $100 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$. Sin embargo, este cálculo se realizó a partir de la composición elemental promedio de una bacteria ($0.05 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ g}_{\text{PS}}^{-1}$). Dado que RhuA es una metalo enzima homotetramérica de tipo II, y que contiene por mol de enzima $2 \text{ g Zn}^{2+} \text{ mol}^{-1}$ (Schwartz et

al. 1974), pudiera ocurrir que la cantidad de zinc aportada al vaso del fermentador no se a suficiente, debido a un incremento en los requerimientos de zinc por parte de *E. coli* M15 (pQErham) en condiciones de inducción. En base a la premisa anterior, se decidió estudiar el contenido de zinc en la biomasa de un cultivo inducido con actividad específica alrededor de $1250 \text{ U g}_{\text{PS}}^{-1}$ (apartado 7.5.3) El análisis por absorción atómica de la biomasa lavada y seca mostró que la cantidad de zinc en la biomasa de células inducidas ($0.10 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ g}_{\text{PS}}^{-1}$) era mayor que la teórica ($0.05 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ g}_{\text{PS}}^{-1}$) por lo que se decidió realizar adiciones puntuales de una solución de ZnSO_4 conteniendo 10 mg de zinc en todos los cultivos antes de la inducción enzimática, de forma de tener este elemento traza en exceso.

5. ¿La determinación del coeficiente de mantenimiento y rendimiento intrínseco para *E. coli* M15 (pQErham) permitirán un mejor ajuste del modelo?

La introducción del coeficiente de mantenimiento celular (m_s) para el cálculo del rendimiento aparente biomasa/glucosa ($Y_{x/s}$) para una determinada velocidad de crecimiento (μ_{set}), permitió un mayor ajuste de la velocidad de crecimiento durante la etapa semicontinua previa a la inducción (figura 8.10)

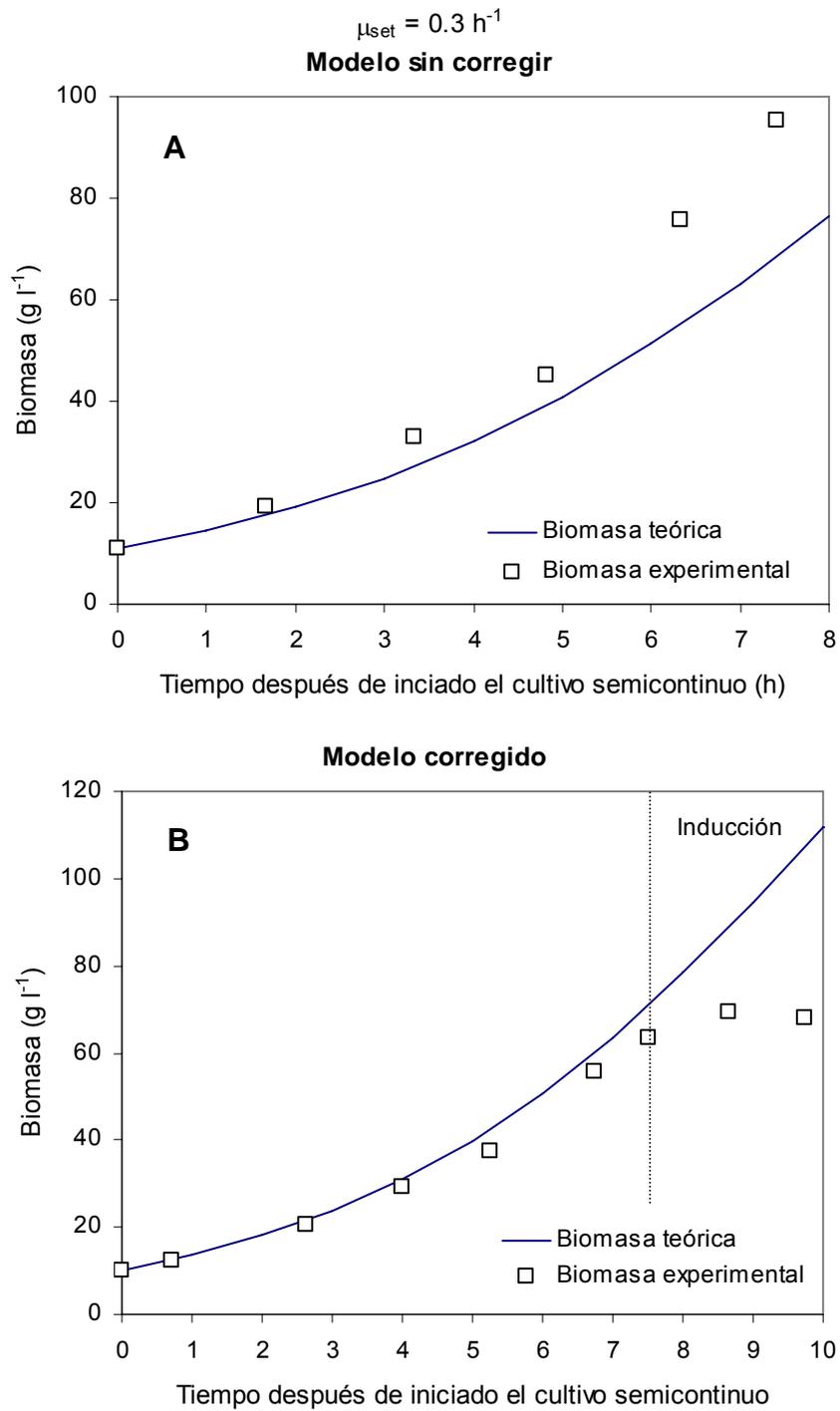


Figura 8.10. Valores de biomasa para una $\mu_{set} = 0.3 \text{ h}^{-1}$ durante la etapa de cultivo semicontinuo con medio MD. (A) Valor de rendimiento aparente introducido en el modelo $Y_{X/S} = 0.3 \text{ g g}^{-1}$; (B) Valor de rendimiento aparente introducido en el modelo $Y_{X/S} = 0.385 \text{ g g}^{-1}$

8.3.2 Diseño de una estrategia de adición de pulsos de antibiótico para incrementar la estabilidad plasmídica en cultivos semicontinuos

Un aspecto a considerar en cultivos en semicontinuo fue la posibilidad de una segregación plasmídica inestable. El sistema de expresión seleccionado para todas las aldolasas pQE incluye como marcador selectivo el gen *bla* (codifica para la enzima β -lactamasa) bajo el control de un promotor constitutivo débil (P3). En cultivos de alta densidad celular, la gran cantidad de β -lactamasa generada por parte de la biomasa podría disminuir la concentración efectiva de la ampicilina como marcador de selección. Jung (Jung et al. 1988) ha reportado que la ampicilina, en concentraciones de 100 mg l^{-1} , puede ser degradada en menos de 30 min. por acción de las β -lactamasas secretadas durante CADC de *E. coli*. Luego, una disminución de la concentración del marcador selectivo del plásmido pQE en el medio de cultivo podría generar una población heterogénea donde una fracción contendría el plásmido y sería capaz de sintetizar la proteína recombinante, y otra fracción, sin plásmido, incapaz de sintetizarla.

En base a esto, se diseñó una estrategia dirigida a tratar de mantener una concentración de ampicilina efectiva en el medio, de forma que la presión selectiva sobre las células permaneciera a lo largo de la etapa semicontinua. Para ello, los antibióticos de selección (ampicilina y kanamicina) se incorporaron en el alimento (materiales y métodos, 3.8.6), y además, se realizaron adiciones puntuales con la solución de ampicilina stock durante los cultivos semicontinuos (100 mg cada adición) antes de la inducción (hasta un máximo de 2 adiciones), con el objetivo de tratar de evitar segregaciones plasmídicas inadecuadas.

En virtud de que la estrategia diseñada puede aumentar el coste del proceso, se planteó buscar un sistema alternativo que prescindiera del uso de antibióticos durante los cultivo y que permitiese asegurar la estabilidad del plásmido. Este punto se discutirá en el capítulo 9.

8.3.3 Resultados del cultivo semicontinuo inducido (F15)

Los resultados del primer cultivo en semicontinuo inducido (F15) a $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$ se muestran en la figura 8.11. El análisis de los datos muestran los siguientes resultados:

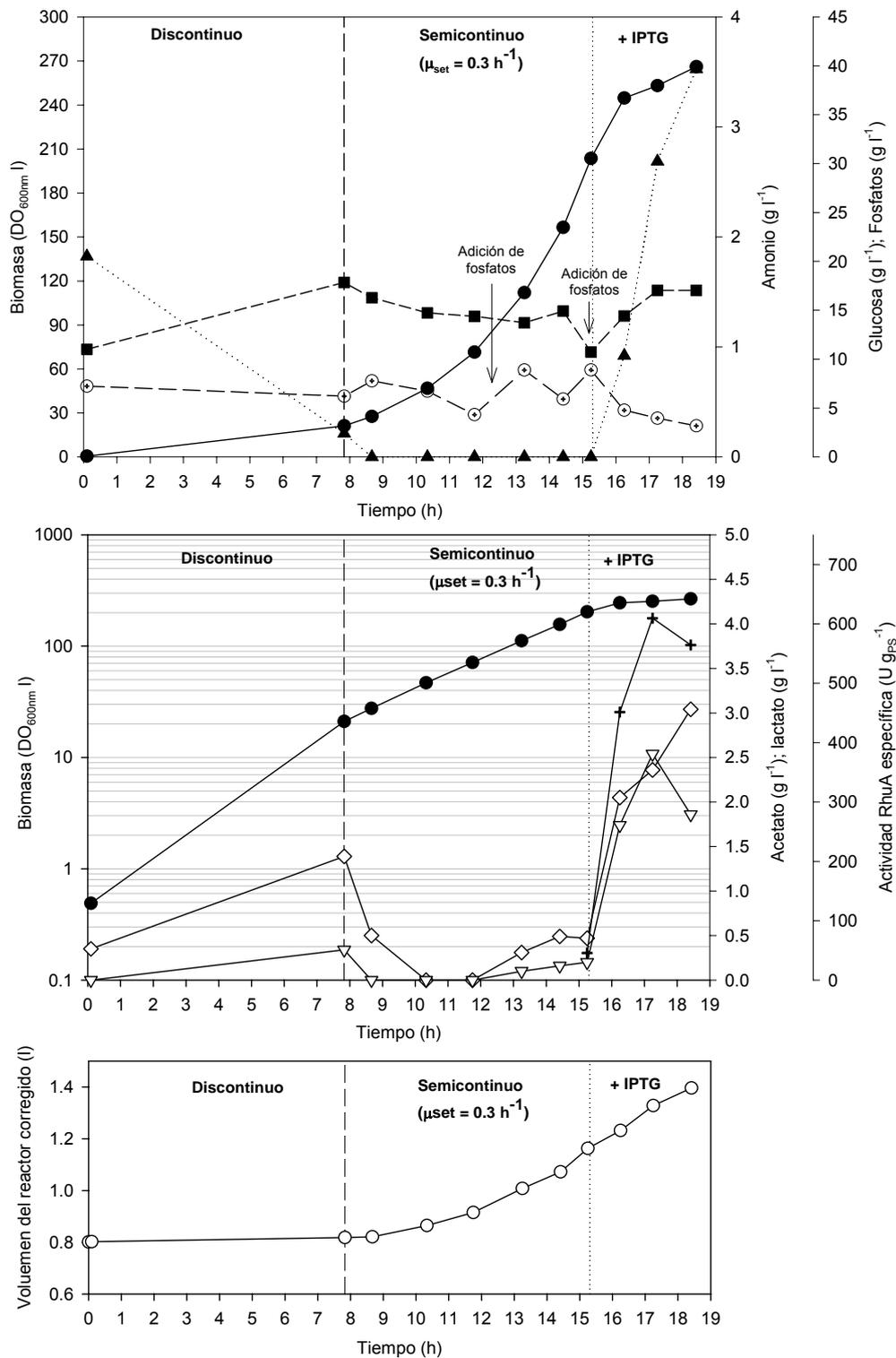


Figura 8.11. Evolución de la fermentación F15 de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD utilizando la estrategia de alimentación exponencial. Etapa semicontinua: $\mu_{\text{exp}} = 0.306 \text{ h}^{-1}$. Cantidad de IPTG añadido: 2000 μmoles ; Concentración final de IPTG: 1433 $\mu\text{mol l}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Lactato (g l^{-1}); (+) Actividad RhuA específica; Volumen del reactor corregido (○). Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u. Antes de inducir, se adicionaron 10 mg de la solución stock de Zn^{2+}

- La concentración de glucosa se mantuvo en cero durante la etapa semicontinua, permitiendo que el crecimiento estuviese limitado por glucosa.
- Utilizando esta estrategia, la velocidad de crecimiento (μ_{exp}) promedio durante la etapa de pre-inducción se mantuvo en 0.306 h^{-1} , con un rendimiento aparente experimental ($Y_{x/s}$) de $0.382 \text{ g}_{PS} \text{ g}^{-1}$.
- Se observa que en ningún momento el cultivo está limitado en fósforo. Ello se logró mediante adiciones puntuales de fosfato: Se adicionaron 12 ml (4.1 g PO_4^{2-}) de la solución stock de fosfatos ($342.6 \text{ g PO}_4 \text{ l}^{-1}$) a las 12.5 h y a las 15 h. El rendimiento de biomasa/fosfato (Y_{x/PO_4}) calculado durante la etapa semicontinua antes de la inducción es de 16.8.

Resultados de la inducción

- a. Cuando el cultivo alcanzó una DO de 175 (15.3 h), se agregó 20 ml de IPTG (2000 μmol) para la inducción de la proteína recombinante, se mantuvo la temperatura del cultivo a 37°C y se mantuvo el cultivo por un intervalo de tiempo de 3.1 h.
- b. Después de la inducción, se observó una disminución gradual de la velocidad de crecimiento, acumulación de glucosa en el reactor (alcanzando un valor final de 39.6 g l^{-1} 3 horas después de la inducción) y una disminución del rendimiento aparente biomasa/glucosa ($Y_{x/s} = 0.164 \text{ g}_{PS} \text{ g}^{-1}$).
- c. Se observa que, después de la inducción, la concentración de ácido acético y láctico aumenta hasta 3 g l^{-1} y 1.9 g l^{-1} respectivamente
- d. Ya que el factor de conversión DO/biomasa varía dependiendo de si las células están inducidas o no, se decidió hacer una determinación experimental del mismo para cada experimento. El factor experimental obtenido (0.31) resultó diferente al factor esperado de 0.26. Con este nuevo factor (0.31), se calculó una biomasa final de $59.1 \text{ g}_{PS} \text{ l}^{-1}$ ($DO_{600nm} = 190.6$).
- e. La actividad RhuA específica máxima obtenida fue de $565 \text{ U g}_{PS}^{-1}$, la cual es considerablemente menor comparado con la obtenida en experimentos en discontinuo ($1250 \text{ U g}_{PS}^{-1}$) con medio MD. La tabla 8.5 muestra los resultados de actividad específica, producción y productividad del ensayo F15.

	IPTG (μmoles)	Tiempo final (h)	Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$) F = 0.31	Volumen final cultivo (l)	Actividad específica ($\text{U} \cdot \text{g} \text{ PSC}^{-1}$)	Producción volumétrica (U l^{-1})	Productividad ($\text{U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Cultivo semicontinuo F15	2000	18.4	59.1	1.396	565	33361	1813

Tabla 8.5. Resumen de los resultados de actividad específica, producción y productividad del ensayo F15.

- f. La relación IPTG/biomasa se encuentra por encima del mínimo calculado ($20 \mu\text{mol g}_{\text{PS}}^{-1}$) para inducir las células eficientemente. La relación $\mu\text{moles IPTG/g}$ biomasa se muestra en la tabla 8.6

	g Biomasa (final)	$\mu\text{moles IPTG}$ añadidos	$\mu\text{moles IPTG/g}$ biomasa
Cultivo semicontinuo F15 (inducido)	82.5	2000	24.2

Tabla 8.6. Relación IPTG/biomasa de ensayo F15

Resumiendo, los aspectos más relevantes observados en el ensayo F15 durante la etapa de inducción son:

- Disminución gradual de la velocidad de crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham)
- Incremento en la producción de ácido acético y láctico
- Acumulación de glucosa en el reactor
- Disminución del rendimiento aparente biomasa/glucosa ($Y_{X/S}$)
- Factor de conversión $\text{DO}_{600\text{nm}}/\text{biomasa}$ experimental de 0.31 (diferente al factor esperado de 0.26)
- Obtención de una actividad específica de RhuA menor que la observada en cultivos en discontinuo.

Una posible explicación para estos fenómenos sería el incremento brusco de la demanda de biomoléculas y energía asociadas a la alta tasa de transcripción y traducción de RhuA. Cabe recordar que el sistema de control del plásmido pQE contiene un promotor muy fuerte (T5) que, en presencia del inductor químico IPTG, genera una carga metabólica importante para la célula (*metabolic burden*).

El incremento en la demanda de energía para procesos no asociados al crecimiento celular (en el caso específico, para la sobreexpresión de la proteína RhuA) puede disminuir el coeficiente de rendimiento biomasa/glucosa (Bhattacharya and Dubey 1995). Por ejemplo, Hoffman (Hoffmann et al. 2002) reportó que durante la formación de la

proteína recombinante hFGF-2 en cultivos de alta densidad de *E. coli*, utilizando un promotor inducible por temperatura y una operación en semicontinuo (*fed-batch*) limitando el crecimiento por adición de glucosa, la carga metabólica y el stress generados por la síntesis de la proteína recombinante está conectada a un incremento en la actividad respiratoria de *E. coli*, y a una disminución en el rendimiento biomasa/glucosa. Por otro lado, la tasa de síntesis de elementos pertenecientes a la maquinaria biosintética de proteínas (Ej: factores de traducción y elongación) decrece en los cultivos donde se lleva a cabo la síntesis de la proteína recombinante. Weber (Weber et al. 2002) demostró que, en este mismo sistema, hay una redirección de los flujos metabólicos hacia las vías catabólicas, tal como la Embden-Meyerhof-Parnas y el ciclo de los ácidos tricarbónicos, así como una disminución de los flujos hacia vías asociadas al crecimiento. Así, sugiere que el incremento del flujo hacia vías catabólicas destinado a la generación de energía reduce la disponibilidad de materiales para procesos biosintéticos, explicando de esta forma las bajas tasas de crecimiento durante la inducción.

En base a esto, es posible que la alta demanda de energía en el momento de la inducción de *E. coli* M15 (pQErham) haga que se incrementen los flujos catabólicos para la regeneración de energía y se reduzca el material disponible para procesos biosintéticos y crecimiento celular. Además, teniendo en cuenta que el proceso de traducción es altamente costoso desde el punto de vista energético, la disponibilidad de energía para los procesos de biosíntesis asociados al crecimiento se vería limitada. Ello explicaría la disminución de la velocidad de crecimiento observada durante la etapa de inducción. Por otro lado, la adaptación metabólica como respuesta al incremento en la demanda energética, podría ser la causa del incremento en la producción de acetato.

Debido a que los valores de μ y $Y_{X/S}$ se modifican en la fase de inducción, y que el programa asume estos parámetros como constantes desde el inicio del proceso semicontinuo, es razonable que no se logre el control del proceso después de la inducción. Así, la cantidad de alimento que se añade al reactor es superior a la que puede utilizar *E. coli* M15 (pQErham), ocasionado la acumulación de glucosa en el reactor

8.3.4 Efecto de adición de casaminoácidos y LB sobre la expresión de RhuA

Inicialmente se consideraron dos factores como responsables del bajo rendimiento de actividad específica de RhuA conseguidos en semicontinuo: i) una disponibilidad limitada de aminoácidos intracelulares para la biosíntesis de la proteína recombinante, en parte debido al alto drenaje de intermediarios metabólicos hacia el metabolismo oxidativo para

producción de energía y la síntesis de RhuA y ii) un efecto negativo directo del acetato sobre la célula y, concomitantemente, sobre la producción de RhuA (Brown et al. 1985). En este sentido, se realizaron dos experimentos de adición de fuentes de aminoácidos:

8.3.4.1. Efecto de la adición de casaminoácidos (F17)

Así, un primer intento para incrementar la productividad específica de RhuA consistió en adicionar casaminoácidos en polvo (1% w/v de concentración final) simultáneamente a la adición de IPTG. En principio, la suplementación directa de una fuente de aminoácidos debería resultar en una reducción de la demanda energética ya que las células no necesitarían sintetizarlos *de novo*, por lo que, posiblemente, la formación de acetato también disminuiría. Los resultados de la fermentación se muestran en la figura 8.12

Resultados de la suplementación con casaminoácidos

El cultivo se indujo a las 15.2 h con 2000 μ moles de IPTG y se mantuvo el cultivo por un intervalo de tiempo de 2 h. Los resultados se muestran en la tabla 8.6:

	Tiempo final (h)	Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{l}^{-1}$) F = 0.36	Volumen final cultivo (l)	Actividad específica (U.g PSC^{-1})	Producción volumétrica (U l^{-1})	Productividad ($\text{U l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Suplementación casaminoácidos	17.2	70.85	1.343	414.9	29396	1709

Tabla 8.6. Resumen de los resultados de actividad específica, producción y productividad del ensayo F17.

Los resultados del cultivo en semicontinuo aplicando esta estrategia mostraron que, aunque se logró una disminución en la concentración de acetato final, (0.5 g l^{-1}), la actividad específica de RhuA disminuyó ($415 \text{ U g}_{\text{PS}}^{-1}$) respecto al experimento F15. Además, la concentración de glucosa final incremento a 34 g l^{-1} y se detectó un incremento en la formación de ácido láctico.

La relación IPTG/biomasa se encuentra por encima del mínimo calculado ($20 \mu\text{mol g}_{\text{PS}}^{-1}$) para inducir las células eficientemente. La relación $\mu\text{moles IPTG/g biomasa}$ se muestra en la tabla 8.7.

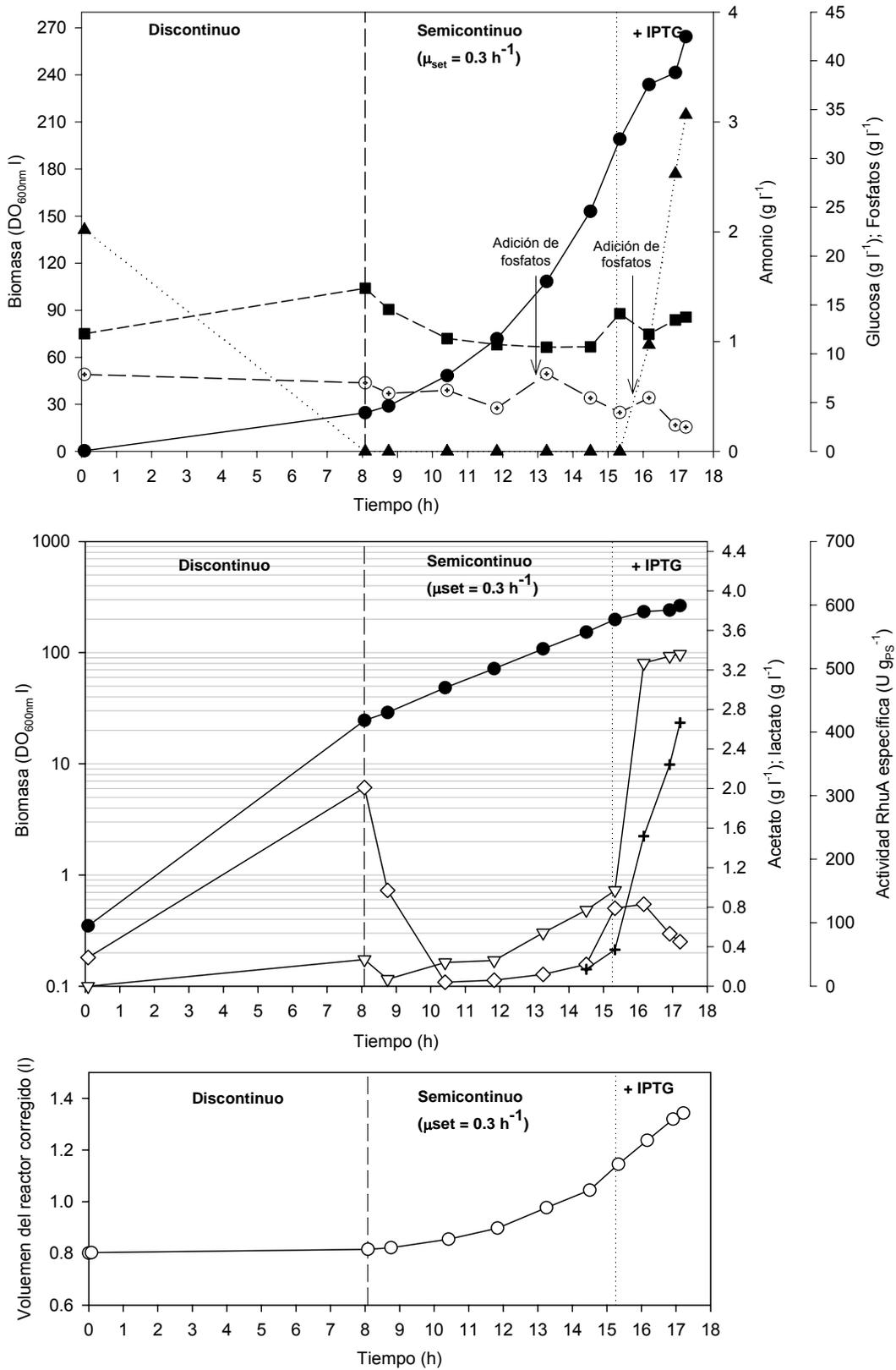


Figura 8.12. Evolución de la fermentación F17 de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD utilizando la estrategia de adición exponencial y con adición de casaminoácidos ($t = 15.3 \text{ h}$). Velocidad específica de crecimiento: $\mu_{exp} = 0.29 \text{ h}^{-1}$. Cantidad de IPTG añadido: 2000 μmoles ; Concentración final de IPTG: 1489 $\mu\text{mol l}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Lactato (g l^{-1}); (+) Actividad RhuA específica; Volumen del reactor corregido (○). Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u. Antes de inducir, se adicionaron 10 mg de la solución stock de Zn^{2+}

	g Biomasa (final)	µmoles IPTG añadidos	µmoles IPTG/g biomasa
Suplementación casaminoácidos	95.1	2000	21

Tabla 8.7. Relación IPTG/biomasa de ensayo F17

Se observa que la relación IPTG/biomasa se encuentra cercana al mínimo calculado (20 µmoles/g) para inducir las células eficientemente. Sin embargo, se consideró que este valor era capaz de inducir completamente las células de *E. coli* M15 (pQErham).

8.3.4.2. Efecto de la adición de LB (F18)

En vista de que la estrategia utilizada no permitió incrementar la actividad específica de RhuA, se diseñó otro experimento en el cual, se definió como objetivo minimizar la acumulación de glucosa en el medio después de la inducción, introduciendo en el programa de control un valor de μ_{set} menor. Según la ecuación:

$$V_A(t_i) = \frac{1}{S_0 \cdot Y_{XS}} \cdot X_i \cdot V_i \cdot [\exp(\mu \cdot \Delta t) - 1]$$

el volumen de alimento a adicionar es proporcional a la μ_{set} y, si introducimos un valor menor, podríamos evitar la acumulación de glucosa y sus posibles efectos sobre el crecimiento y producción específica de RhuA. Adicionalmente, se cambió la suplementación de casaminoácidos por medio complejo LB en polvo sin NaCl (1% triptona; 0.5 % extracto de levadura; p/v). Se ha reportado que la adición de extracto de levadura es más efectiva que otras fuentes de aminoácidos y suplementos proteicos complejos (por ejemplo, casaminoácidos) para incrementar la expresión de proteínas en *E. coli* recombinantes (Donovan et al. 1996).

Los resultados de este experimento mostraron que, disminuyendo la μ_{set} a 0.1h^{-1} y adicionando LB en polvo en el momento de la inducción, se controló la acumulación de glucosa, así como disminuyó la concentración final de acético y láctico (0.65 g l^{-1} y 1.0 g l^{-1} respectivamente). Sin embargo, la actividad específica de RhuA no incrementó ($230\text{ U g}_{\text{PS}}^{-1}$) (figura 8.13-A, B, C).

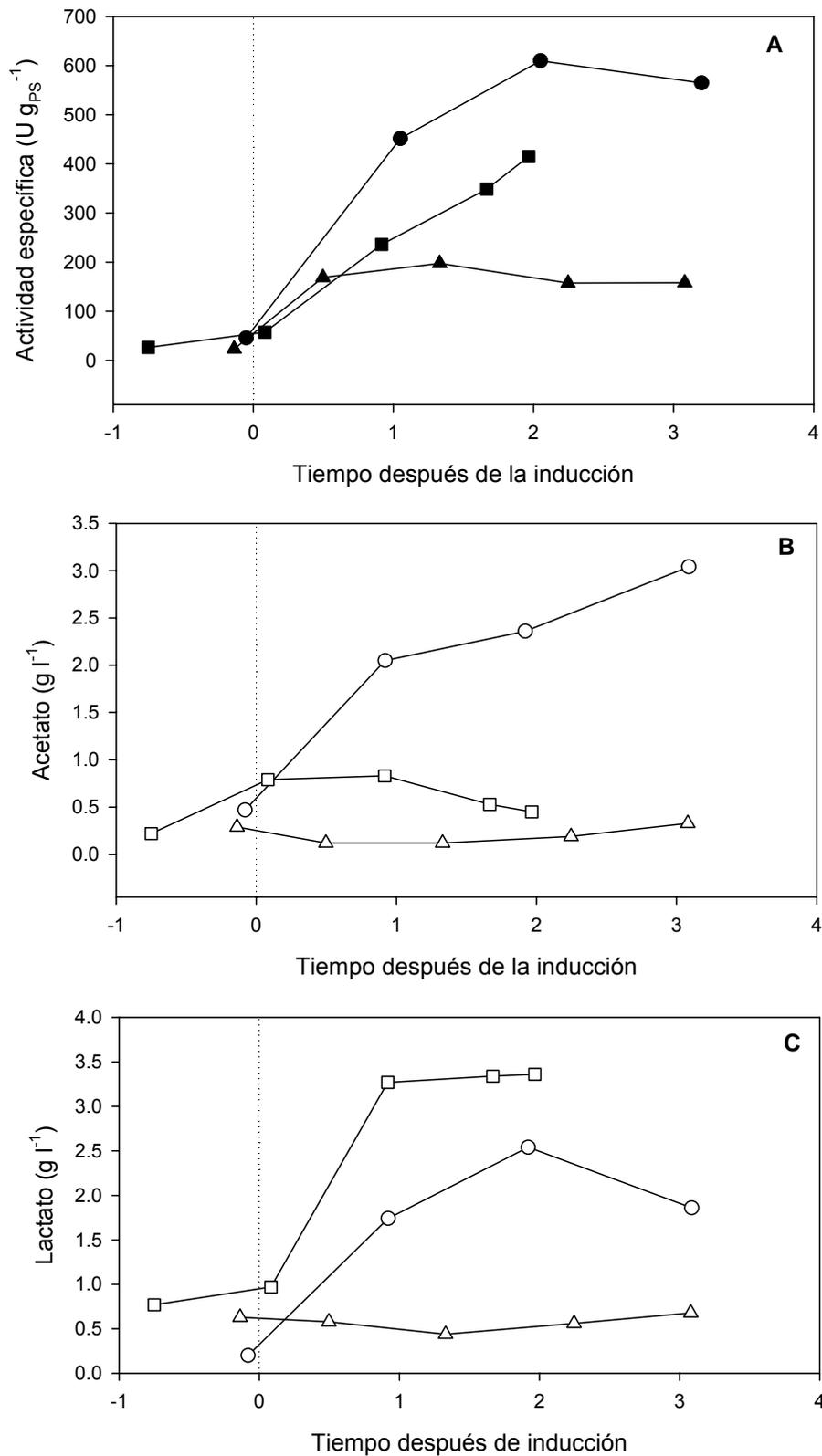


Figura 8.13. Influencia de una fuente de aminoácidos durante la inducción en cultivos semicontinuos con medio MD. (●-○) Sin adición de casaminoácidos; (■-□) con adición de casaminoácidos; (▲-△) con adición de polvo LB y reajuste de $\mu_{\text{set}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$ durante la inducción. (A) Efecto sobre la actividad específica de RhuA; (B) producción de acetato; (C) producción de lactato.

8.3.5. Efecto de la concentración de IPTG sobre la actividad específica final de RhuA

Los resultados poco alentadores obtenidos en relación con la estrategia de adición de fuentes de aminoácidos en los cultivos semicontinuos obligaron a la búsqueda de nuevas estrategias para tratar de incrementar la actividad específica de RhuA.

En el punto 8.3.3 se planteó que el incremento brusco de la demanda de energía asociadas a la alta tasa de transcripción y traducción de la proteína recombinante (producto del uso de un promotor muy fuerte (T5)) genera un stress metabólico sobre la célula, produciendo una serie de efectos en el momento de la inducción que alteran el funcionamiento normal de la célula. En este sentido, y partiendo de la base que el sistema pQE funciona como un sistema *ON-OFF*, se decidió estudiar el efecto que tenía sobre la actividad específica final la utilización de bajas concentraciones del inductor.

8.3.5.1 Experimento F13: inducción con 1110 μ moles IPTG

En un primer ensayo, se disminuyó la concentración de IPTG normalizada por la cantidad de biomasa de $20 \mu\text{mol g}_{\text{PS}}^{-1}$ a un valor cercano a la mitad. La figura 8.14 muestra los resultados obtenidos fijando una velocidad de crecimiento de 0.3 h^{-1} y siguiendo las mismas pautas de trabajo que se establecieron para la fermentación F15.

Resultados de la inducción

El cultivo se indujo a las 15.9 h con 1110 μ moles de IPTG y se mantuvo el cultivo por un intervalo de tiempo de 2.1 h. Los resultados se muestran en la tabla 8.7:

	IPTG (μ moles)	Tiempo final (h)	Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$) F = 0.34	Volumen final cultivo (l)	Actividad específica (U.g PSC^{-1})	Producción volumétrica (U l^{-1})	Productividad ($\text{U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Cultivo semicontinuo F13	1110	18.0	68.2	1.409	654.8	44657	2480

Tabla 8.7. Resumen de los resultados de actividad específica, producción y productividad del ensayo F13.

Los resultados del cultivo en semicontinuo disminuyendo la cantidad de IPTG mostraron que la actividad específica de RhuA aumentó un 16 % respecto al experimento F15, donde se utilizó una cantidad mayor de IPTG para la inducción (2000 μ moles)

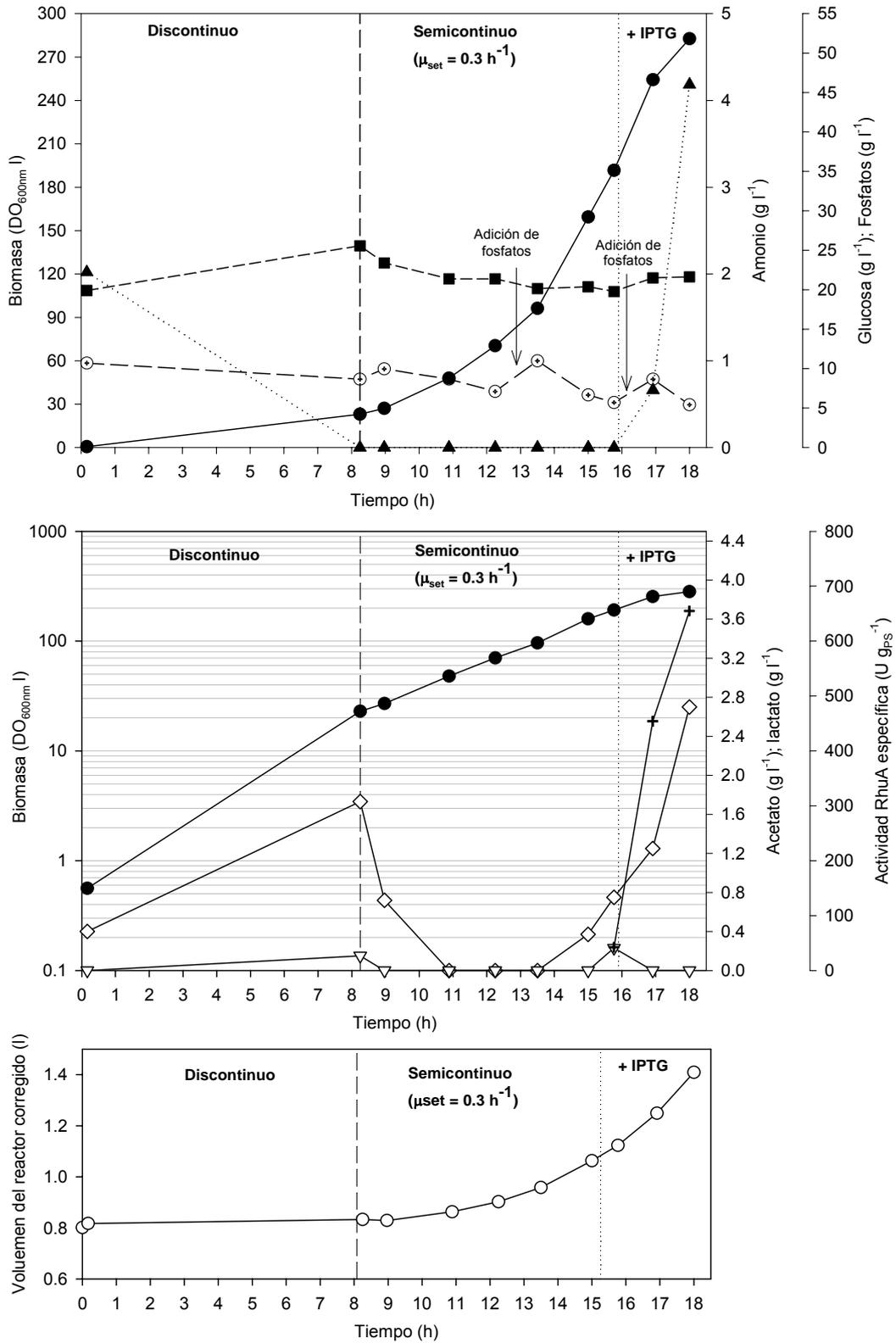


Figura 8.14. Evolución de la fermentación F13 de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD utilizando la estrategia de adición exponencial. Cantidad de IPTG añadido: 1110 μmol ; Velocidad específica de crecimiento: $\mu_{exp} = 0.29 \text{ h}^{-1}$; Concentración final de IPTG: 791 $\mu\text{mol l}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{PS} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Lactato (g l^{-1}); (+) Actividad RhuA específica; Volumen del reactor corregido (○). Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u. Antes de inducir, se adicionaron 10 mg de la solución stock de Zn^{2+} ($t = 14.7 \text{ h}$)

La relación IPTG/biomasa se encuentra por debajo del mínimo calculado inicialmente ($20 \mu\text{mol g}_{\text{PS}}^{-1}$) para inducir las células eficientemente. La relación $\mu\text{moles IPTG/g biomasa}$ se muestra en la tabla 8.8:

	g Biomasa (final)	$\mu\text{moles IPTG}$ añadidos	$\mu\text{moles IPTG/g biomasa}$
Cultivo semicontinuo F13	96.1	1110	11.6

Tabla 8.8. Relación IPTG/biomasa de ensayo F13

A partir de estos resultados, se diseñó otro experimento en el cual, la concentración de IPTG fuese 5 veces menor que F13, de forma de verificar el efecto que tenía sobre la actividad específica el empleo de bajas concentraciones de IPTG

8.3.5.2. Experimento F20: inducción con 200 $\mu\text{moles IPTG}$

En este experimento, se disminuyó la concentración de IPTG normalizada 1 orden de magnitud en relación con el criterio inicial de inducción de IPTG ($20 \mu\text{mol IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$) fijando una velocidad de crecimiento de 0.3 h^{-1} y siguiendo las mismas pautas de trabajo que se establecieron para la fermentación F15. Los resultados se muestran en la figura 8.15.

Resultados de la inducción

El cultivo se indujo a las 15.6 h con 200 μmoles de IPTG y se mantuvo el cultivo por un intervalo de tiempo de 2.4 h. Los resultados se muestran en la tabla 8.9.

	IPTG (μmoles)	Tiempo final (h)	Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$) F = 0.34	Volumen final cultivo (l)	Actividad específica (U.g PSC^{-1})	Producción volumétrica (U l^{-1})	Productividad ($\text{U l}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Cultivo semicontinuo F20	200	18.0	63.3	1.354	820.6	51944	2886

Tabla 8.9. Resumen de los resultados de actividad específica, producción y productividad del ensayo F20.

Los resultados del cultivo en semicontinuo, disminuyendo la cantidad de IPTG en un orden de magnitud respecto al criterio inicial de $20 \mu\text{moles IPTG g}_{\text{PS}}^{-1}$, mostraron que la actividad específica de Rhua aumentó un 45 % respecto al experimento F15, donde se utilizó una cantidad mayor de IPTG para la inducción (2000 μmoles).

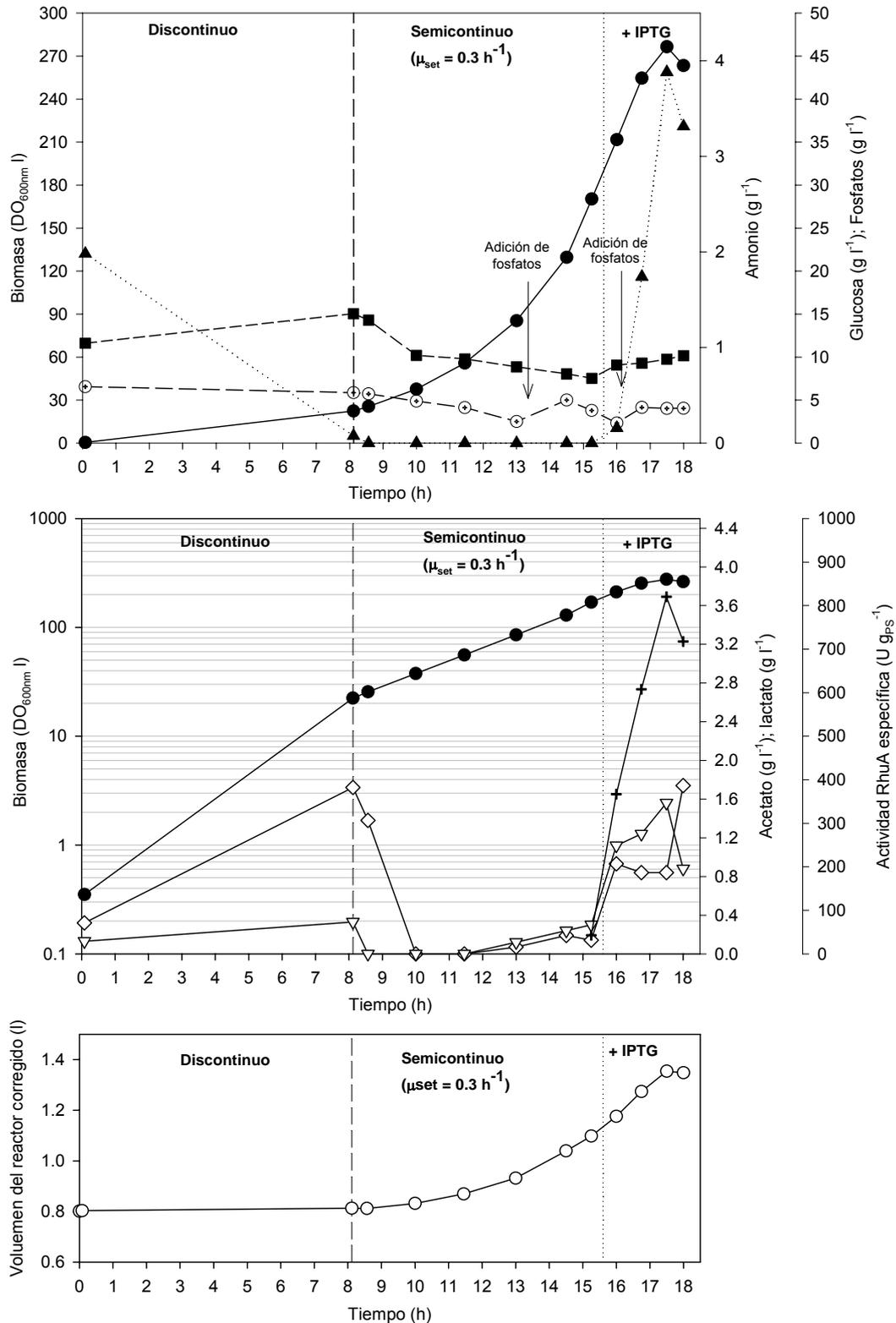


Figura 8.15. Evolución de la fermentación F20 de *E. coli* M15 (pQErham) en medio MD utilizando la estrategia de adición exponencial. Cantidad de IPTG añadido: 200 μmol . Velocidad específica de crecimiento: $\mu_{exp} = 0.29 \text{ h}^{-1}$. Concentración final de IPTG: 147.7 $\mu\text{mol l}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Lactato (g l^{-1}); (+) Actividad RhuA específica; Volumen del reactor corregido (○). Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u. Antes de inducir, se adicionaron 10 mg de la solución stock de Zn^{2+} ($t = 14.7 \text{ h}$)

La relación IPTG/biomasa se encuentra por debajo del mínimo calculado inicialmente ($20 \mu\text{mol g}_{\text{PS}}^{-1}$) para inducir las células eficientemente. La relación $\mu\text{moles IPTG/g biomasa}$ se muestra en la tabla 8.10:

	g Biomasa (final)	$\mu\text{moles IPTG}$ añadidos	$\mu\text{moles IPTG/g biomasa}$
Cultivo semicontinuo F12	85.7	200	2.3

Tabla 8.10. Relación IPTG/biomasa de ensayo F13

La tabla 8.11 muestra una comparación de los resultados de los cultivos semicontinuos inducidos a diferentes concentraciones de IPTG a $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$.

	IPTG (μmoles)	$\mu\text{moles IPTG/g biomasa}$	Actividad específica (U.g PSC^{-1})	Producción volumétrica (U l^{-1})	Productividad ($\text{U l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Cultivo semicontinuo F15	2000	21	565	33361	1813
Cultivo semicontinuo F13	1110	11.6	654.8	44657	2480
Cultivo semicontinuo F20	200	2.3	820.6	51944	2886

Tabla 8.11. Comparación de los resultados de actividad específica, producción y productividad de los ensayos F15, F13 y F20.

Se observa que, a medida que disminuye la concentración de IPTG, la actividad específica de RhuA incrementa. Para verificar estos resultados, se graficaron todos los experimentos realizados, tanto en discontinuo como semicontinuo en función de la actividad específica y la concentración de IPTG utilizada para la inducción (figura 8.19)

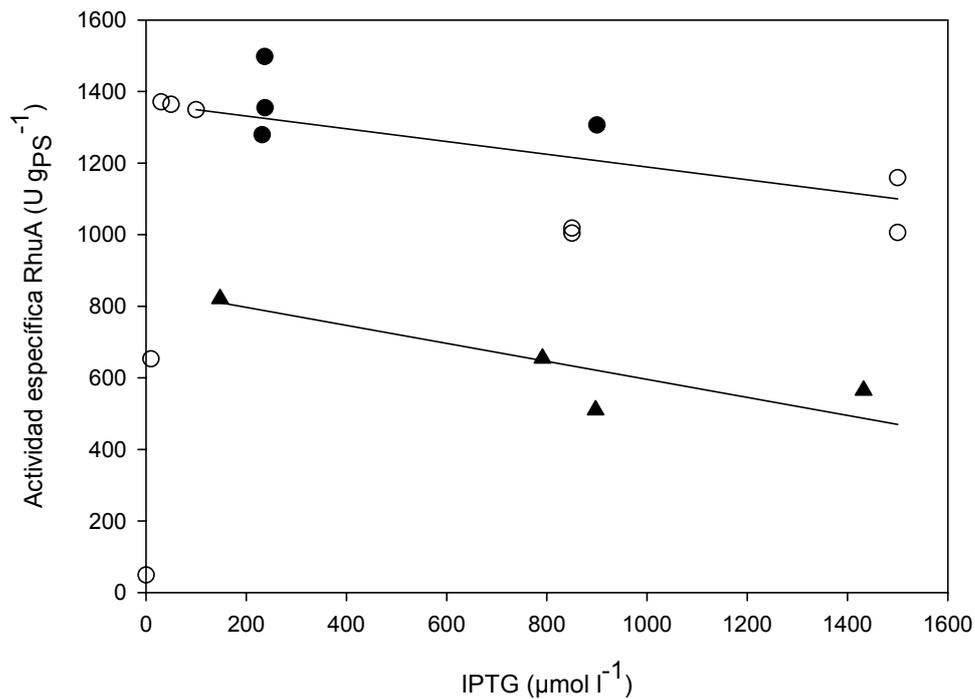


Figura 8.19. Efecto de la concentración de IPTG sobre la actividad específica de RhuA. Los puntos experimentales corresponden a todos los ensayos en discontinuo en Erlenmeyer (\circ) y en bioreactor (\bullet); experimentos en semicontinuo (\blacktriangle). Medio de cultivo utilizado: MD; temperatura de inducción: 37 °C. Las concentraciones de IPTG en cultivos en semicontinuo se calcularon en base al volumen final obtenido en el reactor.

En los experimentos previos en Erlenmeyer con medio MD se encontró que se requerían al menos 20 $\mu\text{mol IPTG/g}_{\text{PS}}$ para asegurar una inducción completa de *E. coli* M15 (pQErham). En los primeros ensayos en cultivos en semicontinuo se utilizó este criterio para calcular la cantidad de IPTG a añadir para inducir la expresión de RhuA. En virtud de la discrepancia entre los niveles de actividad en ambas condiciones de operación (discontinuo y semicontinuo), se planteó que esta relación no se cumplía para cultivos en semicontinuo. Analizando los diferentes experimentos de expresión de RhuA se observaron dos fenómenos importantes:

- 1) Existe una correlación inversa entre la concentración de IPTG en el medio utilizada para la inducción y la actividad específica de RhuA obtenida (figura 8.19), siendo este efecto independiente del modo de cultivo (Erlenmeyer, discontinuo en bioreactor o semicontinuo en bioreactor). Paradójicamente, la actividad específica de RhuA incrementa cuando se disminuye la concentración de IPTG utilizada para la inducción dentro del intervalo de concentración estudiado.

Para tratar de explicar este fenómeno se analizaron dos parámetros a partir de los experimentos en semicontinuo: la velocidad específica de crecimiento y la velocidad de producción de enzima (q_p) (figura 8.20)

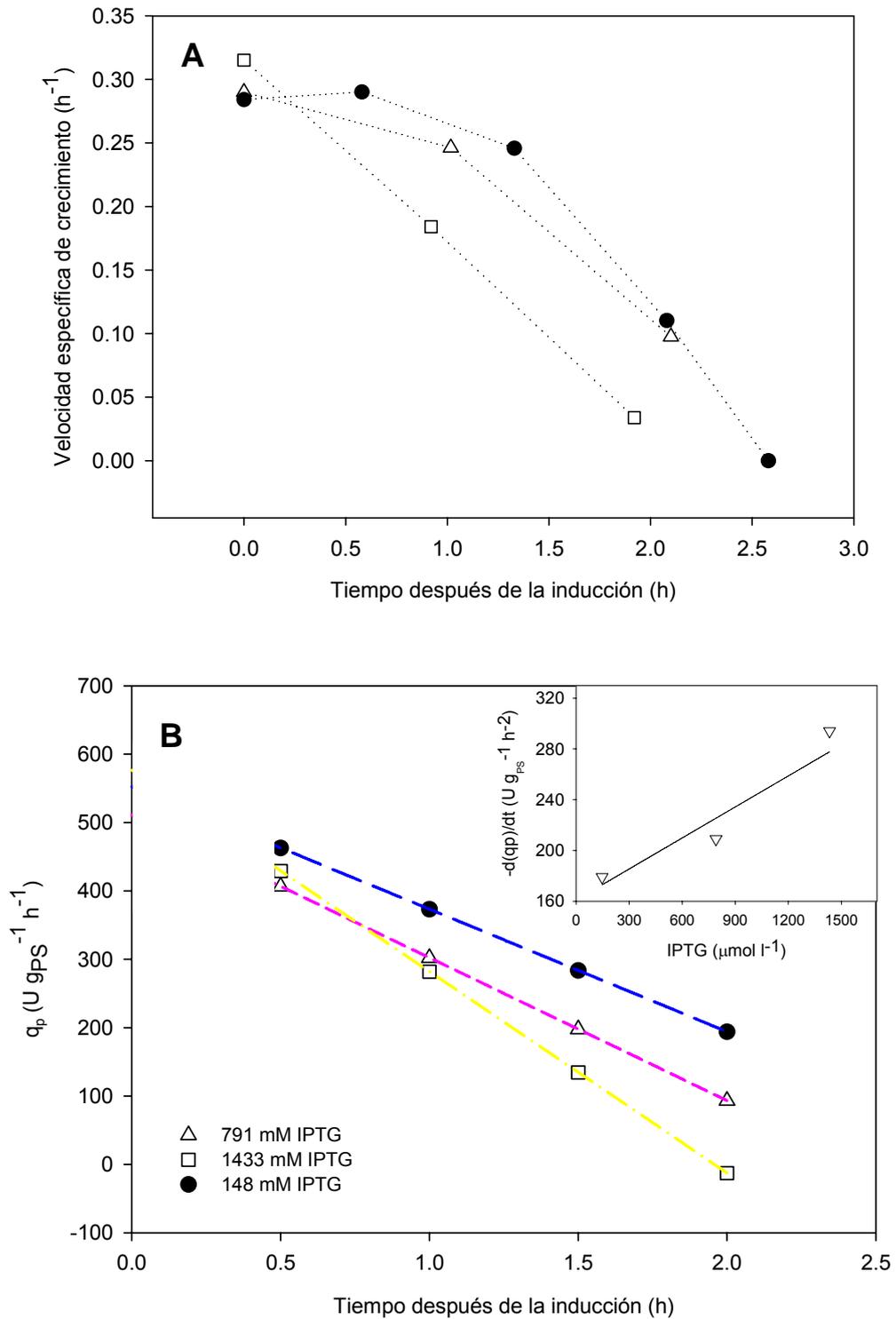


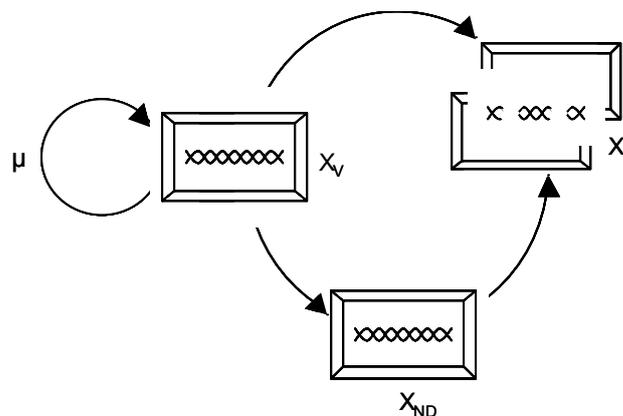
Figure 8.20. Evolución de: (A) velocidad específica de crecimiento (μ) y (B) tasa de producción de enzima (q_p) de para diferentes concentraciones de IPTG (●:148; △:791; □:1433 $\mu\text{mol l}^{-1}$). Las concentraciones de IPTG calcularon en base al volumen final obtenido en el reactor.

En la figura 8.20-A se observa que la velocidad específica de crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) disminuye después de la adición de IPTG, y que la disminución es más drástica a altas concentraciones de IPTG. Por otro lado, la velocidad de producción de RhuA (q_p) disminuye después de la inducción (figura 8.20-B), y la variación de la velocidad ($-d(q_p)/dt$) es mayor a medida que la concentración de IPTG es más elevada.

Estos resultados sugieren que, en el sistema pQE, la intensidad de la inducción es proporcional a la cantidad de IPTG utilizada, y que ésta puede afectar los niveles de síntesis de la proteína recombinante. Así, utilizando menores cantidades de IPTG, seguramente se produce un menor estrés para las células, permitiendo incrementar la cantidad final de la proteína recombinante.

2) Se observa que no es posible obtener los mismos niveles de actividad específica trabajando en semicontinuo o en discontinuo a una misma concentración de IPTG. Entre las diferentes causas que se plantean para explicar la diferencia entre los niveles de actividad en operación en discontinuo y semicontinuo, tenemos:

a) Presencia de células metabólicamente activas pero incapaces de formar colonias. Este fenómeno ha sido descrito en cultivos de alta densidad de *E. coli* (Andersson et al. 1996), en los cuales, la fisiología de las células que crecen en exceso de todos los nutrientes (etapa de discontinuo) difiere de las células que están expuestas a una limitación progresiva de energía (etapa de semicontinuo), observando que estas últimas pueden llegar a no formar colonias en placas de agar nutritivo a pesar de exhibir actividad metabólica. De esta forma, se plantearía un modelo segregado donde existe una población heterogénea con diferentes estados fisiológicos, los cuales podrían esquematizarse de la siguiente manera:



Donde X_v representa la biomasa capaz de dividirse y con actividad metabólica, X_{ND} las células con actividad metabólica pero que han perdido la capacidad de dividirse y finalmente, X_L la biomasa lisada originada a partir de X_v y X_{ND} .

Resumiendo, las fracción de células metabólicamente activas que no pueden dividirse, posiblemente no estarían en capacidad de sintetizar la proteína recombinante RhuA, ya que su síntesis está asociada la capacidad de crecimiento de la bacteria. En consecuencia, después de inducir con IPTG, habría una fracción de células que no sintetizarían la proteína recombinante y, al analizar la actividad específica sobre esta población heterogénea, el resultado sería menor comparado con el de una población homogénea (cultivos en discontinuo).

- b) Síntesis de proteínas de estrés e intensificación de la degradación de proteínas a causa del crecimiento en condiciones de sustrato limitante.
- c) Inestabilidad del RNA_m
- d) Limitaciones en la cinética de transcripción y traducción de RhuA
- e) Inestabilidad y segregación inadecuada del plásmido pQErham. El apartado 9 se centra en el diseño un sistema para asegurar la estabilidad del plásmido (pQErham).
- f) Combinación de varias causas.

8.4 COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE RhuA EN CULTIVOS EN DISCONTINUO Y SEMICONTINUO.

La tabla 8.12 presenta los resultados obtenidos en relación con la productividad de RhuA entre las diferentes estrategias utilizadas utilizando medio MD. Como se puede observar, la producción y productividad de RhuA presentan un incremento significativo en cultivos en semicontinuo comparadas con el cultivo en discontinuo (2166 y 1032 % respectivamente), lo cual indica un evidente mejoramiento del proceso, cumpliendo así uno de los objetivos principales del presente trabajo.

Modo operacional	Actividad específica (U g _{PS} ⁻¹)	Producción (U l ⁻¹)	Productividad (U l ⁻¹ h ⁻¹)
Discontinuo	1250	2292	255
Semicontinuo (F20)	820.6	51944	2886

Tabla 8.12. Comparación entre los dos modos de operación utilizados desde el punto de vista de evaluación de la producción de RhuA.

8.5 VARIACIÓN DE LA RELACIÓN Biomasa/DO_{600nm} EN FUNCIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

En el capítulo 7 se demostró una disminución del factor de conversión ($\text{g}_{\text{PS}} \text{l}^{-1} \text{DO}_{600\text{nm}}^{-1}$) después de la inducción con IPTG de *E. coli* M15 (pQErham). Lee (Lee et al. 1994) observó un fenómeno similar durante la producción de polihidroxitirato (PHB) utilizando *E. coli* XL1 Blue, donde la DO_{600nm} incrementaba continuamente debido a la acumulación intracelular de PHB, aún cuando las células habían detenido su crecimiento.

Debido a que el factor podía modificarse en condiciones de inducción, se determinó para cada experimento el factor final para células inducidas. El análisis de los factores permitió encontrar una correlación entre el factor obtenido experimentalmente y la actividad específica de RhuA obtenida (figura 8.21)

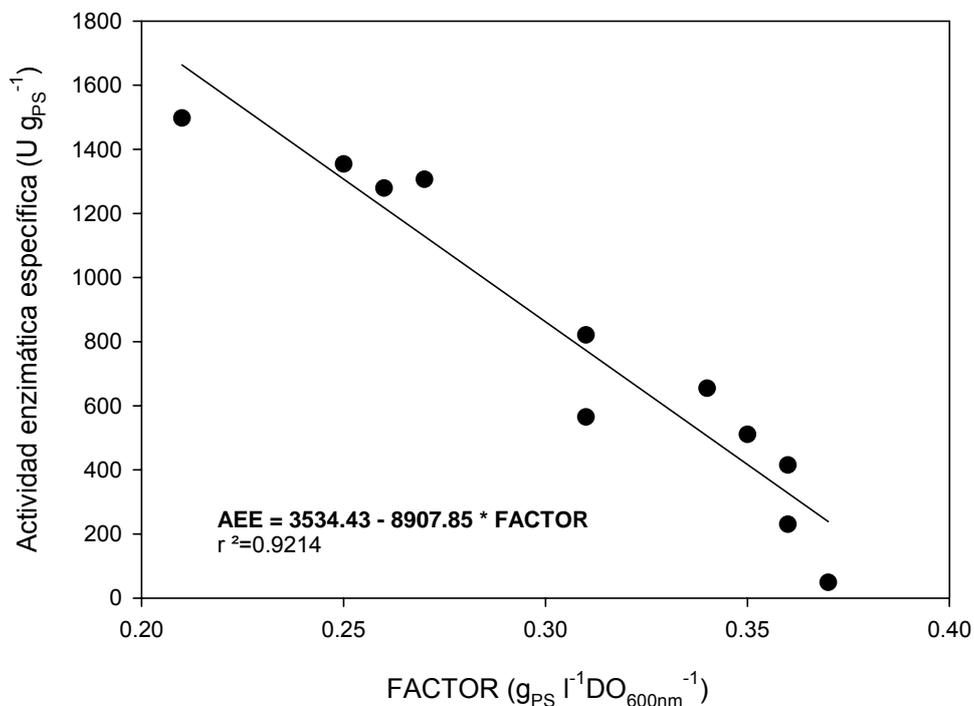


Figura 8.21. Relación entre la actividad enzimática específica de RhuA y el factor utilizado para calcular la concentración de biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{l}^{-1} \text{DO}_{600\text{nm}}^{-1}$). La variación de la relación entre PS/DO_{600nm} ha sido atribuido a cambios en la composición celular (no se observaron cambios morfológicos en *E. coli* M15 (pQErham), específicamente a la acumulación de la proteína recombinante expresada. AEE = Actividad enzimática específica.

La determinación del peso seco experimental y la DO_{600nm} final de cada experimento en reactor permitió tener una idea del nivel de RhuA producido en cada experimento. Este sistema se utilizó como una manera sencilla para predecir de forma aproximada la actividad específica de RhuA obtenida en cada cultivo antes de realizar las determinaciones experimentales de actividad.

8.6 CONCLUSIONES

La implementación de una estrategia semicontinua exponencial por limitación de glucosa como fuente de carbono a permitido el crecimiento de *E. coli* M15 (pQErham) y obtener cultivos de alta densidad celular de forma reproducible.

La determinación del la composición del medio de cultivo definido y el alimento en base a la composición elemental de *E. coli* M15 (pQErham) ha permitido alcanzar concentraciones de $95 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$ en cultivos semicontinuos.

El control del pH a través de una solución de hidróxido de amonio concentrado ha permitido el control de la concentración de amonio en los cultivos alrededor de 1 g l^{-1} a lo largo de todo el proceso.

La adición de fosfatos durante la etapa semicontinua, calculada en base a su rendimiento relativo a biomasa, $Y_{\text{X/PO}_4^{2-}} = 13.3 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$, permite mantener su concentración entre 2 y 7 g l^{-1} , de forma que no represente un elemento limitante del crecimiento.

La determinación experimental de los coeficientes de rendimiento intrínscico ($\gamma_{\text{X/S}}$: 0.439 gX gS^{-1}) y mantenimiento ($m_{\text{S}} = 0.095 \text{ gS (gX}\cdot\text{h)}^{-1}$) permitieron calcular un valor más exacto del rendimiento aparente ($Y_{\text{X/S}}$) para una velocidad de crecimiento fijada (μ_{set})

La introducción del valor ($Y_{\text{X/S}}$) dentro de la ecuación del modelo matemático del programa de alimentación permitió un mayor ajuste de la velocidad de crecimiento *E. coli* M15 (pQErham).

La elección de una velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$), junto con una estrategia de alimentación exponencial por limitación de glucosa permite la obtención de cultivos de alta densidad celular de *E. coli* evitando la formación de ácido acético dentro de márgenes inhibitorias para el crecimiento.

La inducción del cultivo al final de la etapa semicontinua produce un efecto de estrés y de carga metabólica sobre *E. coli* M15 (pQErham) como consecuencia de la elevada tasa de transcripción y traducción de la proteína recombinante, afectando entre otros: i) velocidad de crecimiento, ii) rendimiento aparente biomasa/glucosa, ii) incremento la producción de acético.

La adición de fuentes de aminoácidos (casaminoácidos, medio LB) antes de la inducción no mejora la actividad específica de RhuA.

Existe una correlación inversa entre la concentración de IPTG utilizada para la inducción y la actividad específica de RhuA obtenida, siendo este efecto independiente del modo de cultivo (Erlenmeyer, discontinuo en bioreactor o semicontinuo en bioreactor). Este efecto,

posiblemente, se debe a que la intensidad de la inducción es menor al usar menos IPTG, minimizando el estrés metabólico sobre *E. coli* M15 (pQErham).

En las condiciones de trabajo utilizadas, los niveles de actividad específica de RhuA son mayores en discontinuo que en cultivos semicontinuos a una misma concentración de IPTG. Se han planteado algunas posibles causas de este fenómeno, todas asociadas a cultivos expuestos a una limitación progresiva de energía (semicontinuos), entre las cuales se citan: : i) presencia de una población heterogénea con diferentes estados fisiológicos en CADC, ii) síntesis de proteínas de estrés e intensificación de la degradación de proteínas, iii) inestabilidad del RNA_m, iv) inestabilidad y segregación inadecuada del plásmido pQErham.

La producción y productividad de RhuA presentan un incremento significativo en cultivos en semicontinuo comparadas con el cultivo en discontinuo (2166 y 1032 % respectivamente), lo cual indica un evidente mejoramiento del proceso

Existe una correlación entre el factor DO_{600nm}/biomasa obtenido experimentalmente y la actividad específica de RhuA obtenida a partir de cultivos inducidos de *E. coli* M15 (pQErham). La determinación experimental de este factor al final de cada experimento de inducción permitió tener una idea del nivel de RhuA producido en cada experimento

La determinación del peso seco experimental al final de cada experimento permitió predecir de forma aproximada la actividad específica de RhuA obtenida en cada cultivo antes de realizar las determinaciones experimentales de actividad.

8.7. BIBLIOGRAFIA

- Akesson M, Hagander P, Axelsson JP. 2001. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 73(3):223-230.
- Andersson L, Strandberg L, Enfors SO. 1996. Cell segregation and lysis have profound effects on the growth of *Escherichia coli* in high cell density fed batch cultures. *Biotechnol. Prog.* 12(2):190-195.
- Bhattacharya SK, Dubey AK. 1995. Metabolic Burden as Reflected by Maintenance Coefficient of Recombinant *Escherichia coli* Overexpressing Target Gene. *Biotechnol. Lett.* 17(11):1155-1160.
- Brown SW, Meyer HP, Fiechter A. 1985. Continuous Production of Human-Leukocyte Interferon with *Escherichia coli* and Continuous Cell-Lysis in a 2 Stage Chemostat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23(1):5-9.
- Choi JI, Lee SY. 1999. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4363-4368.
- DeLisa MP, Li JC, Rao G, Weigand WA, Bentley WE. 1999. Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. *Biotechnol. Bioeng.* 65(1):54-64.
- Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. 1996. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol.* 16(3):145-154.
- Durany O, de Mas C, Lopez-Santin J. 2005. Fed-batch production of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *E. coli*. *Process Biochemistry* 40(2):707-716.
- Fuchs C, Koster D, Wiebusch S, Mahr K, Eisbrenner G, Markl H. 2002. Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 93(3):243-251.
- Han K, Lim HC, Hong J. 1992. Acetic-Acid Formation in *Escherichia coli* Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 39(6):663-671.
- Hoffmann F, Weber J, Rinas U. 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 80(3):313-319.
- Horn U, Strittmatter W, Krebber A, Knupfer U, Kujau M, Wenderoth R, Muller K, Matzku S, Pluckthun A, Riesenberger D. 1996. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-

- cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46(5-6):524-532.
- Jung G, Deneffe P, Becquart J, Mayaux JF. 1988. High-Cell Density Fermentation Studies of Recombinant *Escherichia coli* Strains Expressing Human Interleukin-1-Beta. *Annales De L Institut Pasteur-Microbiologie* 139(1):129-146.
- Kweon DH, Han NS, Park KM, Seo JH. 2001. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 36(6):537-542.
- Lee SY. 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14(3):98-105.
- Lee SY, Yim KS, Chang HN, Chang YK. 1994. Construction of Plasmids, Estimation of Plasmid Stability, and Use of Stable Plasmids for the Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 32(2):203-211.
- Li Y, Chen J, Mao YY, Lun SY, Koo YM. 1998. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 33(7):709-714.
- Lin HY, Mathiszik B, Xu B, Enfors SO, Neubauer P. 2001. Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 73(5):347-357.
- Macaloney G, Draper I, Preston J, Anderson KB, Rollins MJ, Thompson BG, Hall JW, McNeil B. 1996. At-line control and fault analysis in an industrial high cell density *Escherichia coli* fermentation, using NIR spectroscopy. *Food and Bioprocess Processing* 74(C4):212-220.
- Mendoza-Vega O, Buri E, Speck D. 1995. Enhancement of Recombinant Cholera-Toxin B-Subunit Production in *Escherichia coli* by Applying a Fed-Batch Control Strategy. *Biotechnol. Lett.* 17(10):1037-1042.
- Mori H, Yano T, Kobayashi T, Shimizu S. 1979. High-Density Cultivation of Biomass in Fed-Batch System with Do-Stat. *J. Chem. Eng. Jpn.* 12(4):313-319.
- Neubauer PW, J. . 2001. Expression and Fermentation strategies for recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Recombinant protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands:195-258.
- Pan JG, Rhee JS, Lebeault JM. 1987. Physiological Constraints in Increasing Biomass Concentration of *Escherichia coli*-B in Fed-Batch Culture. *Biotechnol. Lett.* 9(2):89-94.
- Riesenberg D. 1991. High-Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2(3):380-384.

- Riesenberg D, Guthke R. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(4):422-430.
- Riesenberg D, Menzel K, Schulz V, Schumann K, Veith G, Zuber G, Knorre WA. 1990. High Cell-Density Fermentation of Recombinant *Escherichia coli* Expressing Human Interferon Alpha-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34(1):77-82.
- Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Ross A, Deckwer WD. 1991. High Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli* at Controlled Specific Growth-Rate. *J. Biotechnol.* 20(1):17-28.
- Schwartz NB, Abram D, Feingold DS. 1974. L-Rhamnulose 1-Phosphate Aldolase of *Escherichia coli* - Role of Metal in Enzyme Structure. *Biochemistry* 13(8):1726-1730.
- Suzuki T, Yamane T, Shimizu S. 1990. Phenomenological Background and Some Preliminary Trials of Automated Substrate Supply in Ph-Stat Modal Fed-Batch Culture Using a Setpoint of High Limit. *J. Ferment. Bioeng.* 69(5):292-297.
- Turner C, Gregory ME, Thornhill NF. 1994. Closed-Loop Control of Fed-Batch Cultures of Recombinant *Escherichia coli* Using Online Hplc. *Biotechnol. Bioeng.* 44(7):819-829.
- Wang CK, Duan KJ, Yeh KW, Chen WC. 2001. Production of a fusion protein of sweet potato sporamin from recombinant *E. coli* XL1 Blue by fed-batch fermentations. *Biotechnol. Lett.* 23(6):475-479.
- Weber J, Hoffmann F, Rinas U. 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol. Bioeng.* 80(3):320-330.
- Wilms B, Hauck A, Reuss M, Sylatk C, Mattes R, Siemann M, Altenbuchner J. 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 73(2):95-103.
- Yamanè T, Shimizu S. 1984. Fed-batch Techniques in Microbial Processes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 30:147-194.
- Yee L, Blanch HW. 1993a. Defined Media Optimization for Growth of Recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol. Bioeng.*:221-230.
- Yee L, Blanch HW. 1993b. Recombinant Trypsin Production in High Cell-Density Fed-Batch Cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 41(8):781-790.

9. DISEÑO DE UN SISTEMA PQE DE ALTA ESTABILIDAD PLASMÍDICA BASADO EN UN MARCADOR GENÉTICO DE AUXOTROFIA PARA GLICINA

9.1 INTRODUCCIÓN

La treonina aldolasa (EC 4.1.2.5) cataliza la interconversión reversible entre algunos β -hidroxi- α -aminoácidos (i.e. L-treonina) y glicina más su correspondiente aldehído (i.e. acetaldehído) (figura 9.1).

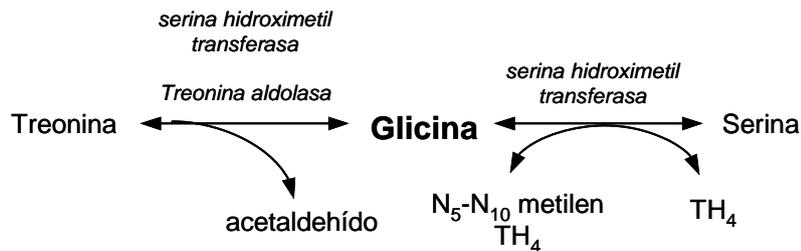


Figura 9.1 Reacciones catalizadas por la treonina aldolasa y la serina hidroximetil transferasa

Un hecho relevante sobre la treonina aldolasa es que durante mucho tiempo se pensó que la serina hidroximetil transferasa y la treonina aldolasa eran la misma enzima. Esta confusión surgió a raíz de los estudios realizados sobre la SHMT de hígado de conejo, donde se reportó que esta enzima tenía ambas actividades (Schirch and Mason 1962). A partir de ese momento, se aceptó que la vía de degradación de treonina era catalizada por la SHMT, asumiendo que ambas actividades eran producto de una misma proteína. Sin embargo, otros estudios realizados en hígado de rata encontraron que las preparaciones obtenidas de SHMT no exhibían actividad LTA (Ogawa and Fujioka 1981).

Durante mucho tiempo, se pensaba que la síntesis intracelular de glicina en *E. coli* era llevada a cabo principalmente por la SHMT cuando la glucosa es la principal fuente de carbono (Stauffer et al. 1986). Kimura (Kimura et al. 1997) denomina L-treonina aldolasa a la actividad asociada a la SHMT (codificada por el gen *glyA*) en *E. coli*. Sin embargo, Liu (Liu et al. 1998) demostró que existe un gen (*ItaE*) que codifica para una LTA termoestable de baja especificidad. El hallazgo de esta enzima implica que existe un mecanismo alternativo para la síntesis de glicina diferente a la reacción catalizada por la SHMT, el cual sería relevante cuando la SHMT es inerte.

Para demostrar esta hipótesis, Liu (Liu et al. 1998) realizó la interrupción del gen cromosómico *ItaE* de *E. coli* mediante recombinación homóloga con el plásmido pBTAE2. En este trabajo demostró que el gen *ItaE* es la enzima clave para la biosíntesis de glicina en *E. coli* GS245 (mutante cuyo gen *glyA* se encuentra inactivado), aunque no es la principal fuente de glicina en la cepa salvaje. Para ello, cultivó la cepa de *E. coli* GS245

en un medio definido con glucosa como única fuente de carbono, obteniendo una tasa de crecimiento de 0.14 h^{-1} . Sin embargo, cuando crecía *E. coli* GS245::pBTAE2 (mutante cuyos genes *glyA* y *ltaE* se encuentran inactivos) en el mismo medio de cultivo, se obtenía una tasa de crecimiento 4 veces menor (0.034 h^{-1}), incrementándose cuando se suplementaba glicina al medio de cultivo.

9.2 Diseño de un sistema de complementación génica para regular la segregación plasmídica

Basándonos en el trabajo de Liu (Liu et al. 1998), se postuló la hipótesis de que la complementación génica para una auxotrofia en glicina podría favorecer la estabilidad plasmídica del vector pQE40 en cultivos en semicontinuo con medio MD sin necesidad del uso de antibióticos como elementos de presión selectiva. En este sentido, una cepa prototrófica que presente una disrupción cromosomal del gen *glyA* podría crecer en un medio definido si y solo si:

- a) Se suministra glicina en el medio.
- b) La cepa posee un plásmido recombinante que posea una copia funcional del gen *glyA*, esencial para supervivencia del microorganismo y que se exprese de manera regulada o constitutiva.

Así, cualquier clon que no incorpore el plásmido de complementación, no podrá crecer en un medio definido. Luego, el crecimiento estará supeditado a la presencia del plásmido que exprese el gen, en este caso, *glyA*.

Una ventaja de este sistema es que la presión selectiva por antibiótico no sería necesaria ya que la complementación por expresión homóloga de la SHMT sería suficiente para asegurar la estabilidad plasmídica. Este aspecto resulta atractivo desde el punto de vista de un proceso a escala industrial por varias razones:

1. Por un lado, la adición de antibióticos al medio de cultivo encarece considerablemente el coste global del proceso de producción. Estos son elementos de alto valor y necesarios en cantidades importantes, ya que la presencia de los productos codificados por los genes de resistencia aceleran su degradación cuando se liberan al medio de cultivo (Baneyx 1999).
2. La FDA (*Food and Drug Administration*, USA) recomienda evitar su uso por varias razones: i) la liberación no controlada de genes de resistencia a antibióticos al medioambiente podría favorecer, aunque con poca posibilidad, la transferencia horizontal de esta información genética a microorganismos patógenos (Davidson

1999) y ii) algunos genes de resistencia, como por ejemplo el gen *bla*, contienen secuencias CpG dinucleótidos que pueden estimular la respuesta inmunológica (Sato et al. 1996), y si suministran junto con un producto recombinante de uso terapéutico, podría causar problemas de inmunosensibilidad

3. El mantenimiento de este tipo de plásmidos causa un estrés metabólico adicional a la célula hospedera debido a la expresión constitutiva del gen de resistencia al antibiótico (Bentley et al. 1990), y especialmente, cuando se trata de plásmidos de alto número de copias.

Existen algunos trabajos publicados sobre el uso de las estrategias de complementación para evitar segregaciones plasmídicas incorrectas. Van der Kaaij (Van der Kaaij et al. 2004) complementó la auxotrofia para alanina de la cepa de *Lactobacillus johnsonii* por expresión heteróloga de la L-alanina deshidrogenasa (*alaD*) de *Bacillus subtilis*. En este trabajo se amplificó el gen *alaD* de *B. subtilis* y el promotor *ldh* de *Streptococcus thermophilus*, se fusionaron por PCR y el producto se clonó en el plásmido pHK15. Las transformantes pHK15 de *L. johnsonii* fueron capaces de crecer en medio definido sin alanina a una tasa de crecimiento similar a la cepa salvaje. Morona (Morona et al. 1991) trabajó con vectores que contenían el gen *thyA* (esencial para la síntesis de tiamina) para garantizar la estabilidad plasmídica en cepas de *E. coli thyA*⁻. De forma similar, Ryan (Ryan et al. 2000) ha diseñado sistemas basados en la manipulación del gen *glnA* (esencial para la síntesis de glutamina).

Apoyándonos en los estudios de complementación como estrategia para incrementar la estabilidad plasmídica sin recurrir al uso de antibióticos, se decidió silenciar el gen *glyA* de *E. coli* M15 (cepa prototrófica) y diseñar un sistema que pudiera expresar de manera regulada el gen *glyA* incorporado en el plásmido pQE40.

Los métodos tradicionales de inactivación de genes cromosómicos bacterianos requieren clonar el gen de interrupción e incorporarlo a un plásmido adecuado para que ocurra la recombinación con el cromosoma. Sin embargo, Datsenko (Datsenko and Wanner 2000) publicó un sistema innovador y muy eficiente para la inactivación de genes cromosómicos que, a diferencia de los métodos que implican plásmidos con regiones de homología, emplea directamente productos de PCR.

En *Saccharomyces cerevisiae*, los genes pueden ser directamente eliminados mediante transformación con fragmentos de PCR que codifican para un marcador selectivo y conteniendo solo 35 nucleótidos (nt) de DNA homólogo respecto a una región del cromosoma (Baudin et al. 1993). Este método de “reemplazo de genes” mediante fragmentos de PCR, basado en la alta eficiencia de recombinación mitótica en levaduras,

ha facilitado grandemente la generación de mutantes específicos para el análisis funcional de su genoma (Henras et al. 2004; Park et al. 2005; Trotter and Grant 2005).

En contraste con las levaduras, la mayoría de las bacterias no son transformables con DNA lineal. Una de las razones por la cual *E. coli* no es transformable es por la presencia de exonucleasas intracelulares que degradan el DNA lineal (Lorenz and Wackernagel 1994). Sin embargo, las cepas mutantes que carecen de la exonucleasa V del complejo de recombinación RecBCD son transformables con DNA lineal (Cosloy and Oishi 1973). En estos casos, la recombinación puede ocurrir en mutantes *recB* o *recC* que cargan una mutación supresora (*sbcA* o *sbcB*) que activan una vía de recombinación alternativa. El descubrimiento de que los mutantes *recD* son capaces de recombinar ya que carecen de exonucleasa V, ha conducido a usar simplemente mutantes *recD* de *E. coli* para realizar estos tipos de interrupciones génicas (Amundsen et al. 1986).

Sin embargo, el método de reportado por Datsenko (Datsenko and Wanner 2000) permite que, incluso cepas salvajes, puedan ser transformadas con DNA lineal. Para ello, utiliza el alto potencial de recombinación que poseen los bacteriófagos en combinación con la capacidad de algunas enzimas de reconocer secuencias altamente repetitivas.

9.3 Construcción de la cepa mutante *E. coli* M15 Δ glyA (auxotrófica para glicina) mediante recombinación con fragmentos de PCR

Durante mucho tiempo se ha sabido que muchos bacteriófagos codifican su propio sistema de recombinación homóloga. Recientemente se ha demostrado que la función λ *Red* (γ , β , *exo*) promueve una tasa de recombinación mucho mayor que la demostrada por los mutantes *recBC sbcB* o *recD* empleando fragmentos lineales de DNA. El sistema diseñado por Datsenko (Datsenko and Wanner 2000) consiste en reemplazar secuencias cromosómicas con un gen de resistencia a un antibiótico, el cual es generado por PCR, usando *primers* con extensiones de homología de 36 a 50 nt (H1 y H2). Este proceso es llevado a cabo por recombinación de regiones vecinas homólogas mediante el sistema *Red*. Después de la selección, el gen de resistencia puede ser eliminado usando un plásmido FLP *helper* que expresa la FLP recombinasa, el cual actúa sobre la secuencia repetitiva FRT (sitio de reconocimiento de la FLP recombinasa) que flanquea el gen de resistencia. Tanto el plásmido *Red* como el FLP *helper* pueden ser curados creciendo las transformantes a 37°C ya que ambos poseen replicones sensibles a la temperatura.

Utilizando el método publicado por Datsenko (Datsenko and Wanner 2000), se realizó una interrupción del gen *glyA* de *E. coli* M15, el cual codifica para la serina hidroximetil transferasa, enzima clave en la ruta metabólica de síntesis de glicina, con el objeto de

generar un mutante (M15 Δ glyA) auxotrófico para glicina. Las etapas para la inactivación del gen *glyA* se describen a continuación:

1. Transformación de la cepa *E. coli* M15 con el plásmido pKD46 e inducción del sistema *Red*.
2. Amplificación del fragmento P1P4 a partir del plásmido pKD32
3. Inserción del fragmento P1P4 en el cromosoma bacteriano por recombinación.
4. Delección del *cassette* cromosómico P1P4 de *E. coli* M15 Δ glyA::P1P4
5. Comprobación del fenotipo mutante *gly*⁻ de la cepa *E. coli* M15 Δ glyA

9.3.1. Transformación de la cepa *E. coli* M15 con el plásmido pKD46 e inducción del sistema *Red*.

El sistema *Red* se encuentra clonado en el plásmido de bajo número de copias pKD46 (figura 3.6, materiales y métodos), el cual posee un replicón sensible a temperatura (para permitir su posterior eliminación de las cepas transformantes). Este plásmido expresa el sistema *Red* bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (P_{araB}) de forma de prevenir recombinación en condiciones de no inducción. El sistema *Red* incluye tres genes: γ , β , *exo* cuyos productos son *Gam*, *Bet* y *Exo* respectivamente. *Gam* inhibe la exonucleasa V del complejo de recombinación RecBCD del hospedero, de forma que *Bet* y *Exo* puedan acceder a los extremos del DNA para promover la recombinación. Además, este sistema incluye el terminador nativo tL3 *downstream* de *exo*.

Así, el crecimiento de la cepa de *E. coli* M15 pKD46 en un medio con arabinosa (1 mM) conllevaría a la expresión intracelular del sistema *Red*, cuya presencia, en forma activa, induce la recombinación homóloga del DNA. Luego, la introducción de un exceso estequiométrico de un fragmento de DNA amplificado por PCR al interior de estas células, podría favorecer una recombinación con el cromosoma siempre y cuando existan regiones homólogas. Para ello, se amplificó un fragmento (P1P4) usando primers específicos que contienen regiones de homología con el gen *glyA* de *E. coli*, con el fin de inactivarlo.

9.3.2. Amplificación del fragmento P1P4 a partir del plásmido pKD32

El fragmento de PCR P1P4 (figura 9.2) se generó por PCR a partir del plásmido molde PKD32 empleando un par de primers específicos (P1-P4). Cabe resaltar que el fragmento P1P4 contiene el gen de resistencia a cloramfenicol (*tn9*) flanqueado por sitios FRT (figura 9.3) y las extensiones de homología H1 y H2 del gen *glyA* de *E. coli* K12

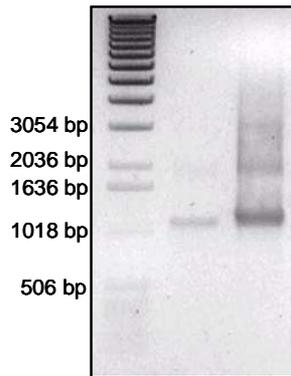


Figura 9.2. Gel de agarosa 1 % del producto de PCR utilizando los primers P1-P4 (1108 bp). La banda de 1108 bp se purificó y se digirió con *DpnI* por 30 min. a 37°C (de forma de eliminar el DNA molde metilado), purificándolo luego por columna y resuspendiéndolo en tampón 10 mM Tris, pH 8.0.

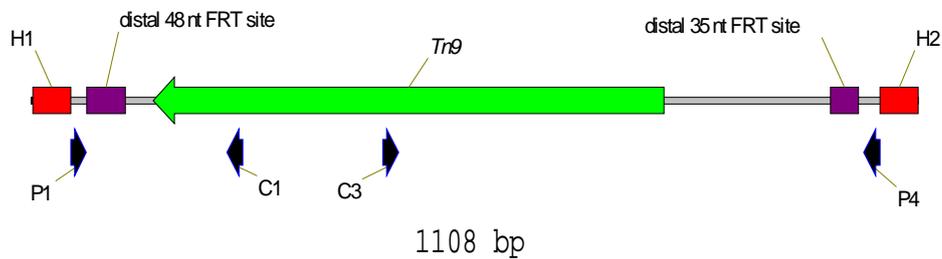


Figura 9.3. Fragmento P1P4 amplificado por PCR a partir del plásmido molde pKD32 empleando el par de primers P1-P4.

9.3.3. Transformación de células *E. coli* M15 con el fragmento P1P4 e inserción en el cromosoma bacteriano por recombinación.

La electroporación de células de *E. coli* M15 (pKD46) donde se había inducido el sistema *Red* con el fragmento de PCR P1P4. Se sembraron placas de LB con cloramfenicol ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) y se seleccionaron las transformantes Cm^r (10 transformantes). La figura 9.4 muestra un esquema de la inserción del fragmento P1P4 en el gen *glyA* del cromosoma de *E. coli* M15. Las secuencias H1 y H2 del fragmento P1P4, análogas a los extremos 5' y 3' del gen, permitieron la recombinación homóloga a través de las enzimas del sistema *Red*.

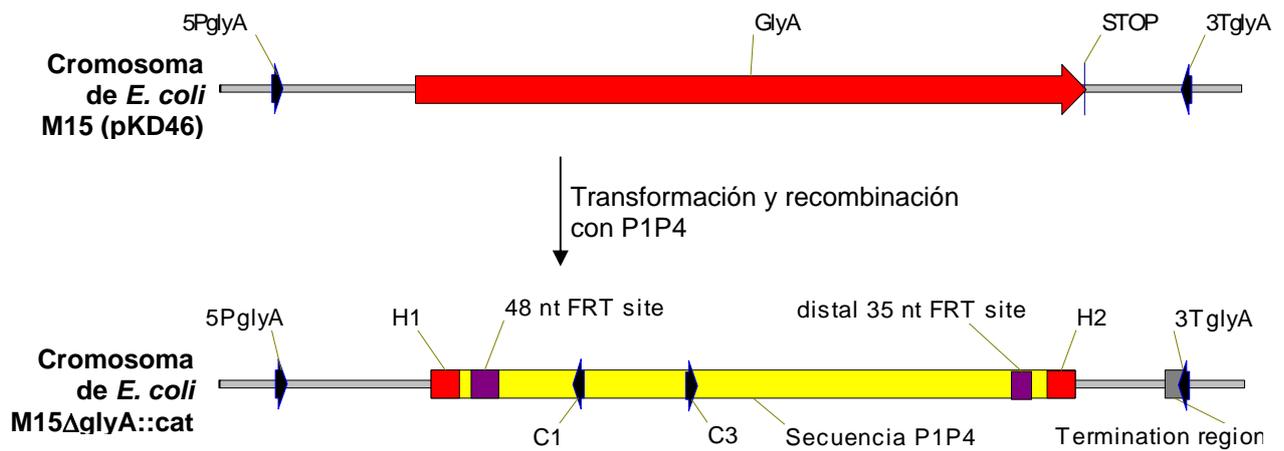


Figura 9.4. Esquema de la inserción del fragmento P1P4 en el gen *glyA* del cromosoma de *E. coli* M15.

Se estudió el fenotipo de los 10 clones positivos, para lo cual se sembraron en placas con medio definido (con y sin glicina) y LB (con cloranfenicol). La tabla 9.1 muestra los resultados de los fenotipos obtenidos de los 10 clones analizados.

Clon	Crecimiento en medio definido		LB (Cm+)
	Con glicina	Sin glicina	
1	-	-	-
2	+	-	+
3	+	+	+
4	+	-	+
5	+	-	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	-	+
10	+	-	+

Tabla 9.1. Resultados de la transformación de células *E. coli* M15 con el fragmento de PCR P1P4. (-) Crecimiento negativo en el medio. (+) Crecimiento positivo.

Se observaron 8 clones positivos de *E. coli* con el fenotipo esperado ($gly^- Cm^+$). Los nuevos clones El análisis por PCR de tres clones positivos seleccionados al azar, usando primers específicos de regiones flanqueantes del gen *glyA* (5PglyA-3TglyA) en combinación con primers específicos internos del gen *tn9* (C1-C3) permitieron demostrar la inserción en el cromosoma bacteriano del fragmento P1P4 (conteniendo el *cassette* FRT), reemplazando el locus salvaje (figura 9.5). Las nuevas cepas se denominaron *E. coli* M15::P1P4.

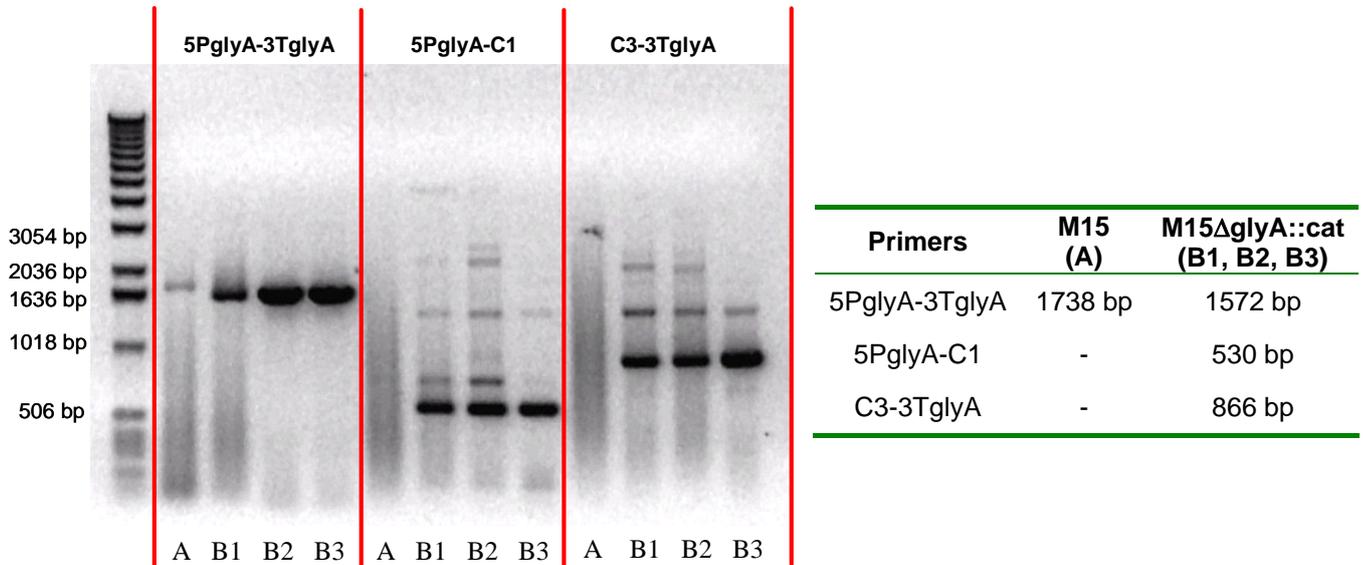


Figura 9.5. Gel de agarosa 0.8 %. Comprobación por PCR de la inserción del fragmento P1P4 en el cromosoma de *E. coli* M15. Se analizaron 3 clones positivos de *E. coli* M15::P1P4 (B1,B2, B3) para el fenotipo esperado ($gly^- Cm^+$). Control: *E. coli* M15 (A). La tabla indica el tamaño de los fragmentos esperados por PCR usando el par de primers específicos.

9.3.4. Delección del *casette* cromosómico FRT de *E. coli* M15ΔglyA::P1P4

Una vez confirmado la delección del gen cromosomal *glyA* (reemplazado por el fragmento P1P4) de diferentes clones, se seleccionó la cepa B2 para la eliminación del *casette* FRT. Para ello, primero se eliminó el plásmido pKD46 sembrando la cepa B2 en placas con medio LB con cloranfenicol a 40°C (el replicón de pKD46 es termosensible).

Una vez eliminado el plásmido pKD46, se procedió a eliminar el *casette* FRT del cromosoma bacteriano mediante recombinación sitio-específica entre los sitios FRT empleando la Flp recombinasa del plásmido pCP20. Éste es un plásmido resistente a ampicilina y cloramfenicol y posee un replicón sensible a temperatura. Además, posee el gen *flp* (Flp recombinasa) bajo en control de un promotor inducible por temperatura. La escisión del *casette* FRT, catalizada por la Flp recombinasa, se llevó a cabo en varias etapas:

- Transformación de los clones con el plásmido pCP20.
- Selección de los clones resistentes a ampicilina a 30°C
- Resiembra de diferentes colonias en medio LB no selectivo (sin antibióticos) a 42 °C para la inducción de la Flp recombinasa.

- Verificación de la escisión del *cassette* FRT en los clones que perdieron la resistencia a antibióticos (Cm y amp) por PCR empleando los primers que flanquean el sitio de interés (5PglyA – 3TglyA).

El fragmento de PCR obtenido de un sitio anulado tendrá, en principio, un tamaño reducido comparado con su tipo salvaje correspondiente. La tabla 9.2 muestra los tamaños esperados de los fragmentos obtenidos por PCR utilizando pares de primers específicos (1, 2, 3). Los resultados obtenidos por PCR se muestran en la figura 9.6

Primers	Clones		
	M15ΔglyA (A)	M15ΔglyA::P1P4 (B)	M15 (C)
1 5PglyA - 3TglyA	Aprox 600 bp	1572 bp	1738bp
2 5PglyA - C1	-	530 bp	-
3 C3 - 3TglyA	-	866 bp	-

Tabla 9.2. Pares de primers utilizados para comprobación por PCR de la delección del casete FRT en el cromosoma de *E. coli* M15.

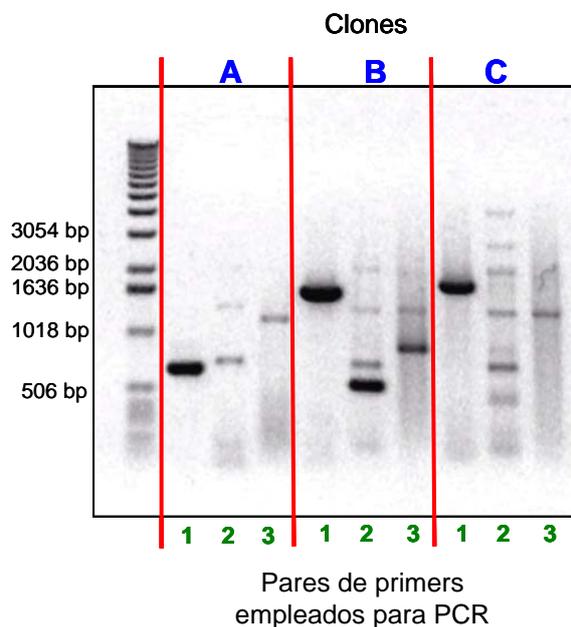


Figura 9.6. Gel de agarosa 0.8 %. Tamaño de los productos amplificados por PCR a partir de DNA genómico de diferentes clones de *E. coli*. (A) = M15ΔglyA; (B) = M15ΔglyA::P1P4; (C) = M15 (control).

La figura 9.6 muestra que el fragmento de PCR obtenido a partir de la cepa *E. coli* M15ΔglyA usando los primers 5PglyA - 3TglyA (región 5' *upstream* y 3' *downstream* del gen *glyA*) presenta un tamaño menor (aprox 600 bp) comparado con la cepa control *E. coli* M15 (1.7 kb). Esto indica la delección de un fragmento de aproximadamente 1.1 Kb del cromosoma de *E. coli* M15, y que el fragmento deleccionado contiene la mayor parte del gen *glyA* (1.2 Kb)

9.3.5. Comprobación del fenotipo mutante gly⁻ de la cepa *E. coli* M15ΔglyA

La auxotrofia de la cepa M15ΔglyA se verificó mediante cultivos en medio MD en Erlenmeyer, comparándolo con la cepa control M15 pQErham. Para ello, se transformó la cepa M15ΔglyA con el plásmido pQErham de forma que la carga metabólica impuesta por la presencia del plásmido sea equiparable en ambas células. Así, a partir de un cultivo en medio LB con ampicilina (toda la noche, 37°C, 250 rpm, DO_{final}= 3.5), se tomó 3.5 ml para inocular en medio MD (volumen final = 50 ml, 250 rpm, 37°C) de forma que el inóculo con medio complejo (LB) represente el 7 % y la aportación de glicina proveniente del medio complejo LB al medio definido sea mínima.

Los resultados de los cultivos de la cepa M15ΔglyA en medio MD con y sin suplemento de glicina (concentración de glicina en el medio = 70 mg l⁻¹; concentración calculada tomando en cuenta una DO_{600nm} final = 5, factor = 0.37 g_{PS} l⁻¹ DO_{600 nm}⁻¹, 80 % de proteína bacteriana y 5 % de glicina/proteína) muestran que la cepa mutante no es capaz de crecer en medio definido sin glicina (figura 9.7). Por otro lado, la adición de glicina al medio permite el crecimiento de la cepa mutante comparable al de la cepa control M15 pQErham.

Este experimento demuestra que la glicina pasa a ser un elemento esencial para el crecimiento de la cepa mutante M15ΔglyA, y que debe ser suministrada en el medio de cultivo para lograr su crecimiento.

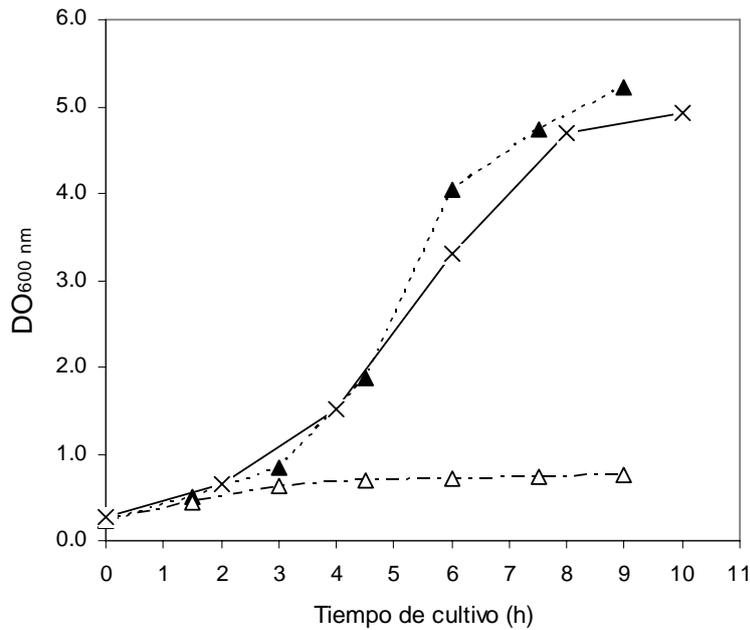


Figura 9.7. Crecimiento de *E. coli* M15ΔglyA pQErham en: (△) medio MD sin glicina; (▲) medio MD con glicina 70 mg l⁻¹; (X) *E. coli* M15 pQErham en medio MD sin glicina (control)

El resultado obtenido del cultivo anterior no solo demostró el fenotipo gly⁻ de *E. coli* M15ΔglyA, sino también permitió descartar otros problemas que podrían surgir a raíz de la ausencia de la actividad SHMT, tales como alteraciones del crecimiento producto de un metabolismo inadecuado del ácido fólico.

Es bien conocido que la SHMT no sólo está involucrada en la síntesis endógena de glicina en *E. coli*, sino también en formación de 5,10-metilen TH₄, el cual es un componente importante del metabolismo bacteriano ya que es la principal fuente de unidades de un carbono (Dev and Harvey 1982) (figura 9.8). Por ejemplo, este compuesto es utilizado en la biosíntesis de timidilato y purinas. También, la forma reducida 5-metil TH₄, catalizada por la 5,10-metilen TH₄ reductasa, constituye la principal fuente de grupos metilos para la síntesis de metionina a partir de homocisteína.

La metionina, en forma de S-adenosilmetionina, es requerida para muchas reacciones biológicas de metilación, incluyendo la metilación del DNA. Además, la forma reducida N¹⁰-formil TH₄ provee los carbonos del grupo formilo del f-met-tRNA (Dev and Harvey 1982; Harvey 1975).

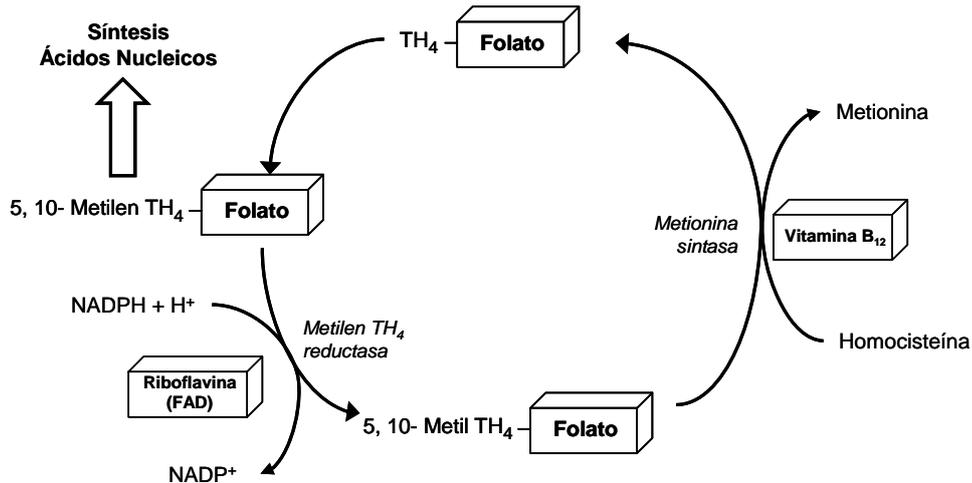


Figura 9.8. Metabolismo del ácido fólico en *E. coli*

El experimento anterior demostró que la cepa mutante *E. coli* M15 Δ glyA es capaz de crecer de forma similar al control (*E. coli* M15) en presencia de una fuente de glicina, demostrando que la SHMT no es la única vía para la aportación de grupos metilén y metilo para reacciones biosintéticas.

9.4 Construcción del plásmido de complementación de la auxotrofia en glicina

9.4.1 Basado en las regiones regulatorias de glyA

La primera estrategia que se diseñó para tener una fuente endógena de glicina consistió en clonar en el plásmido pQErham un fragmento de DNA que incluyese no solo el gen estructural *glyA*, sino todas las regiones involucradas en la regulación y terminación de su transcripción, de forma que la misma célula regulase su síntesis.

Así, una vez obtenida la cepa mutante M15 Δ glyA, se procedió a clonar en el plásmido pQErham la secuencia obtenida por PCR a partir de los primers 5PTglyA-3tglyA (denominada "gamma" γ - a partir de ahora). Esta secuencia contiene:

- Extremo 5' : regiones promotoras y reguladoras de *glyA*
- Gen *glyA*
- Extremo 3' : secuencia de terminación de transcripción de *glyA*

El fragmento "gamma" (γ) amplificado por PCR y el plásmido pQErham se digirieron con *Xba*/*Mro*I, se purificaron y se ligaron según el esquema de la figura 9.9 para formar el plásmido pQE γ rham.

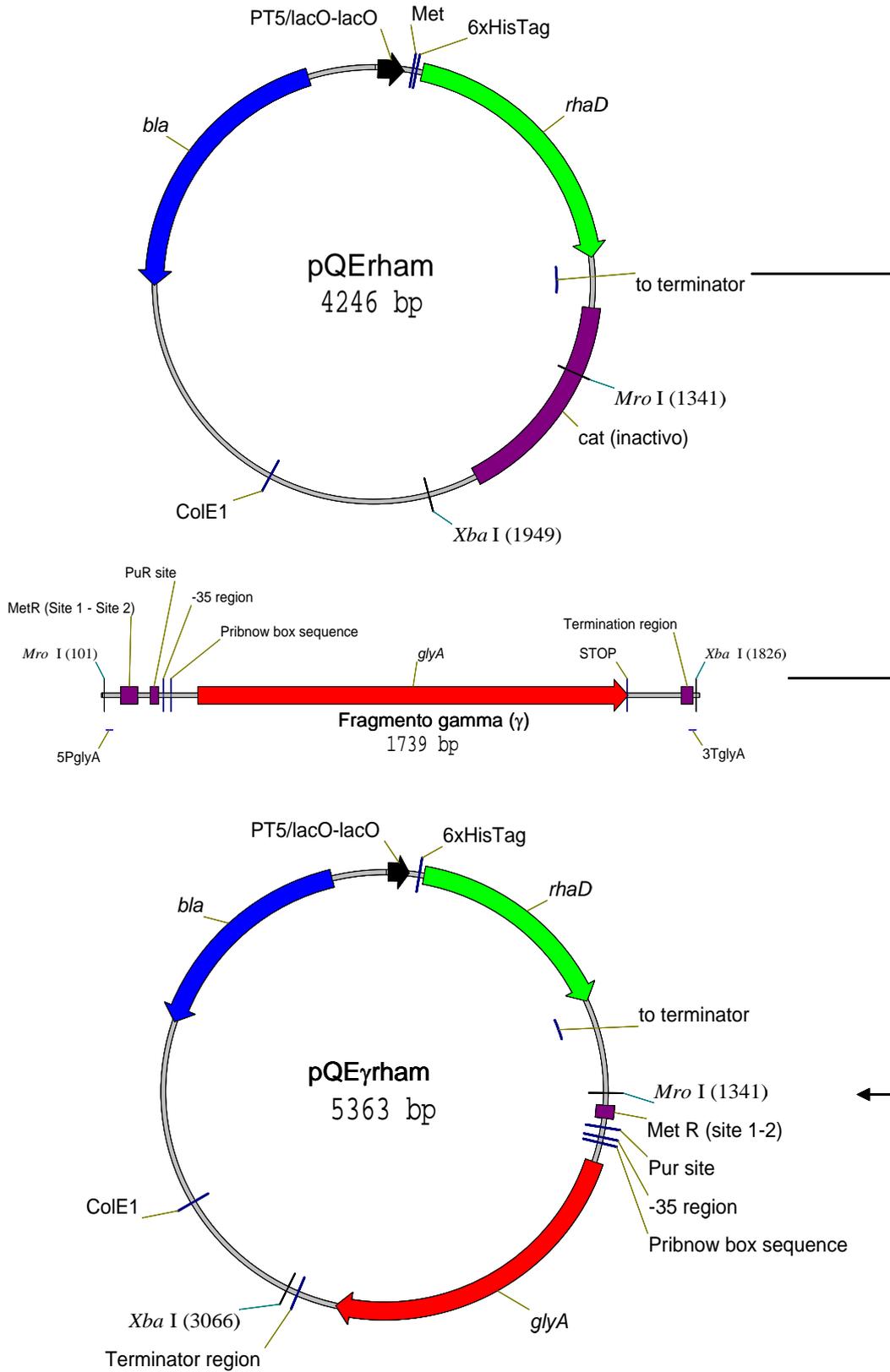


Figura 9.9. Esquema de la construcción del plásmido de complementación génica pQE α rham

El plásmido pQE γ rham se utilizó para transformar células competentes M15 Δ glyA y M15 (control) en medio selectivo (LB + ampicilina). Una vez obtenidas las transformantes, se comprobó por PCR el genotipo de las células a partir de una colonia escogida al azar (tabla 9.3 y figura 9.10).

Primers	Cepas			
	A	B	C	D
	M15 Δ glyA (pQE γ rham)	M15 Δ glyA	M15	M15 (pQE γ rham)
5PglyA-3TglyA	Banda 1:aprox. 600 bp Banda 2: 1738 bp	aprox. 600 bp	1738 bp	1738 bp

Tabla 9.3. Primers utilizados para la comprobación del genotipo glyA⁻

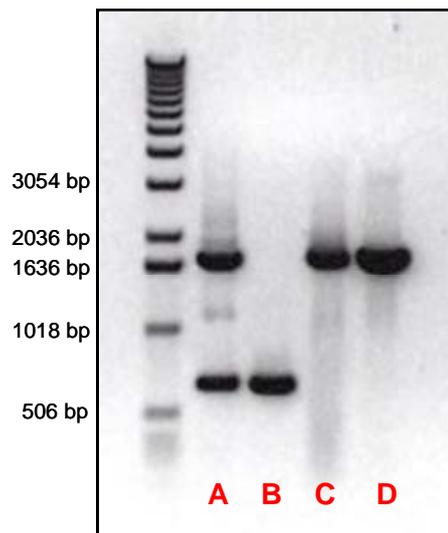


Figura 9.10. Gel de agarosa al 1%. Análisis de productos de PCR obtenidos a partir de las cepas: (A) M15 Δ glyA (pQE γ rham); (B) M15 Δ glyA; (C) M15; (D) M15 (pQE γ rham). Primers utilizados: 5PglyA-3TglyA.

Se observa que mediante PCR se puede realizar un control de genotipo de la cepa M15 Δ glyA (pQE γ rham), ya que permite verificar

- la delección cromosómica de glyA (0.6 Kb)
- el fragmento gamma (1738 bp), el cual se encuentra dentro de la secuencia del plásmido pQE γ rham.

9.4.1.1 Estudio del crecimiento de la cepa M15ΔglyA (pQE γ rham) en medio definido

El siguiente paso consistió en verificar que el plásmido de complementación pQE γ rham permitía el crecimiento de la cepa mutante M15ΔglyA en un medio definido sin glicina. Para ello, se tomó la cepa M15ΔglyA (pQE γ rham) procedente de un cultivo en medio LB con ampicilina (toda la noche, 37°C, 250 rpm) y se inoculó 1 ml en 49 ml de medio MD sin glicina (volumen final = 50 ml, 250 rpm, 37°C).

Los resultados de los cultivos de la cepa M15ΔglyA (pQE γ rham) en medio MD (figura 9.11) muestran que la complementación “gamma” permite el crecimiento de las células mutantes M15ΔglyA. Esto sugiere que el gen *glyA*, incorporado en el plásmido pQE, se está expresando, generando la actividad enzimática necesaria para la síntesis endógena de glicina. Sin embargo, se observó que la cepa mutante no era capaz de crecer en medio definido a la misma velocidad que la cepa control (M15ΔglyA pQE γ rham $\mu_{\max} = 0.3 \text{ h}^{-1}$; *E. coli* M15 pQErham $\mu_{\max} : 0.45 \text{ h}^{-1}$) y, curiosamente, le permitió obtener al final del cultivo una cantidad de biomasa mayor comparada con el control.

Una característica resaltante de los cultivos de M15ΔglyA (pQE γ rham) era la presencia de un tono amarillento en el medio. Para saber si el color se debía a la biomasa o algún componente del medio acuoso, se tomó una alícuota del cultivo y se centrifugó. Se observó que los *pellets* celulares eran los responsables del color amarillento observado y no el medio propiamente dicho.

Esta observación sugirió la posibilidad de que la SHMT, la cual posee PLP como cofactor, se estuviera sobreexpresando. Como se mencionó en el capítulo 5 (purificación de aldolasas), la presencia del cofactor PLP proporcionaba a la enzima un color amarillo característico. Para saber si la SHMT se estaba sobreexpresando, se realizó una electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) de las células M15ΔglyA (pQE γ rham). La figura 9.12 muestra una banda intensa de aproximadamente 46 kDa, la cual corresponde con el peso molecular subunidad de la SHMT nativa (Plamann and Stauffer 1983).

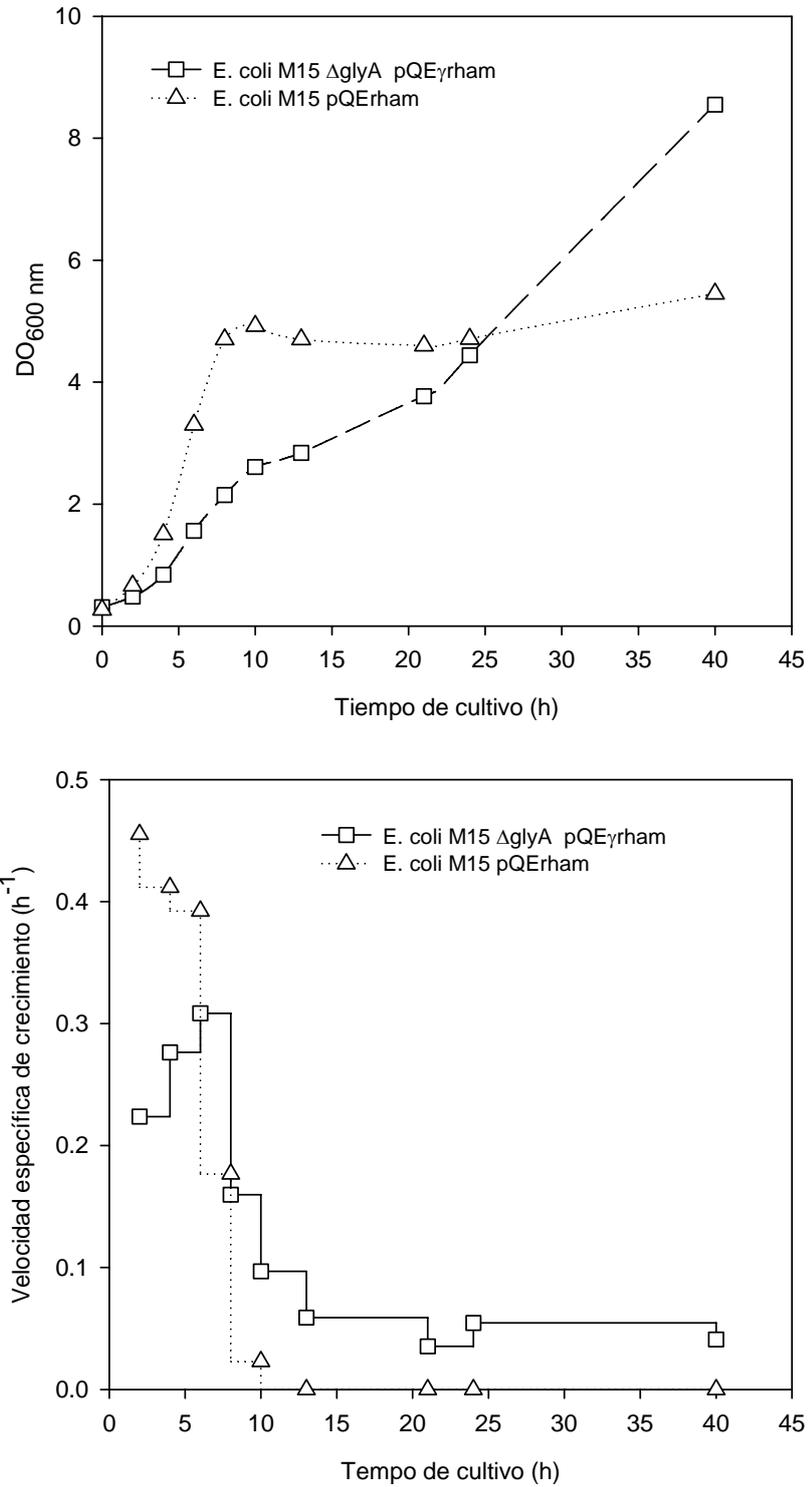


Figura 9.11. Crecimiento en Erlenmeyer de la cepa mutante M15 Δ glyA (pQE γ rham) en medio MD. Control: M15 (pQErham).

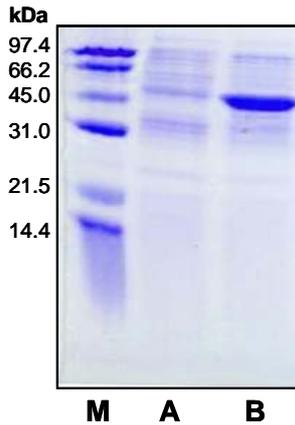


Figura 9.12. Electroforesis de proteínas por SDS PAGE (12 %). (M) Marcador de peso molecular; (A) *E. coli* M15 pQErham (control); (B) *E. coli* M15ΔglyA (pQE γ rham)

Stauffer (Stauffer et al. 1981) observó un incremento de 17 a 26 veces de la actividad SHMT en cepas transformadas con el plásmido multicopia pACYC184, el cual tenía clonado un fragmento de 13 Kb (*EcoRI*). El fragmento clonado contenía, además del gen estructural *glyA*, las regiones reguladoras de la síntesis de SHMT. De manera similar, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que, aún trabajando con un plásmido de bajo número de copias, se obtiene sobreexpresión de SHMT y que el cofactor PLP asociado a la enzima está proporcionando el color amarillo a las células.

Para tratar de identificar la causa de esta sobreexpresión, se decidió analizar de manera detallada el funcionamiento de la región promotora del gen *glyA*. La región reguladora *upstream* del gen *glyA* es un sistema complejo regulado por una serie de compuestos involucrados en el metabolismo de unidades de un carbono (C_1) (Lorenz and Stauffer 1995; Lorenz and Stauffer 1996).

Por un lado, se encuentra la proteína represora PurP, que reprime los genes que codifican las enzimas usadas en la biosíntesis de nucleótidos de purina, se une *upstream* del promotor *glyA* y reprime la expresión de *glyA* (Steiert, 1990; Steiert, 1992). Por otro lado, la proteína MetR, la cual actúa como proteína represora de los genes de las rutas biosintéticas de purinas y pirimidinas, regula negativamente el gen (Plamann and Stauffer 1989). Además, el aminoácido homocisteína, un intermediario del metabolismo de metionina, tiene un efecto positivo sobre la activación de la proteína MetR (figura 9.13).

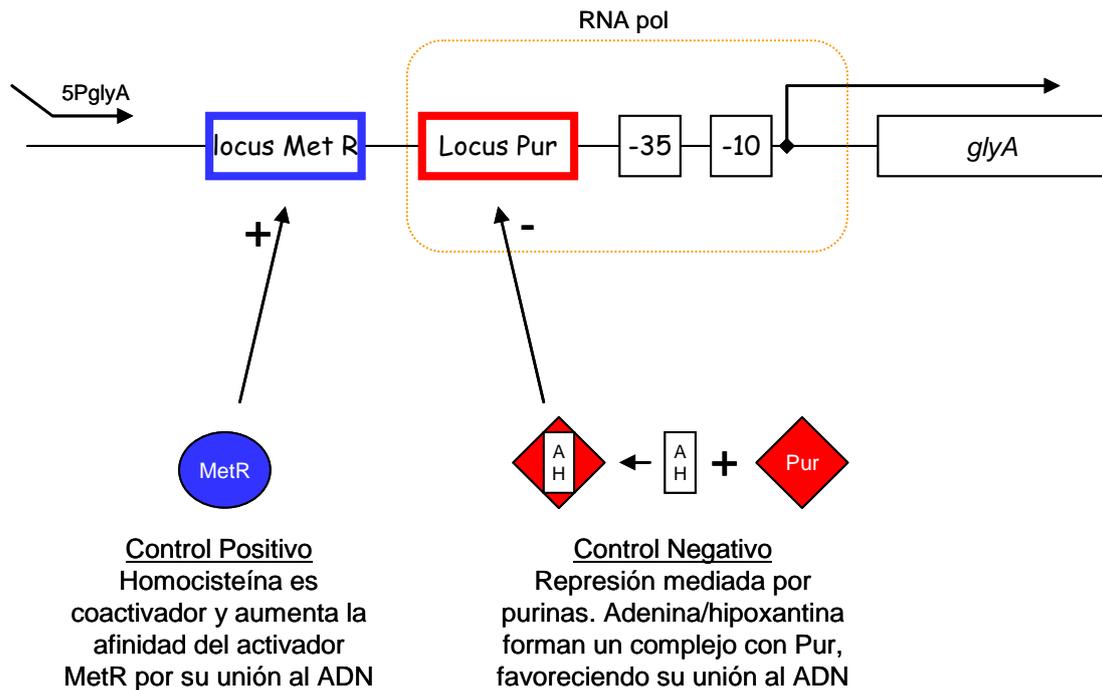


Figura 9.13. Regulación de la región promotora del gen *glyA* de *E. coli*

Previendo que la sobreexpresión de SHMT pudiera disminuir el rendimiento de la producción de la aldolasa recombinante (en el caso concreto, RhuA), se planteó la posibilidad de disminuir la expresión de *glyA* clonando en el vector pQErham un fragmento gamma más pequeño que no tuviese el locus MetR, el cual ejerce un control positivo sobre la expresión de *glyA*.

Para ello, se diseñó un nuevo primer 5PglyA(2) con una diana de restricción *MroI* para amplificar un nuevo fragmento de DNA que contendrá: locus Pur - gen *glyA* – terminador, tal como se muestra en la figura 9.14.

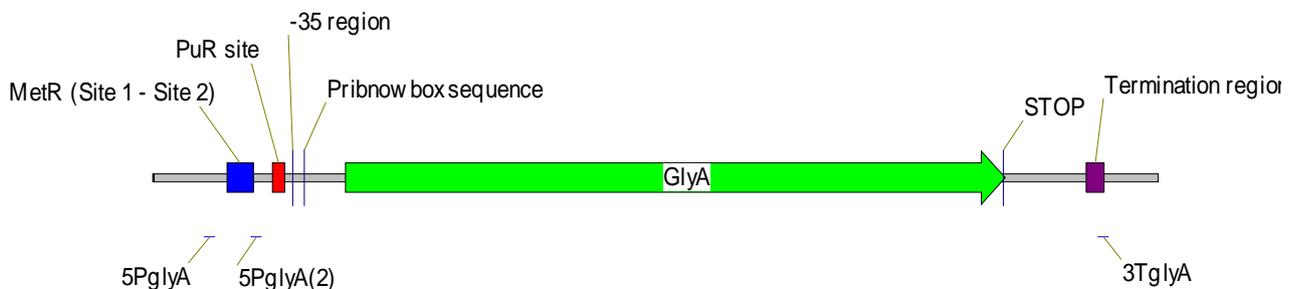


Figura 9.14. Sitios de unión de los primers 5PglyA(2), 5PglyA y 3TglyA en el DNA de *E. coli*.

Utilizando el par de primers 5PglyA(2) – 3TglyA se amplificó un fragmento de 1.6 Kb, se digirió con MroI/Xba y se clonó en el vector pQErham digerido con el mismo par de enzimas. El plásmido quimera resultante pQE γ 2rham se utilizó para transformar células *E. coli* M15 Δ glyA, seleccionando los clones positivos en medio con ampicilina. Se analizaron diferentes clones, observándose en todos un intenso color amarillo, el cual es un claro indicativo de que la SHMT se estaba sobreexpresando a pesar de la ausencia del locus de control positivo *MetR* en el plásmido. Además, el análisis por SDS-PAGE reveló la sobreexpresión de SHMT (datos no mostrados). Este resultado fue decisivo para buscar otra estrategia diferente para la expresión del gen *glyA*.

9.4.2. Basado en la utilización de un promotor constitutivo débil (P3)

9.4.2.1 Construcción del plásmido pQE $\alpha\beta$ rham

Teniendo en cuenta que el gen *glyA* no es capaz de autoregularse empleando su propio promotor y regiones reguladoras, se planteó fusionar un promotor constitutivo débil al gen *glyA*. Aunque este sistema no sería regulable, permitiría suministrar de manera constante y en pequeñas cantidades SHMT a la célula, pero suficientes para su crecimiento.

La resistencia a agentes antimicrobianos β -lactámicos en *E. coli* es mediada primariamente por β -lactamasas, las cuales hidrolizan el anillo β -lactámico, inactivando el antibiótico. Se han descrito diferentes β -lactamasas las cuales se han clasificado en cuatro grupos principales y ocho subgrupos de acuerdo a sus características funcionales y estructurales. Las enzimas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 son las principales β -lactamasas mediadas por plásmidos de bacilos gram-negativos. De los genes *bla*_{TEM}, se han reportado diferentes promotores, entre los cuales el más débil es el P3 del gen *bla*_{TEM-1A} (Lartigue et al. 2002). Este promotor está localizado en el mismo plásmido pQE40 y permite la expresión constitutiva del gen *bla*.

Para llevar a cabo la fusión entre el promotor P3 del vector pQE40 y el gen *glyA* de *E. coli*, se amplificó por PCR cada elemento por separado, denominándose

- Alpha (α): promotor P3 + primer triplete (ATG) del gen *bla*
- Beta (β): gen *glyA* de *E. coli* sin el codon de iniciación ATG

La tabla 9.4 muestra los primers utilizados para amplificar ambos fragmentos. La figura 9.15 muestra el tamaño de las bandas amplificadas por PCR.

Fragmento	Oligo	Secuencia (5'-3')	Diana	nt	%GC
Alpha (α)	5α	ATCT <u>TCCGG</u> AGTGAAGACGAAAGGGCCTCG	<i>MroI</i>	30	60
	3α	ATGTTCA <u>TTT</u> CACGC <u>TTT</u> AA <u>CATA</u> CTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGC	-	51	29
Beta (β)	5β	<u>ATTG</u> AAAAAGGAAGAGTATGTTAAAGCGTGAATGAACATTGC	-	43	35
	3TglyA	TCGG <u>CTAG</u> ATGGCGCGATAACGTAGAAAG	<i>Xba</i>	30	50

Tabla 9.4. Primers utilizados para la amplificación por PCR de los fragmentos alpha y beta. Para el primer 3 α , las bases subrayadas indican las bases complementarias al gen *glyA* (20 bp). Las bases en negrita corresponden al primer triplete (ATG) para metionina del gen *bla*. Para el primer 5 β , las bases subrayadas indican las bases complementarias al promotor P3. Tm utilizadas para ambos fragmentos: 50°C. Número de ciclos de PCR: 30.

El fragmento alpha, el cual contiene el promotor débil P3, y el fragmento beta, conteniendo el gen *glyA*, se cortaron del gel, purificaron y se fusionaron utilizando la técnica de PCR-SOE (Horton et al. 1989) según el esquema de la figura 9.15.

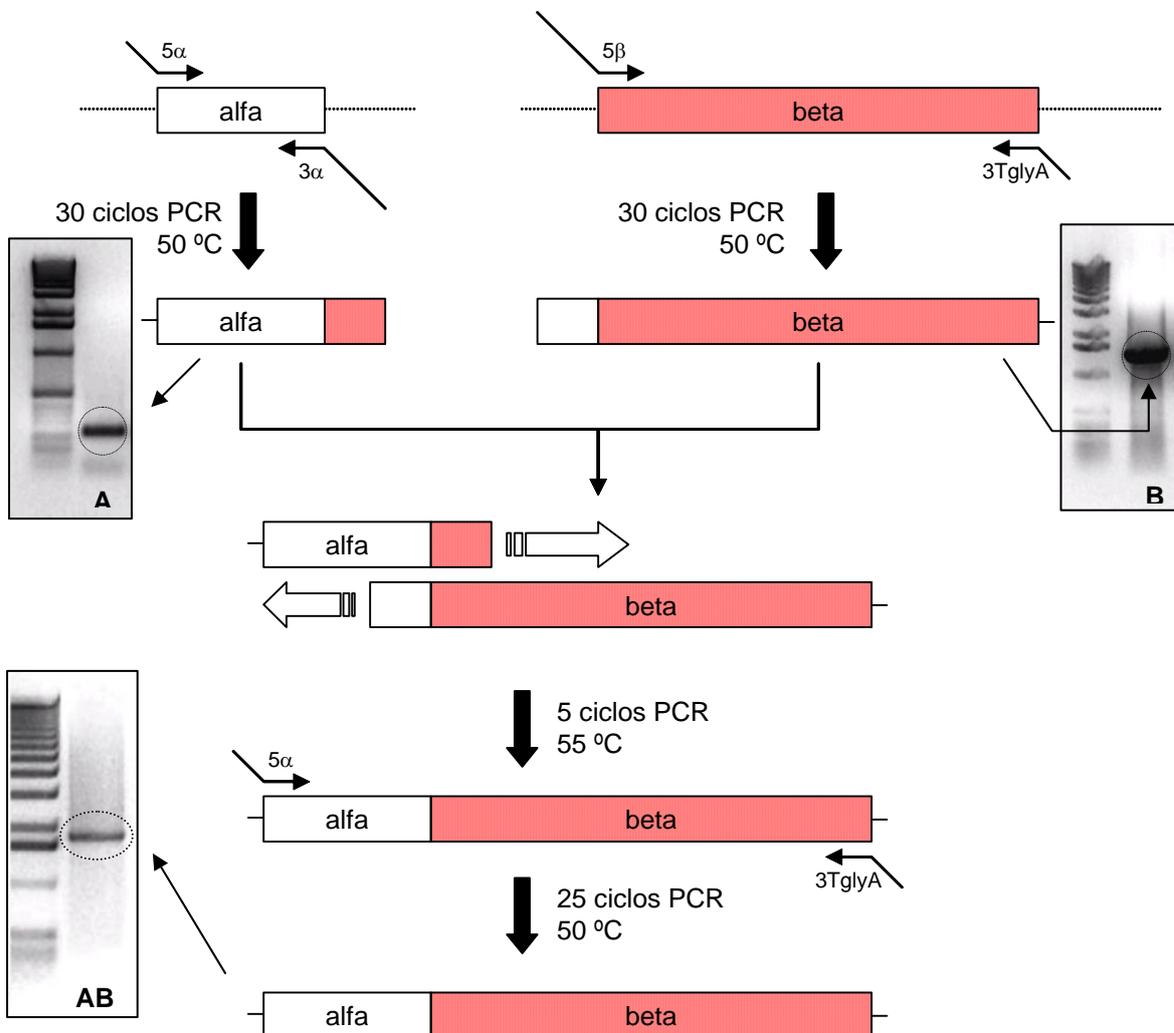


Figura 9.15. Esquema de la fusión de los frgmentos alpha/beta empleando la técnica de PCR-SOE. Las temperaturas corresponden a las temperaturas de hibridación. (A). Gel de agarosa 1.5 %. Banda de 238 bp correspondiente al fragmento alpha. (B) Gel de agarosa 1 %. Banda de 1478 bp correspondiente al fragmento beta. (AB) Gel de agarosa 1 %. (A) fragmento de 1676 bp correspondiente a la fusión de los fragmentos alfa-beta.

El fragmento de 1676 bp correspondiente a la fusión de los fragmentos alfa-beta (figura 9.15) se purificó del gel, se digirió con *Xba*/*Mro*I y se insertó en el sitio *Xba*/*Mro*I del vector pQErham, resultando el plásmido quimérico pQE $\alpha\beta$ rham (figura 9.16).

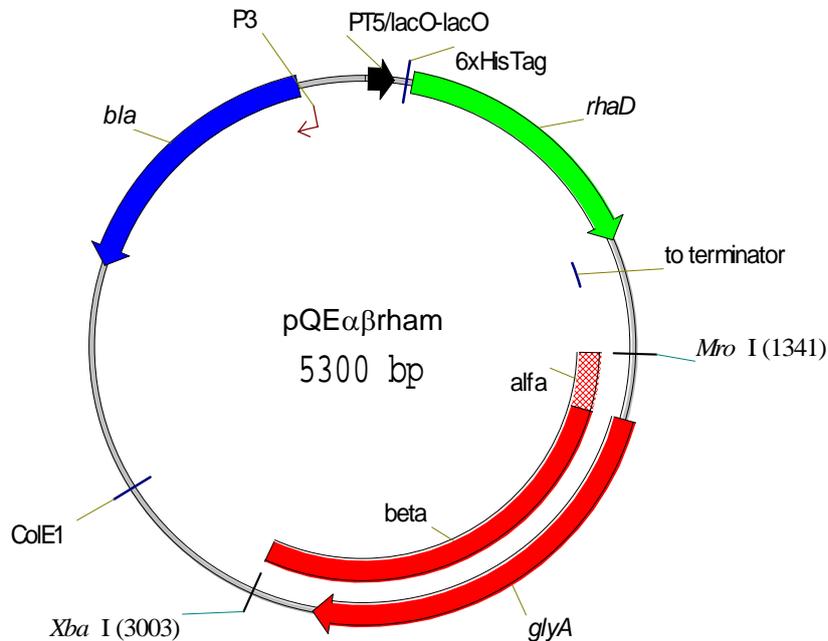


Figura 9.16. Esquema del plásmido pQE $\alpha\beta$ rham.

Las características del nuevo plásmido se resumen a continuación:

- Gen *rhaD* (ramnulosa 1-fosfato aldolasa) bajo el control del promotor T5 (reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli*) y dos secuencias operadoras *lac*
- Una secuencia 6xHis-tag en el extremo 5' del gen *rhaD*
- Dos terminadores de transcripción fuertes: t_0 del fago lambda y T1 del operón *rrnB* de *E. coli*
- Un gen *bla* (β -lactamasa) que le confiere resistencia a ampicilina.
- Un origen de replicación ColE1.
- Gen *glyA* que codifica para la serina hidroximetil transferasa (SHMT) bajo el control del promotor constitutivo P3.

9.4.2.2. Estudio preliminar del crecimiento de la cepa M15 Δ glyA (pQE α β rham) en medio definido

El plásmido pQE α β rham se utilizó para transformar la cepa mutante auxotrófica para glicina *E. coli* M15 Δ glyA. Además, se transformó con el nuevo vector la cepa M15 como control. Una vez obtenido las cepas recombinantes, se procedió a estudiar su cinética de crecimiento en medio definido. A partir de un cultivo de la cepa M15 Δ glyA (pQE α β rham) en medio LB con ampicilina (toda la noche, 37°C, 250 rpm), se tomó 3.5 ml para inocular en 46.5 ml de medio MD (volumen final = 50 ml, 250 rpm, 37°C) de forma que el inóculo con medio complejo (LB) represente el 7 % y la aportación de glicina al medio definido sea mínima. Paralelamente se realizó un cultivo control con la cepa M15 pQErham (pREP4).

Los resultados de los cultivos de la cepa M15 Δ glyA (pQE α β rham) y de los respectivos controles en medio definido se muestran en la figura 9.17

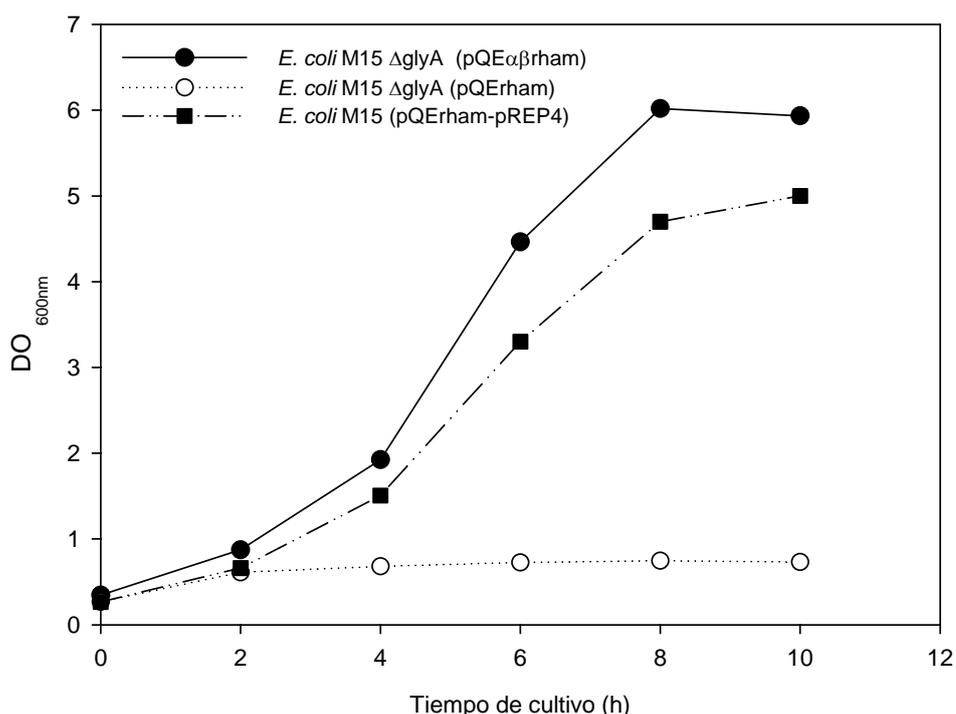


Figura 9.17. Cultivo en Erlenmeyer con medio MD de diferentes cepas de *E. coli* recombinantes. Temperatura de cultivo: 37°C. Agitación 250 rpm.

Los resultados de la figura 9.17 muestran que la presencia del plásmido quimera pQE α β rham en la cepa auxotrófica para glicina M15 Δ glyA permite el crecimiento de la bacteria mutante en un medio MD, mientras que el plásmido pQErham no permite sostener su crecimiento.

Además, el crecimiento alcanzado es similar al de la bacteria *E. coli* M15 pQErham (control). La diferencia de biomasa obtenida entre *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) y *E. coli* M15 Δ glyA (pQErham) puede ser atribuida a la diferente capacidad de transferencia de oxígeno del sistema debido al empleo de Erlenmeyers con baffles en el primer caso, mientras que para la segunda no se incluyeron.

Este experimento demuestra que el gen *glyA*, bajo el control del promotor constitutivo débil P3, se está expresando, proporcionando cantidades de SHMT capaces de catalizar la vía metabólica de degradación de treonina y así, obtener una fuente endógena de glicina.

9.5 Estudio de la expresión de RhuA en la cepa recombinante *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham)

Una vez confirmada la capacidad de crecimiento de la cepa mutante M15 Δ glyA con el plásmido de complementación pQE $\alpha\beta$ rham en un medio definido sin glicina, se analizaron las proteínas intracelulares por SDS-PAGE para determinar el nivel de expresión de SHMT. Paralelamente, se estudió el crecimiento y la capacidad de sobreexpresar RhuA en presencia de IPTG de la nueva cepa recombinante (figura 9.17).

Para ello, se realizaron cultivos en Erlenmeyer con medio definido, induciendo en mitad de la fase exponencial de crecimiento (concentración final de IPTG = 50 μ M). Para asegurar el máximo de expresión de RhuA (80 % en 2 horas en discontinuo a 30°C), se incubó aproximadamente durante 5 horas después de la inducción. Luego, se analizaron las proteínas intracelulares por SDS-PAGE (figura 9.18), así como la actividad de RhuA de cada muestra (figura 9.19).

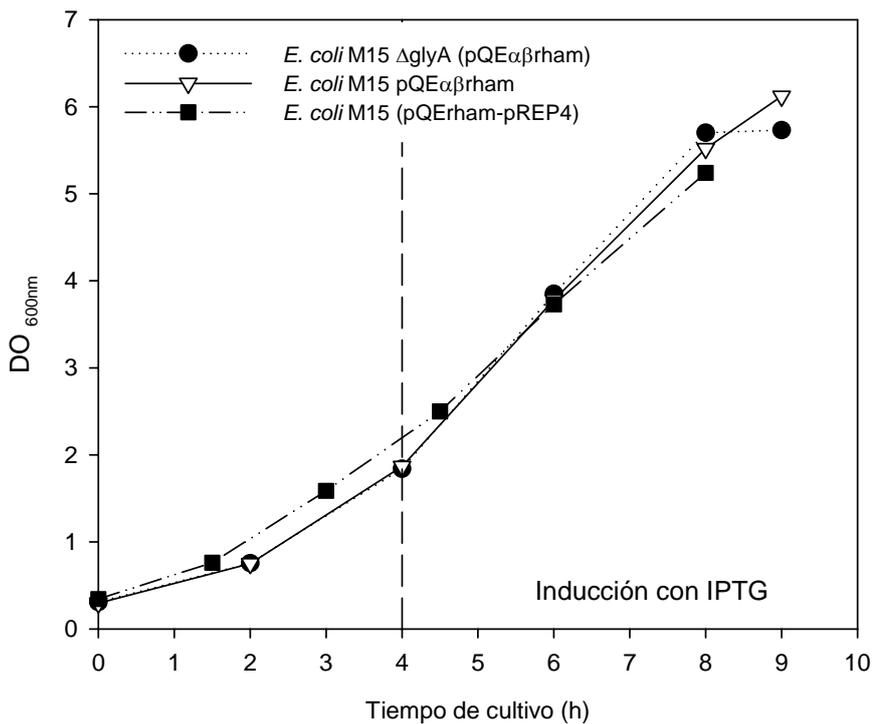


Figura 9.17. Cultivo en Erlenmeyer con medio MD de diferentes cepas de *E. coli* recombinantes. Temperatura de cultivo: 37°C. Agitación 250 rpm. Inducción: 50 μ M IPTG (concentración final). Temperatura de cultivo en la inducción: 30°C

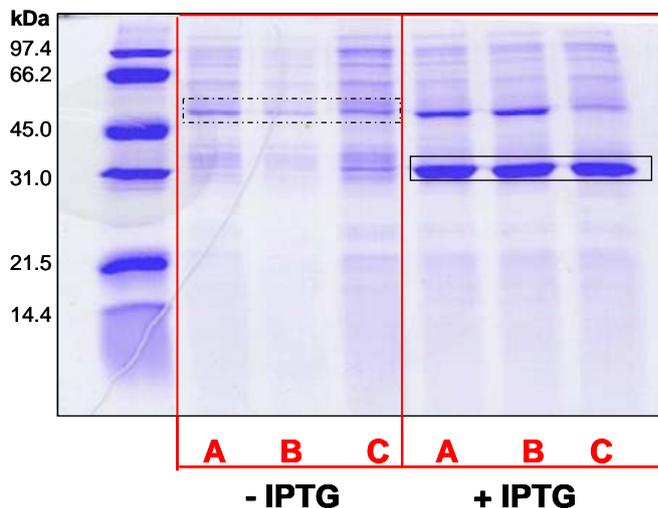


Figura 9.18. SDS-PAGE al 12 % de de proteínas intracelulares de:

- A: *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham)
- B: *E. coli* M15 (pQE $\alpha\beta$ rham)
- C: *E. coli* M15 pQErham – pREP4

Las células se ajustaron a una DO = 3 y se sonicaron según protocolo estandar. La banda dentro del rectángulo con línea punteada corresponde a SHMT (45 kDa aproximadamente). La banda dentro del rectángulo de línea sólida corresponde a RhuA (kDa)

La figura 9.18 muestra que las células de *E. coli* no inducidas que poseen el plásmido pQE $\alpha\beta$ rham no muestran una banda significativa de expresión de SHMT (45 kDa), comparándose el nivel de intensidad de la banda con el control (M15 pQErham). Sin embargo, una vez inducidas, hay una pequeña sobreexpresión de SHMT, posiblemente

por un efecto de sobrelectura de la RNAPol sobre el terminador de transcripción t_0 del gen *rhaD'*, produciéndose un fenómeno de “*read-through*”. Esto no pareció afectar la expresión de la proteína RhuA, ya que la intensidad de las bandas obtenidas son similares al control (*E. coli* M15 pQErham – pREP4).

La cuantificación de la actividad RhuA (figura 9.19) muestra que los valores de actividad específica son ligeramente más bajos (13 %) en las cepas con el plásmido de complementación pQE $\alpha\beta$ rham comparado con el control. Este efecto pudiera ser debido a que la ligera sobreexpresión de SHMT disminuyera la capacidad energética de las células para sintetizar RhuA.

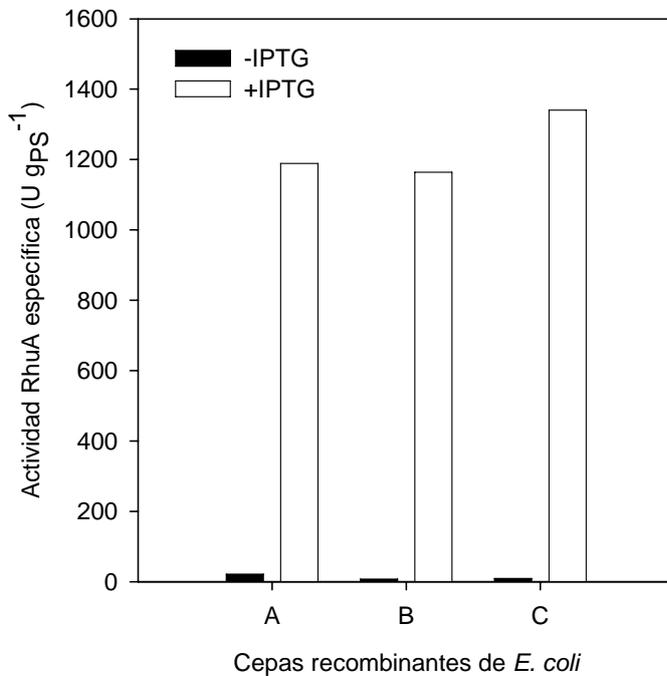


Figura 9.19. Niveles de actividad específica en cultivos en Erlenmeyer com medio MD de:

- A: *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham)
- B: *E. coli* M15 (pQE $\alpha\beta$ rham)
- C: *E. coli* M15 (pQErham – pREP4)

Factor teórico de conversión DO/biomasa utilizados: 0.37 (células sin inducir); 0.26 (células inducidas)

9.5 Estudio del crecimiento de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) en cultivos en semicontinuo

En el capítulo 8 se destacó que el nivel de actividad específica de RhuA en cultivos en semicontinuo era relativamente más bajo que el obtenido para cultivos en discontinuo a una misma concentración de IPTG. Una de las hipótesis que se argumentó como causa de esta diferencia era la inestabilidad plasmídica que se puede generar cuando se realizan cultivos dirigidos a la obtención de altas concentraciones celulares (CADC), en parte debido a la degradación del antibiótico utilizado como marcador de selección.

En base a ello, se diseñó una estrategia que tenía como objetivo principal garantizar una segregación plasmídica eficiente durante el crecimiento en medios definidos, independiente del uso de antibióticos como marcadores selectivos de presión. La estrategia seleccionada tenía como base la necesidad, por parte de las células, de complementar las carencias genéticas directas, y fisiológicas indirectamente, a través de la información contenida en elementos extracromosomales. Luego, en células donde el aminoácido glicina representa un elemento esencial debido a una mutación del gen de su ruta de síntesis, la incorporación de un plásmido capaz de expresarlo correctamente permitiría a la célula disponer de una fuente para abastecerse de glicina, elemento esencial para la síntesis de proteínas.

Para ello, se diseñó un sistema en el cual, la capacidad de crecimiento de una célula auxotrófica para glicina (M15 Δ glyA) en un medio definido estaría en función de la presencia de un plásmido (pQE α β rham) que complementaría la deficiencia cromosomal de la célula. En este sentido, la construcción del plásmido pQE α β rham demostró complementar la deficiencia cromosómica del gen *glyA*, permitiendo el crecimiento de las células M15 Δ glyA en un medio definido.

Teóricamente, la estabilidad plasmídica de cultivos de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) en medios definidos sin glicina sería cercana al 100 %. Luego, si las diferencias obtenidas en los niveles actividad específica entre cultivos en discontinuo y semicontinuo son producto de inestabilidad plasmídica, el nuevo sistema diseñado permitiría minimizar estas diferencias, incrementando los niveles de actividad específica a niveles comparables a los obtenidos en discontinuo.

Para verificar esta hipótesis, se realizaron cultivos de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) utilizando la misma estrategia de cultivo en semicontinuo para la obtención de CADC, con la diferencia de que no se utilizaron antibióticos como mecanismos de presión selectiva para el mantenimiento del plásmido.

9.5.1. Valoración de la cepa *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) en un cultivo a $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$

La figura 9.20 y 9.21 muestran los resultados de la fermentación de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) empleando la estrategia de alimentación exponencial, sin antibióticos y fijando una velocidad de crecimiento de 0.3 h^{-1} . Los valores de los parámetros introducidos en el programa de control de adición del alimento fueron los mismos que para la cepa *E. coli* M15 (pQErham).

El argumento utilizado para mantener el mismo valor de rendimiento aparente ($Y_{X/S} = 0.385 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$) radica en el mismo microorganismo utilizado sigue siendo M15, y que las modificaciones genéticas introducidas a nivel cromosómico son mínimas. Por otro lado, es posible que la expresión constitutiva de SHMT por parte del plásmido modifique los requerimientos energéticos de la bacteria. Sin embargo, como una primera aproximación, se tomaron los mismos valores que para la cepa inicial.

Durante la fermentación, el suministro de oxígeno se interrumpió accidentalmente (14 h), sin embargo, los datos anteriores a este incidente permitieron tener una idea del funcionamiento de la cepa en las condiciones de operación fijadas.

Los datos experimentales sugieren que los coeficientes del modelo teórico utilizados para el programa de adición de alimento se han modificado ligeramente (aproximadamente 7 %). Actualmente, J. Pinsach, estudiante doctoral del grupo de investigación de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada del Departamento de Ingeniería Química de la UAB, se encuentra trabajando en la optimización de este nuevo sistema, ajustando los nuevos parámetros para obtener un modelo matemático de crecimiento y producción con el objetivo de optimizar la producción de RhuA.

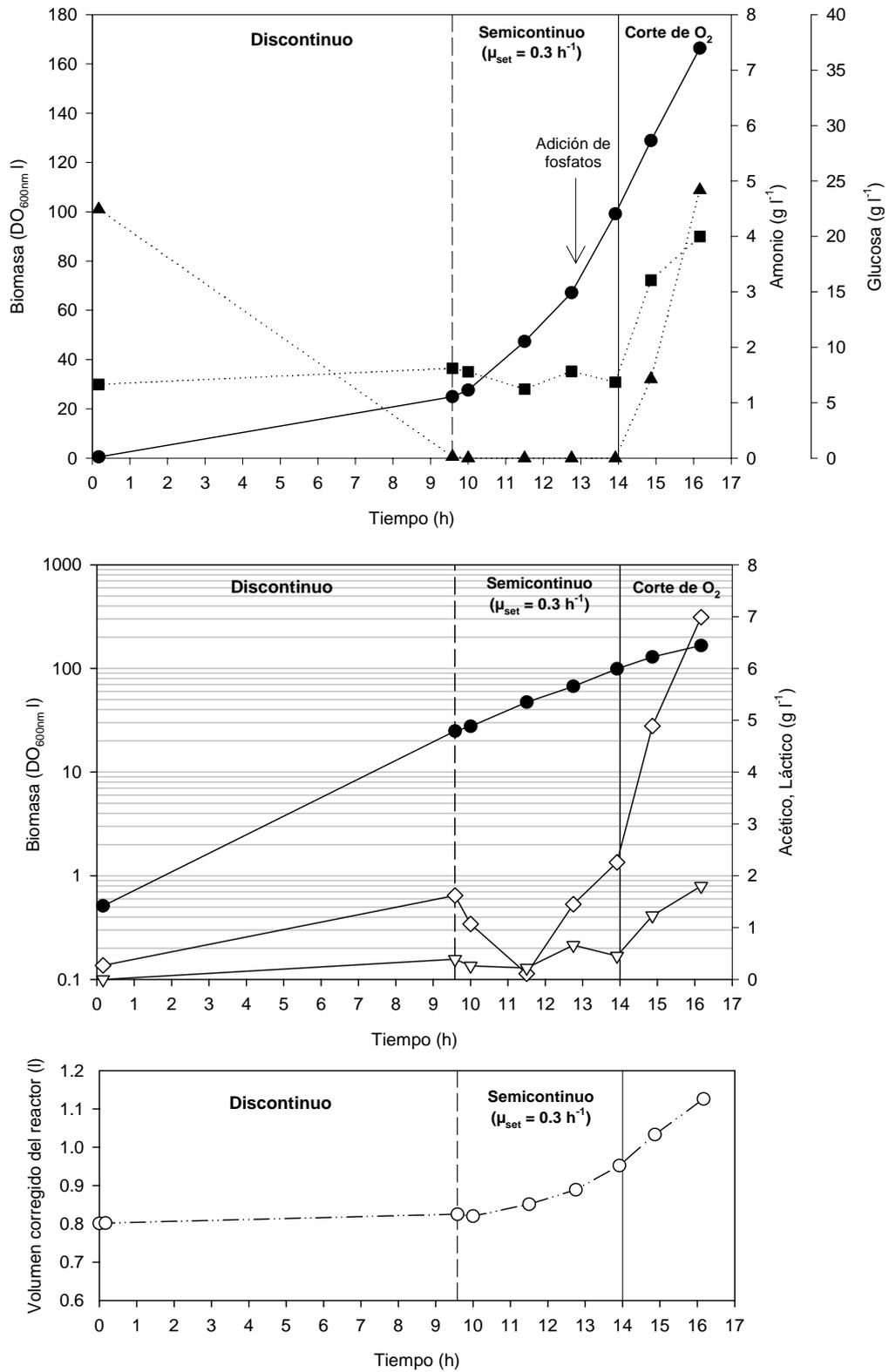


Figura 9.20. Evolución de una fermentación de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) en medio MD sin antibióticos a $\mu_{set} = 0.3 \text{ h}^{-1}$. (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Láctico (g l^{-1}). Volumen del reactor corregido (○). Al tiempo 14 h se interrumpió de forma accidental el suministro de oxígeno. Adición de fosfatos puntuales: 4.1 g c/u.

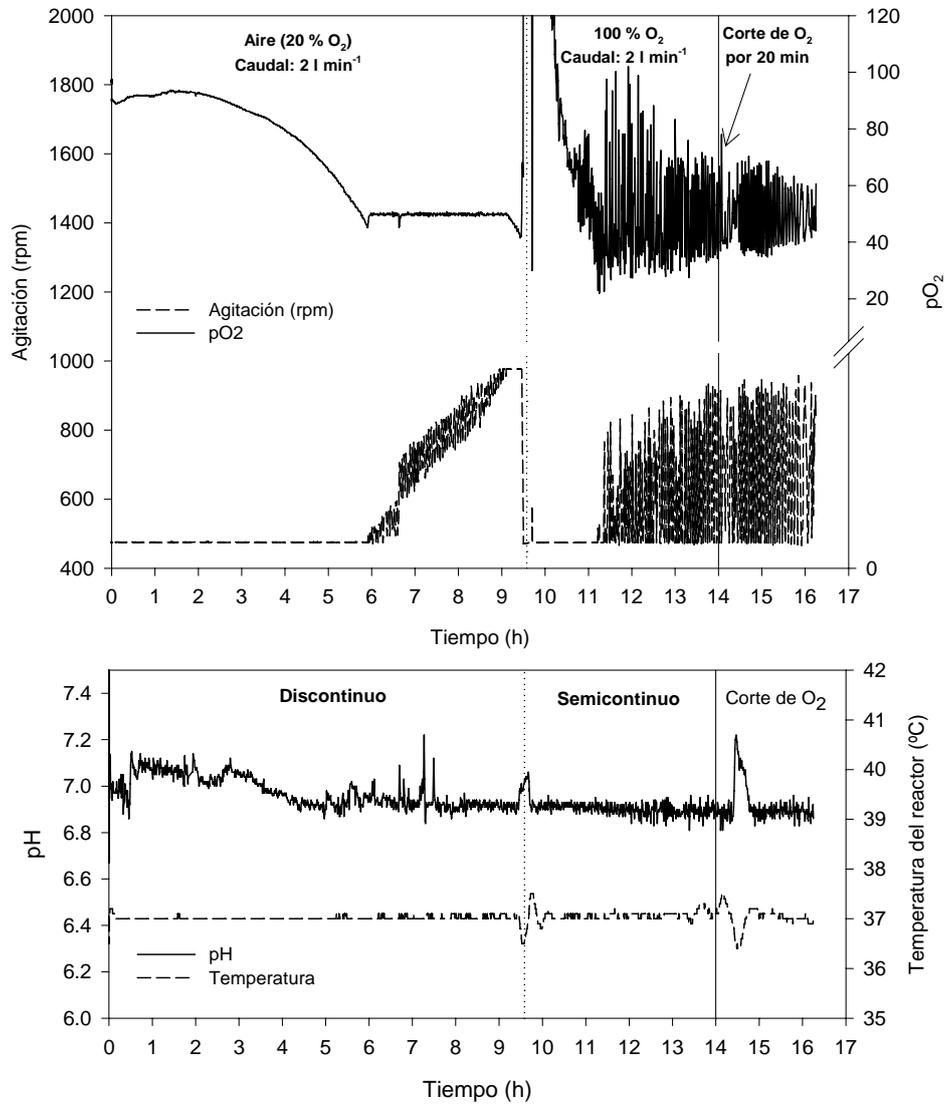


Figura 9.21. Perfil de agitación, concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura del reactor durante la fermentación de *E. coli* M15ΔglyA (pQEαβrham) en medio MD sin antibióticos a $\mu_{set} = 0.3 \text{ h}^{-1}$. Al tiempo 14 h se interrumpió de forma accidental el suministro de oxígeno.

Un dato resaltante sobre este ensayo es que se obtuvo una alta concentración de ácido acético (2.3 g l⁻¹; tiempo: 13.9 h) a la velocidad de crecimiento experimental promedio calculada ($\mu_{exp} = 0.33 \text{ h}^{-1}$). Comparando la cantidad de acético por gramo de biomasa obtenida en la fermentación, vemos que el la cifra es muy elevada, indicando que, a velocidades de crecimiento similares, la cepa *E. coli* M15ΔglyA (pQEαβrham) genera mayor cantidad de acético que la cepa *E. coli* M15 (pQErham) (tabla 9.5).

Este resultado puede generar dificultades a la hora de alcanzar valores superiores de biomasa, ya que si el cultivo sobrepasa el valor límite de acético de 5 g l⁻¹, se podría observar una inhibición del crecimiento y por consiguiente, se obtendrían menores valores de biomasa que los esperados y disminuiría la productividad de RhuA. Por ello, se decidió repetir el experimento a una velocidad de crecimiento menor ($\mu_{set} = 0.2 \text{ h}^{-1}$) con el fin de minimizar la producción de acético y lograr CADC.

Cepa	$\mu_{exp} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Biomasa ^a final (g _{PS} l ⁻¹)	Acetato final (g l ⁻¹)	% Relación Acetato/Biomasa
<i>E. coli</i> M15 (pQErham)	0.107	95.4	0.0	0.0
	0.23	91.6	0.0	0.0
	0.36	95.1	1.25	1.3
<i>E. coli</i> M15ΔglyA (pQEαβrham)	0.33	38.6	2.26	5.9

Tabla 9.5. Comparación de la relación acetato/biomasa entre cultivos en semicontinuo de *E. coli* M15 (pQErham) y *E. coli* M15ΔglyA (pQEαβrham). ^a Factor DO/biomasa = 0.37

9.5.2. Valoración de la cepa *E. coli* M15ΔglyA (pQEαβrham) en un cultivo a $\mu_{set} = 0.2 \text{ h}^{-1}$

La figura 9.22 y 9.23 muestran los resultados de la fermentación de *E. coli* M15ΔglyA (pQEαβrham) empleando la estrategia de alimentación exponencial, sin antibióticos y fijando una velocidad de crecimiento de 0.2 h⁻¹. Los valores de los parámetros introducidos en el programa de control de adición del alimento fueron los mismos que para la cepa *E. coli* M15 (pQErham). El objetivo de este experimento era operar a una velocidad menor de crecimiento para tratar de disminuir la producción de acético de *E. coli* M15ΔglyA (pQEαβrham) y lograr incrementar la biomasa sin llegar a niveles inhibitorios de acetato. Por otro lado, el cultivo podría inducirse con IPTG si se alcanzaban valores de DO_{600nm} mayores de 150 para evaluar la el potencial de la nueva cepa para sobreexpresar RhuA.

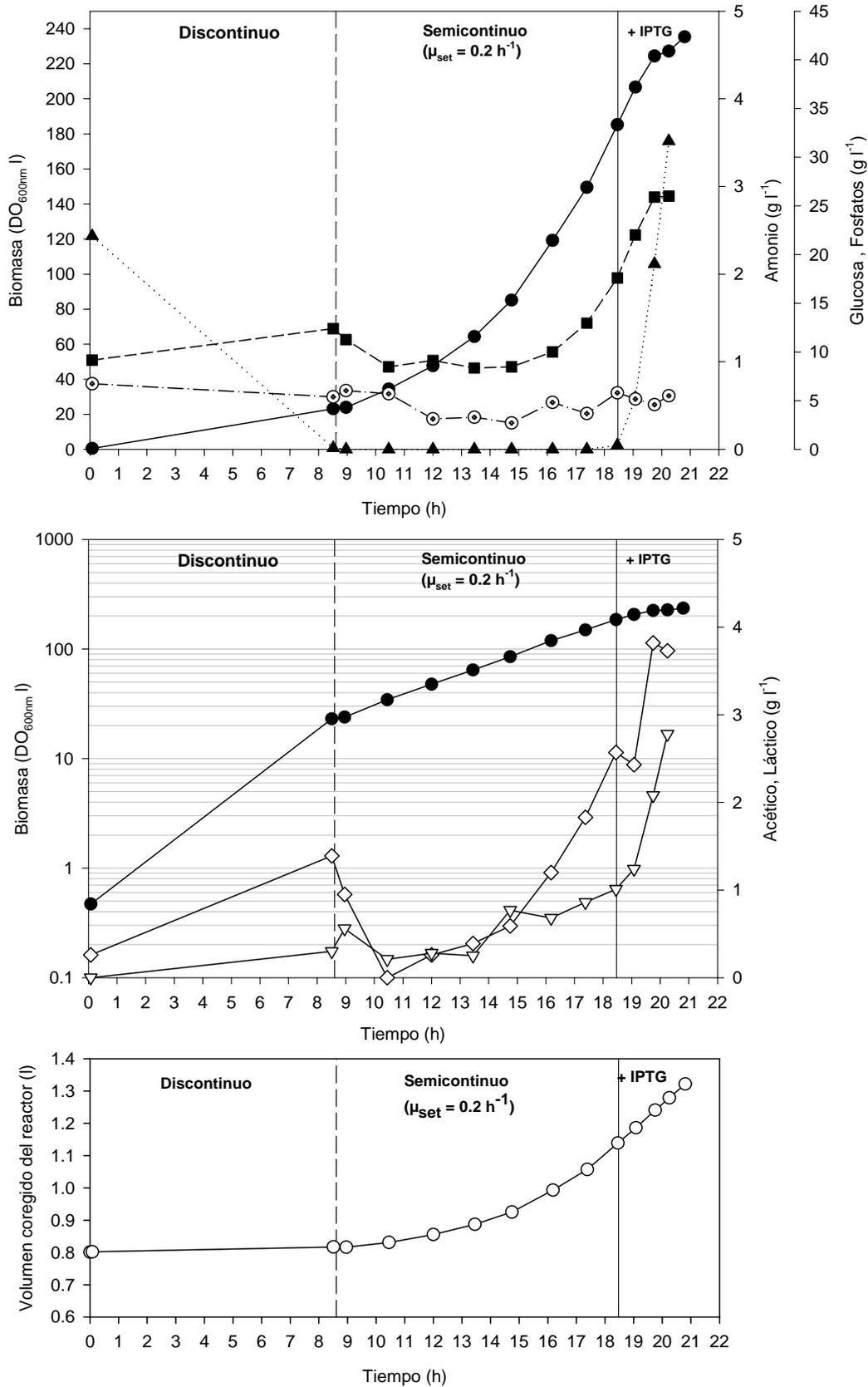


Figura 9.22. Evolución de una fermentación de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rh α m) en medio MD sin antibióticos a $\mu_{set} = 0.2 \text{ h}^{-1}$. $Y_{X/S} = 0.363 \text{ g g}^{-1}$ (●) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (▲) Glucosa (g l^{-1}); (⊕) Fosfatos (g l^{-1}); (■) Amonio (g l^{-1}); (◇) Acetato (g l^{-1}); (▽) Láctico (g l^{-1}); (○) Volumen del reactor corregido. Inducción a las 18.5 h. Concentración final de IPTG: 150 μM . Adición de 10 mg de Zn^{2+} a las 17 h. Adición de fosfatos puntuales: a) 4.1 g/c/u a los tiempos 14.9 h y 17.8 h; b) 2.05 g al tiempo 20.2 h.

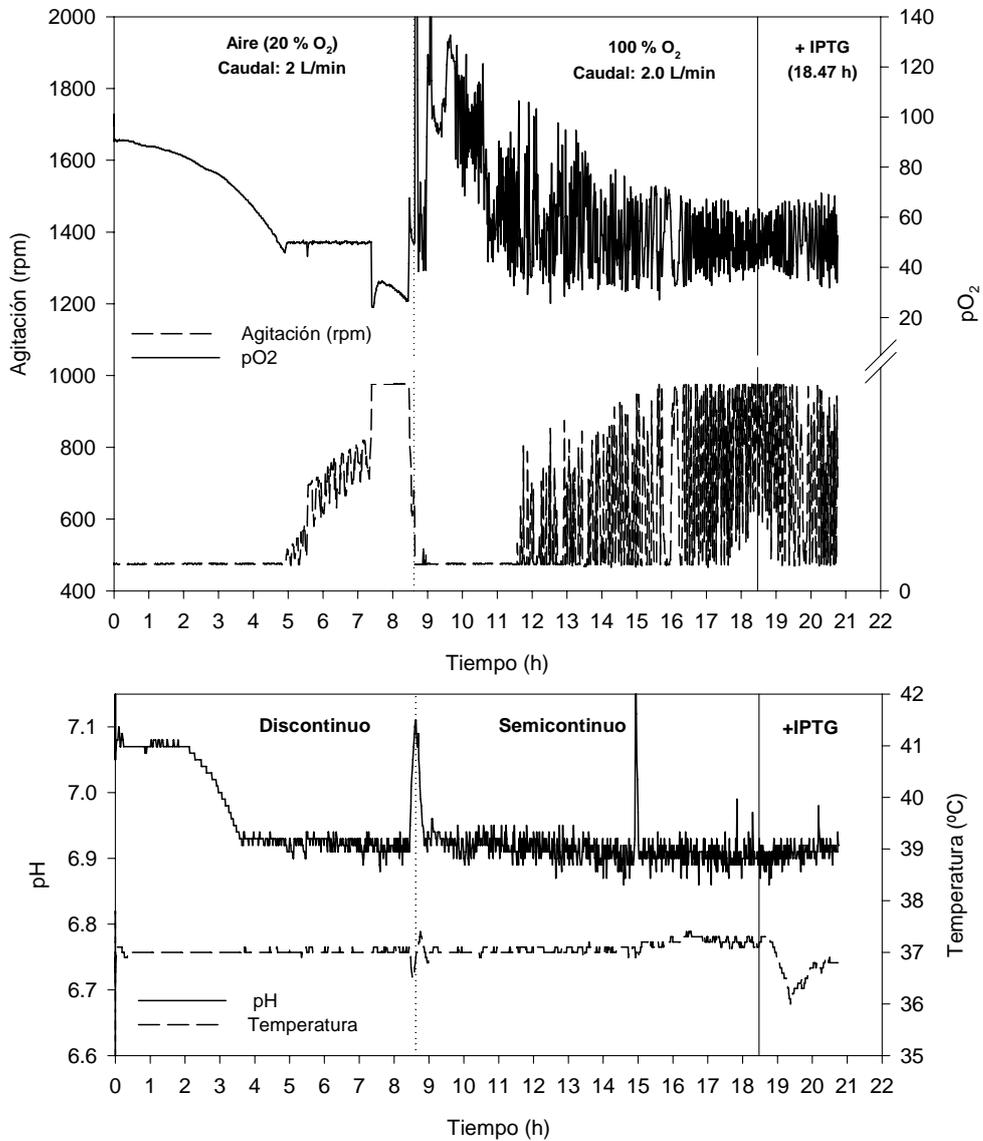


Figura 9.23. Perfil de agitación, concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura del reactor durante la fermentación de *E. coli* M15ΔglyA (pQEαβrham) en medio MD sin antibióticos a $\mu_{set} = 0.2 \text{ h}^{-1}$. Inducción a las 18.5 h. Concentración final de IPTG: 150 μM .

Basándonos en la ecuación que describe el rendimiento aparente de un microorganismo:

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{\gamma_{X/S}} + m_S \cdot \frac{1}{\mu_{\text{exp}}}$$

Y extrapolando los valores de los coeficientes para *E. coli M15*

$$\gamma_{X/S} = 0.439 \text{ gX gS}^{-1}$$

$$m_S = 0.095 \text{ gS (gX}\cdot\text{h)}^{-1}$$

Para una velocidad de crecimiento $\mu_{\text{set}} = 0.2 \text{ h}^{-1}$ con la cepa *E. coli M15ΔglyA* (pQEαβrham), el nuevo valor del rendimiento aparente resulta en $Y_{X/S} = 0.363 \text{ g g}^{-1}$. Este valor se introdujo en el programa para tratar de mantener la velocidad de crecimiento constante durante la etapa semicontinua del cultivo.

Los resultados obtenidos a partir del cultivo a $\mu_{\text{set}} = 0.2 \text{ h}^{-1}$ se detallan resumen a continuación:

Etapa discontinua

- Para una concentración de glucosa inicial de 21.9 g l^{-1} , esta etapa tuvo una duración de 8.5 horas, una velocidad de crecimiento máxima de 0.46 h^{-1} , y un rendimiento aparente de biomasa/glucosa de $0.47 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$.
- El suministro de aire (2 vvm) fue suficiente para mantener una concentración de oxígeno disuelto por encima del 20 %.
- También se observó un incremento brusco en el pH desde 6.95 (límite inferior fijado a través de la unidad de control del fermentador) hasta 7.05 (límite superior) al final de la etapa, el cual coincide con el agotamiento de glucosa en el medio.
- El consumo de amonio (fuente de nitrógeno) es equivalente a la cantidad de amonio suministrada por la base (NH_4OH), por lo que los niveles no se modifican significativamente al final de esta etapa (aproximadamente 1 g l^{-1}).
- La concentración final de ácido acético al final de esta etapa fue de 1.4 g l^{-1} , el cual se encuentra por debajo de los niveles inhibitorios del crecimiento.

Etapa semicontinua (no inducida)

- El incremento del pH, como consecuencia del agotamiento de glucosa durante la etapa discontinua, sirvió como indicador para comenzar la adición del alimento a través de la microbureta controlada por el programa de adición.

- b. La concentración de glucosa en el medio de cultivo se mantuvo en cero durante la etapa semicontinua antes de la inducción, por lo que se cumple la condición de limitación del crecimiento por disponibilidad del sustrato.
- c. La cantidad de NH_4OH añadido al cultivo a través del control de pH es suficiente para, por un lado, controlar el pH dentro del intervalo fijado (7.00 ± 0.05), y por otro, sustentar el crecimiento del microorganismo. Sin embargo, se observó una tendencia a aumentar la concentración de NH_4^+ en el medio, alcanzando una concentración de 2 g l^{-1} antes de la inducción.
- d. Se realizaron adiciones puntuales de fosfatos para evitar la depleción de fósforo. Los coeficientes de rendimiento calculados para amonio y fosfato a partir de lo datos experimentales durante la etapa semicontinua no inducida son: $Y_{X/\text{NH}_4^+} = 6.8 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$ y $Y_{X/\text{PO}_4^{2-}} = 3.7 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ g}^{-1}$
- e. Para mantener una concentración de oxígeno disuelto alrededor del 50 % fue necesario suministrar oxígeno puro desde el inicio de la etapa semicontinua (figura 9.23).
- f. Los datos obtenidos entre el inicio del cultivo semicontinuo (8.6 h) hasta las 18.5 h (tiempo de inducción) permitieron calcular los rendimientos aparentes y la velocidad promedio de crecimiento durante el cultivo semicontinuo (tabla 9.6). Se observa que tanto la velocidad de crecimiento como el rendimiento experimental se aproximan a los valores teóricos, aunque con una ligera desviación (aproximadamente 6 %)

$(Y_{x/s})_{\text{set}}$	$\mu_{\text{set}} (\text{h}^{-1})$	$(Y_{x/s})_{\text{exp}}$	$\mu_{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	Biomasa ^a ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$)	Tiempo (h)
0.363	0.20	0.393	0.21	38.6	9.6 - 14.0

Tabla 9.6. Rendimiento aparente y velocidad de crecimiento experimental obtenidos en el cultivo de la cepa *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) en semicontinuo entre 8.6 h y 18.5h. ^a Factor DO/biomasa = 0.37

- g. La concentración de acético obtenida antes de la inducción (2.5 g l^{-1}) fue inferior a la concentración inhibitoria del crecimiento ($5 \text{ g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$), lo que permitió: i) inducir el cultivo y, ii) continuar el crecimiento. Por otro lado, la concentración de ácido láctico alcanzó valores de 1 g l^{-1} antes de la inducción, lo cual no se observaba en la cepa original *E. coli* M15 (pQErham). La tabla 9.7 y la figura 9.24 muestran una comparación de la producción de acético de la cepa *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) a diferentes velocidades de crecimiento. Se observa que operando a una velocidad de crecimiento

menor (0.2 h^{-1}) se logra disminuir la producción de acético comparado a una operación a $\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$.

Cepa	$\mu_{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	Biomasa ^a ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$)	Acetato (g l^{-1})	% Relación Acetato/Biomasa
<i>E. coli</i> M15 Δ glyA (pQE α β rham)	0.21	60.1	2.57	4.3
<i>E. coli</i> M15 (pQErham)	0.33	38.6	2.26	5.9

Tabla 9.7. Comparación de la relación acetato/biomasa entre cultivos en semicontinuo de *E. coli* M15 (pQErham) y *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) en condiciones de no inducción. ^a Factor DO/biomasa = 0.37. La biomasa se calculó en base al valor de DO obtenido antes de la inducción

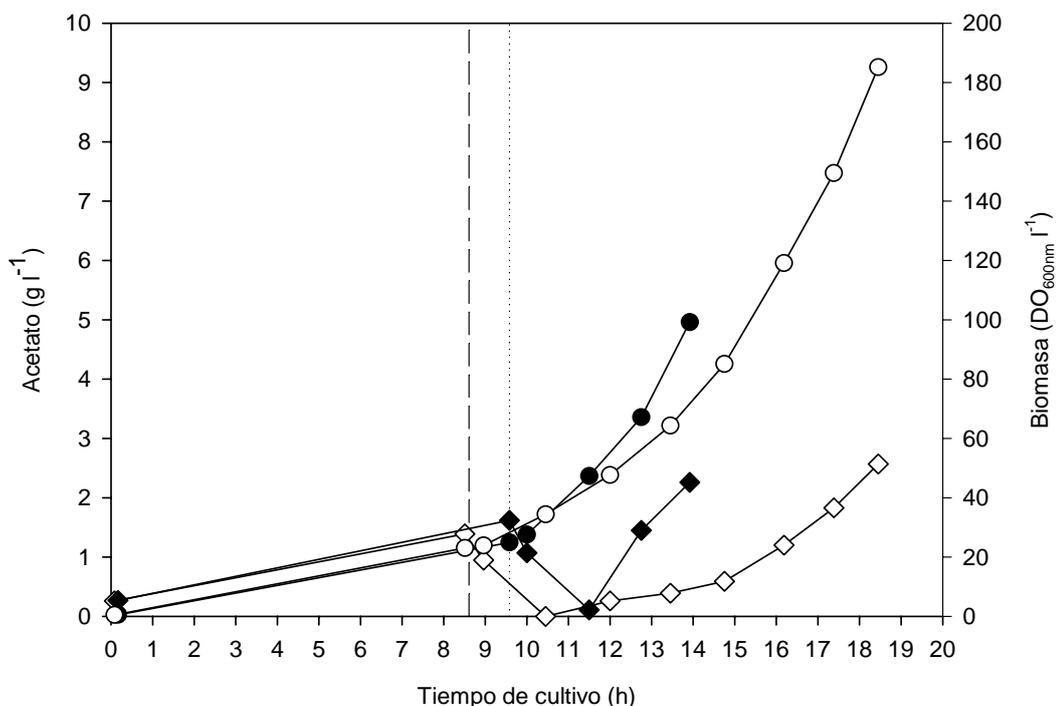


Figura 9.24. Comparación del crecimiento y la producción de acético de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham) en medio MD sin antibióticos sin inducir. Figuras negras $\mu_{\text{exp}} = 0.21 \text{ h}^{-1}$; Figuras vacías: $\mu_{\text{exp}} = 0.327 \text{ h}^{-1}$. (● - ○) Biomasa ($\text{g}_{\text{PS}} \text{ l}^{-1}$); (◊ - ◇) Acetato (g l^{-1}). Inicio de etapa semicontinua: 8.6 ($\mu_{\text{exp}} = 0.21 \text{ h}^{-1}$) y 9.6 h ($\mu_{\text{exp}} = 0.327 \text{ h}^{-1}$).

Etapa semicontinua (inducida)

El cultivo se indujo durante 2.3 h con una concentración final de IPTG 150 μM . Este tiempo se consideró suficiente para obtener más del 80 % de la actividad específica que la célula permite (capítulo 7). Por otro lado, esta concentración es la que proporcionó resultados más elevados de actividad específica en los cultivos en semicontinuo con la cepa *E. coli* M15 (pQErham).

Al igual que se realizó con la fermentaciones de *E. coli* M15 (pQErham), se calculó experimentalmente el factor de conversión DO/biomasa, obteniéndose un factor de 0.33. Este resultado se utilizó para calcular los valores de actividad específica de RhuA. La figura 9.25 muestra el perfil de actividad específica obtenidos con la cepa *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) operando a una $\mu_{\text{exp}} = 0.21 \text{ h}^{-1}$

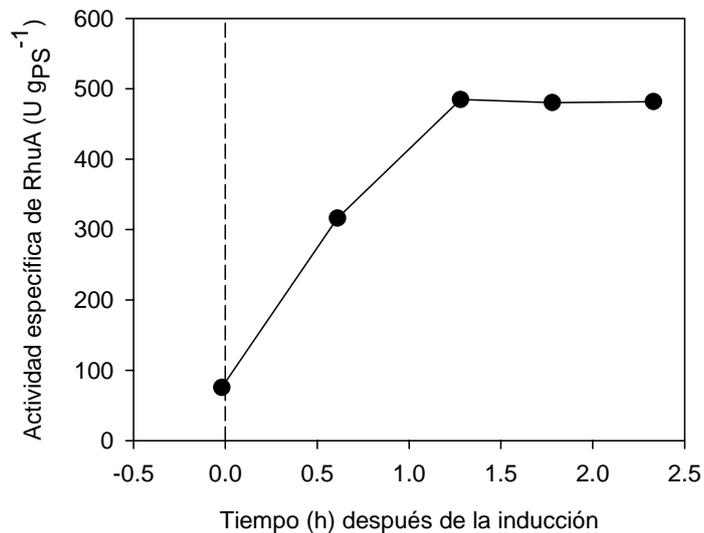


Figura 9.25. Perfil de actividad específica de RhuA en cultivo en semicontinuo a $\mu_{\text{exp}} = 0.21 \text{ h}^{-1}$ de la cepa *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham). Concentración final de IPTG: 150 μM .

Se observa que antes de las dos horas de inducción, se alcanza el máximo de actividad específica de RhuA (484 U gPS⁻¹). La tabla 9.8 presenta una comparación entre *E. coli* M15 (pQErham) y *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) operando en semicontinuo. Se observa que la actividad específica obtenida con la nueva cepa es menor que la actividad que se esperaba para la concentración de IPTG utilizada

Cepa	Modo operacional	μ_{exp} (h^{-1})	IPTG (μM)	Actividad específica ($U g_{PS}^{-1}$)	Producción ($U l^{-1}$)	Productividad ($U l^{-1}h^{-1}$)
<i>E. coli</i> M15 Δ glyA (pQE α β rham)	Semicontinuo	0.21	150	484	28483	1639
<i>E. coli</i> M15 (pQErham)	Semicontinuo	0.30	148	850	61436	3413

Tabla 9.8. Comparación entre las dos cepas de *E. coli* utilizados desde el punto de vista de evaluación de la producción de RhuA.

Las diferencias obtenidas en cuanto a los niveles de actividad específica entre las dos cepas podrían explicarse por:

- i) Las velocidades de crecimiento en el momento de la inducción son diferentes.
- ii) El plásmido pQE α β rham genera una carga metabólica mayor que el plásmido pQErham.
- iii) Un efecto combinado de ambas situaciones. Una explicación más detalla de estos argumentos se presenta a continuación:

a) La velocidad de crecimiento de las células en el momento de la inducción determina la cantidad de RhuA sintetizada: la activación del sistema de control de expresión de RhuA genera una tasa de transcripción/traducción muy elevada originando unos requerimientos energéticos mayores, frenando el crecimiento de la célula. Luego, el tiempo transcurrido entre la inducción y la parada del cultivo dependerá de la velocidad a la cual estaban creciendo las células y de la tasa de desaceleración. Ya que la síntesis de RhuA está asociada al crecimiento es de esperar que, a una menor velocidad de crecimiento, la actividad específica final también sea menor.

La figura 9.26 muestra la disminución de la velocidad específica de crecimiento de un cultivo en semicontinuo a $\mu_{set} = 0.3 h^{-1}$ y $\mu_{set} = 0.2 h^{-1}$. La concentración del inductor es similar (150 μM). Se observa que para un cultivo a $\mu_{set} = 0.3 h^{-1}$ el tiempo durante el cual hay crecimiento es mayor comparado con el cultivo a $\mu_{set} = 0.2 h^{-1}$.

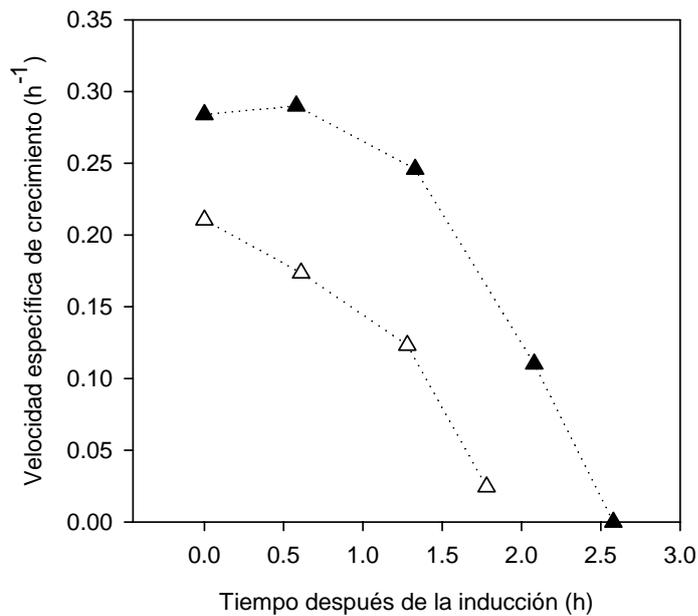


Figura 9.26. Perfil de las velocidades específica de crecimiento después de la inducción con IPTG (150 μM) para cultivos en semicontinuo de: (Δ) *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) a $\mu_{\text{set}} = 0.2 \text{ h}^{-1}$ y (\blacktriangle) *E. coli* M15 (pQErham) a $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$ en medio MD.

b) El plásmido pQE $\alpha\beta$ rham genera una carga metabólica mayor que el plásmido pQErham: la síntesis de SHMT controlada por el promotor constitutivo P3 disminuye la capacidad de las células M15 para sintetizar RhuA. Este efecto se observó también en cultivos en discontinuo, donde la actividad específica obtenida era menor en las células *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) comparada con *E. coli* M15 (pQErham) bajo condiciones similares.

c) Efectos combinados: también es posible que la baja actividad específica sea producto de ambas condiciones.

9.6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE TRABAJO

Se ha generado un mutante de *E. coli* M15 auxotrófico para glicina mediante la disrupción del gen *glyA* utilizando productos de PCR. Este mutante es incapaz de crecer en un medio definido sin glicina a pesar de poseer el gen *ltaE* intacto.

El plásmido pQE $\alpha\beta$ rham permite aportar de forma constitutiva la enzima SHMT a la cepa *E. coli* M15 Δ glyA, la cual posee una disrupción del gen cromosomal *glyA*. La SHMT sintetizada permite la conversión de L-treonina (sintetizada endógenamente) a glicina, por lo que glicina deja de ser un aminoácido esencial siempre y cuando las células posean el plásmido. Así, si existe una segregación plasmídica no adecuada, las células sin el plásmido de complementación no podrán crecer, asegurando un 100 % de estabilidad plasmídica en los cultivos en medio definido sin necesidad de utilizar antibióticos como marcadores de selección.

La cantidad de RhuA recombinante producida en la nueva construcción es ligeramente inferior a los niveles obtenidos con el sistema original (*E. coli* M15 pQErham – pREP4), posiblemente por una carga energética superior debido a la síntesis constitutiva de SHMT u otra alteración del metabolismo causado por elevados niveles de SHMT. La caracterización por medio de cultivos en semicontinuo permitirá una mejor evaluación del proceso de producción de RhuA con este nuevo sistema.

Con los resultados obtenidos en relación con la nueva cepa *E. coli* M15 Δ glyA (pQE $\alpha\beta$ rham) se puede afirmar que el sistema de complementación de glicina a través del plásmido pQE $\alpha\beta$ rham es un sistema eficiente para asegurar la segregación plasmídica en cultivos con medio definido, y por tanto, una alternativa atractiva a los sistemas basados en la suplementación de antibióticos como marcadores selectivos. En este sentido, se ha mejorado un aspecto del cultivo que pudiera ser problemático a la hora de trabajar en escalas de producción: la problemática asociada al uso de antibióticos como marcadores de selección.

Aun cuando existen problemas asociados al crecimiento de la nueva construcción, particularmente a la alta producción de acético a velocidades de crecimiento superiores a 0.2 h⁻¹, se podría mejorar la producción de RhuA y de cualquier otra proteína recombinante a través del estudio de diferentes estrategias, tales como:

- Diseño de un modelo matemático que permita la optimizar las condiciones de inducción: aprovechando la ventaja que posee el sistema de complementación en cuanto a la ausencia de requerimiento de antibióticos para asegurar la estabilidad plasmídica en medios definidos, se podría incrementar la actividad específica de

la proteína recombinante mediante la optimización de la concentración volumétrica de IPTG a través de modelos matemáticos de crecimiento y expresión. En este sentido, J. Pinsach ha logrado mediante la modelización del crecimiento de *E. coli* M15 Δ glyA (pQE α β rham), controlar la producción de acético, logrando CADC y además, optimizar la inducción en cultivos en semicontinuo de forma que ha alcanzado niveles de actividad específica de RhuA comprables a los cultivos en discontinuo en Erlenmeyer.

- Sustitución del promotor P3 fusionado al gen *glyA* por otro promotor más débil, de forma de minimizar el efecto que posee sobre las células la expresión constitutiva de la SHMT. Con ello, posiblemente se podría controlar la producción de acético, minimizar la carga energética que impone el plásmido sobre la célula y operar a velocidades de crecimientos superiores.

9.7. BIBLIOGRAFIA

- Amundsen SK, Taylor AF, Chaudhury AM, Smith GR. 1986. Recd - the Gene for an Essential 3rd Subunit of Exonuclease-V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83(15):5558-5562.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:411-421.
- Baudin A, Ozierkalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C. 1993. A Simple and Efficient Method for Direct Gene Deletion in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21(14):3329-3330.
- Bentley WE, Mirjalili N, Andersen DC, Davis RH, Kompala DS. 1990. Plasmid-Encoded Protein - the Principal Factor in the Metabolic Burden Associated with Recombinant Bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 35(7):668-681.
- Cosloy SD, Oishi M. 1973. Genetic Transformation in *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70(1):84-87.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(12):6640-6645.
- Davidson J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42:73-91.
- Dev IK, Harvey RJ. 1982. Sources of One-Carbon Units in the Folate Pathway of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 257(4):1980-1986.
- Harvey RJD, I.K. 1975. Regulation of the folate pathway of *Escherichia coli*. *Adv. Enzyme Regul.* 13:97-124.
- Henras AK, Bertrand E, Chanfreau G. 2004. A cotranscriptional model for 3'-end processing of the *Saccharomyces cerevisiae* pre-ribosomal RNA precursor. *RNA-a Publication of the RNA Society* 10(10):1572-1585.
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. 1989. Engineering Hybrid Genes without the Use of Restriction Enzymes - Gene-Splicing by Overlap Extension. *Gene* 77(1):61-68.
- Kimura T, Vassilev VP, Shen GJ, Wong CH. 1997. Enzymatic synthesis of beta-hydroxy-alpha-amino acids based on recombinant D- and L-threonine aldolases. *J. Am. Chem. Soc.* 119(49):11734-11742.
- Lartigue MF, Leflon-Guibout W, Poirel L, Nordmann P, Nicolas-Chanoine MH. 2002. Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from bla(TEM) genes and their

- relationship to beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(12):4035-4037.
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H. 1998. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 255(1):220-226.
- Lorenz E, Stauffer GV. 1995. Characterization of the MetR Binding-Sites for the GlyA Gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177(14):4113-4120.
- Lorenz E, Stauffer GV. 1996. Cooperative MetR binding in the *Escherichia coli* glyA control region. *FEMS Microbiol. Lett.* 137(2-3):147-152.
- Lorenz MG, Wackernagel W. 1994. Bacterial Gene-Transfer by Natural Genetic-Transformation in the Environment. *Microbiol. Rev.* 58(3):563-602.
- Morona R, Yeadon J, Considine A, Morona JK, Manning PA. 1991. Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *Escherichia coli* thyA⁺ gene: application to colera vaccine developmen. *Gene* 107:139-144.
- Ogawa H, Fujioka M. 1981. Purification and Characterization of Cytosolic and Mitochondrial Serine Hydroxymethyltransferases from Rat-Liver. *J. Biochem. (Tokyo).* 90(2):381-390.
- Park JI, Grant CM, Dawes IW. 2005. The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cereviside* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327(1):311-319.
- Plamann MD, Stauffer GV. 1983. Characterization of the *Escherichia coli* Gene for Serine Hydroxymethyltransferase. *Gene* 22(1):9-18.
- Plamann MD, Stauffer GV. 1989. Regulation of the *Escherichia coli* Glya Gene by the MetR Gene-Product and Homocysteine. *J. Bacteriol.* 171(9):4958-4962.
- Ryan ET, Crean TI, Kochi SK, John M, Luciano AA, Killeen KP, Klose KE, Calderwood SB. 2000. Development of a DglnA balanced lethal plasmid system for the expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 68:221-226.
- Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273:352-354.
- Schirch L, Mason M. 1962. Serine Transhydroxymethylase - Spectral Properties of Enzyme-Bound Pyridoxal-5-Phosphate. *J. Biol. Chem.* 237(8):2578-&.
- Stauffer GV, Plamann MD, Stauffer LT. 1981. Construction and Expression of Hybrid Plasmids Containing the *Escherichia coli*-Gly a Gene. *Gene* 14(1-2):63-72.

- Stauffer LT, Plamann MD, Stauffer GV. 1986. Cloning and Characterization of the Glycine-Cleavage Enzyme-System of *Escherichia coli*. *Gene* 44(2-3):219-226.
- Trotter EW, Grant CM. 2005. Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 4(2):392-400.
- Van der Kaaij H, Desiere F, Mollet B, Germond JE. 2004. L-alanine auxotrophy of *Lactobacillus johnsonii* as demonstrated by physiological, genomic, and gene complementation approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3):1869-1873.

ANEXOS

ANEXO 1

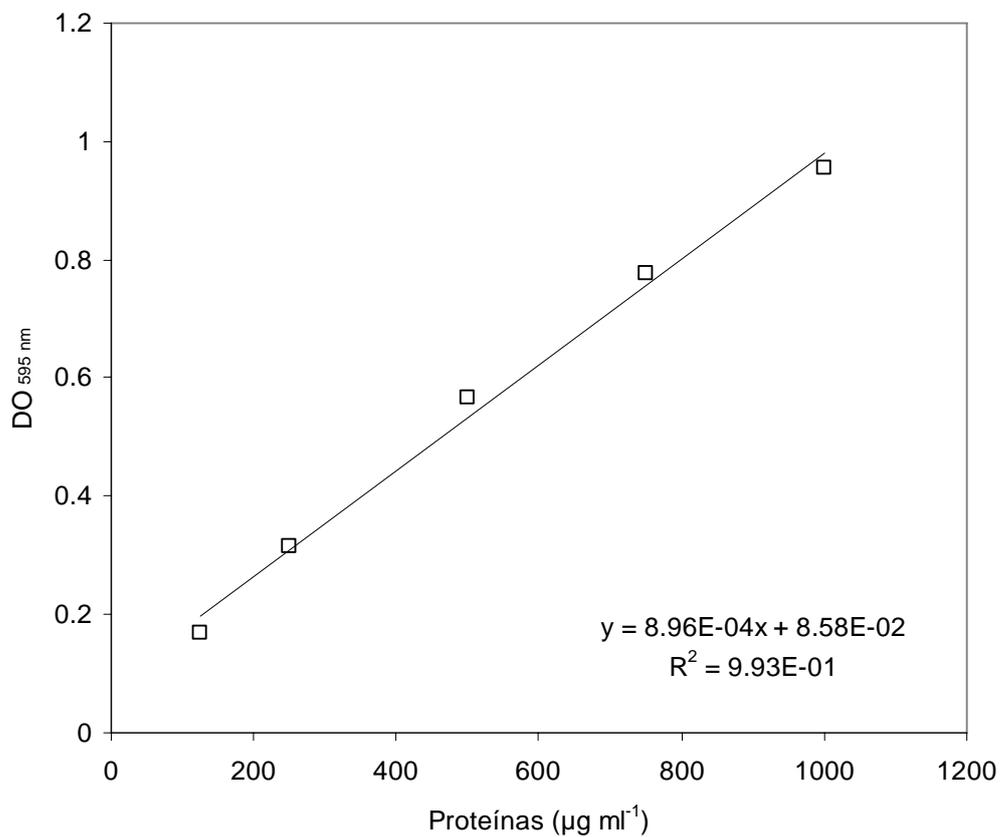


Figura A1. Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford.

ANEXO 2

El espectro de ^1H -RMN y la tabla resumen de asignación de señales e integrales relativas se muestran en la siguiente tabla

δ (ppm)	Asignación	Integral relativa (*)
1.33 (m)	CH_3 , CHA	13.42
1.5 – 1.9 (m)	CHA	9.56
3.01-3.10 (m)	CHA	2.00
3.65-4.03, 2 (m, integ. rel. 1:3)	ramnulosa 1-P	6.58

(*) Integrales relativas a la asignación de la integral equivalente a dos protones para el multiplete a δ 3.01

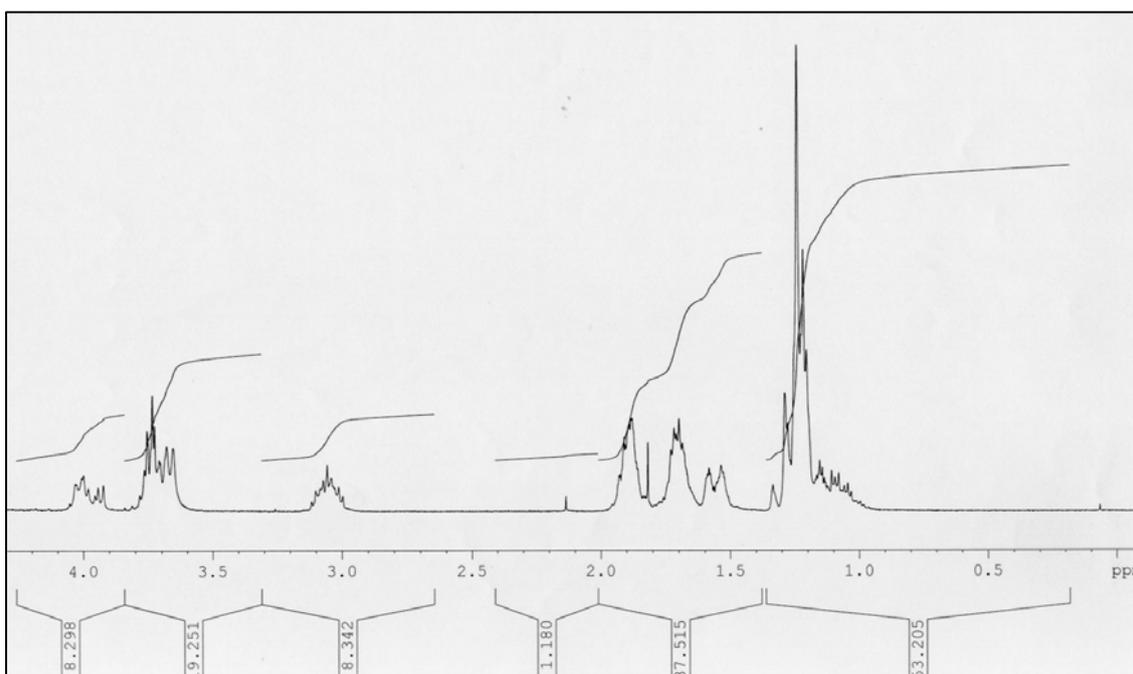


Figura A2. Espectro de ^1H -RMN de la sal de ciclohexilamina de ramnulosa 1-fosfato sintetizada en el laboratorio.

ANEXO 3

Composición de las proteínas recombinantes producidas en base a la secuencia primaria de DNA**1. RhuA a partir de *E. coli* M15 (pQErham)****Composición de aminoácidos:**

Ala (A)	22	7.7%
Arg (R)	10	3.5%
Asn (N)	11	3.9%
Asp (D)	15	5.3%
Cys (C)	3	1.1%
Gln (Q)	13	4.6%
Glu (E)	13	4.6%
Gly (G)	26	9.1%
His (H)	15	5.3%
Ile (I)	15	5.3%
Leu (L)	29	10.2%
Lys (K)	11	3.9%
Met (M)	8	2.8%
Phe (F)	12	4.2%
Pro (P)	15	5.3%
Ser (S)	15	5.3%
Thr (T)	21	7.4%
Trp (W)	7	2.5%
Tyr (Y)	5	1.8%
Val (V)	19	6.7%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Número total de residuos cargados negativamente(Asp + Glu): 28

Número total de residuos cargados positivamente(Arg + Lys): 21

Coposición atómica:

Carbon	C	1410
Hydrogen	H	2175
Nitrogen	N	387
Oxygen	O	407
Sulfur	S	11

Fórmula: $C_{1410}H_{2175}N_{387}O_{407}S_{11}$

2. DERA (a partir de *E. coli* M15 (pQEdeoc1))**Composición de aminoácidos:**

Ala (A)	40	14.8%
Arg (R)	13	4.8%
Asn (N)	7	2.6%
Asp (D)	20	7.4%
Cys (C)	4	1.5%
Gln (Q)	4	1.5%
Glu (E)	16	5.9%

Gly (G)	20	7.4%
His (H)	10	3.7%
Ile (I)	19	7.0%
Leu (L)	22	8.1%
Lys (K)	19	7.0%
Met (M)	7	2.6%
Phe (F)	8	3.0%
Pro (P)	8	3.0%
Ser (S)	14	5.2%
Thr (T)	17	6.3%
Trp (W)	1	0.4%
Tyr (Y)	6	2.2%
Val (V)	16	5.9%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Número total de residuos cargados negativamente(Asp + Glu): 36

Número total de residuos cargados positivamente(Arg + Lys): 32

Coposición atómica:

Carbon	C	1280
Hydrogen	H	2061
Nitrogen	N	361
Oxygen	O	392
Sulfur	S	11

Formula: C₁₂₈₀H₂₀₆₁N₃₆₁O₃₉₂S₁₁

3. DERA (a partir de *E. coli* DH5 α (pBRdeoC2to)):

Composición de aminoácidos:

Ala (A)	41	15.4%
Arg (R)	12	4.5%
Asn (N)	8	3.0%
Asp (D)	20	7.5%
Cys (C)	4	1.5%
Gln (Q)	4	1.5%
Glu (E)	16	6.0%
Gly (G)	18	6.8%
His (H)	10	3.8%
Ile (I)	19	7.1%
Leu (L)	22	8.3%
Lys (K)	19	7.1%
Met (M)	6	2.3%
Phe (F)	8	3.0%
Pro (P)	8	3.0%
Ser (S)	12	4.5%
Thr (T)	16	6.0%
Trp (W)	1	0.4%
Tyr (Y)	6	2.3%
Val (V)	16	6.0%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Número total de residuos cargados negativamente(Asp + Glu): 36

Número total de residuos cargados positivamente(Arg + Lys): 31

Coposición atómica:

Carbon	C	1262
Hydrogen	H	2028
Nitrogen	N	354
Oxygen	O	385
Sulfur	S	10

Formula: C₁₂₆₂H₂₀₂₈N₃₅₄O₃₈₅S₁₀

4. FruA (a partir de *E. coli* *E. coli* M15 (pQEfda)):

Composición de aminoácidos:

Ala (A)	31	8.4%
Arg (R)	7	1.9%
Asn (N)	18	4.9%
Asp (D)	21	5.7%
Cys (C)	4	1.1%
Gln (Q)	15	4.0%
Glu (E)	22	5.9%
Gly (G)	33	8.9%
His (H)	19	5.1%
Ile (I)	21	5.7%
Leu (L)	27	7.3%
Lys (K)	25	6.7%
Met (M)	9	2.4%
Phe (F)	13	3.5%
Pro (P)	15	4.0%
Ser (S)	27	7.3%
Thr (T)	17	4.6%
Trp (W)	4	1.1%
Tyr (Y)	13	3.5%
Val (V)	30	8.1%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Número total de residuos cargados negativamente(Asp + Glu): 43

Número total de residuos cargados positivamente(Arg + Lys): 32

Coposición atómica:

Carbon	C	1803
Hydrogen	H	2792
Nitrogen	N	492
Oxygen	O	548
Sulfur	S	13

Formula: C₁₈₀₃H₂₇₉₂N₄₉₂O₅₄₈S₁₃

5. LTA a partir de *E. coli* M15 (pQEltAE)

Composición de aminoácidos:

Ala (A)	47	13.6%
Arg (R)	24	7.0%
Asn (N)	15	4.3%

Asp (D)	20	5.8%
Cys (C)	4	1.2%
Gln (Q)	11	3.2%
Glu (E)	22	6.4%
Gly (G)	27	7.8%
His (H)	14	4.1%
Ile (I)	16	4.6%
Leu (L)	35	10.1%
Lys (K)	13	3.8%
Met (M)	12	3.5%
Phe (F)	8	2.3%
Pro (P)	11	3.2%
Ser (S)	14	4.1%
Thr (T)	15	4.3%
Trp (W)	4	1.2%
Tyr (Y)	10	2.9%
Val (V)	23	6.7%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Número total de residuos cargados negativamente(Asp + Glu): 42

Número total de residuos cargados positivamente(Arg + Lys): 37

Coposición atómica:

Carbon	C	1662
Hydrogen	H	2642
Nitrogen	N	488
Oxygen	O	495
Sulfur	S	16

Formula: $C_{1662}H_{2642}N_{488}O_{495}S_{16}$

5. SHMT a partir de *E. coli* M15 (pQEglyA1)

Composición de aminoácidos:

Ala (A)	51	11.9%
Arg (R)	15	3.5%
Asn (N)	21	4.9%
Asp (D)	23	5.4%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	12	2.8%
Glu (E)	29	6.8%
Gly (G)	34	7.9%
His (H)	18	4.2%
Ile (I)	24	5.6%
Leu (L)	32	7.5%
Lys (K)	26	6.1%
Met (M)	11	2.6%
Phe (F)	15	3.5%
Pro (P)	19	4.4%
Ser (S)	24	5.6%
Thr (T)	20	4.7%
Trp (W)	2	0.5%
Tyr (Y)	15	3.5%
Val (V)	37	8.6%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Número total de residuos cargados negativamente(Asp + Glu): 52
 Número total de residuos cargados positivamente(Arg + Lys): 41

Coposición atómica:

Carbon	C	2071
Hydrogen	H	3248
Nitrogen	N	570
Oxygen	O	625
Sulfur	S	11

Formula: C₂₀₇₁H₃₂₄₈N₅₇₀O₆₂₅S₁₁

6. FucA a partir de *E. coli* M15 (pQEfucA)

Composición de aminoácidos:

Ala (A)	23	10.1%
Arg (R)	11	4.8%
Asn (N)	10	4.4%
Asp (D)	6	2.6%
Cys (C)	4	1.8%
Gln (Q)	6	2.6%
Glu (E)	18	7.9%
Gly (G)	15	6.6%
His (H)	17	7.5%
Ile (I)	15	6.6%
Leu (L)	24	10.6%
Lys (K)	9	4.0%
Met (M)	6	2.6%
Phe (F)	4	1.8%
Pro (P)	9	4.0%
Ser (S)	12	5.3%
Thr (T)	14	6.2%
Trp (W)	2	0.9%
Tyr (Y)	7	3.1%
Val (V)	15	6.6%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Número total de residuos cargados negativamente(Asp + Glu): 24
 Número total de residuos cargados positivamente(Arg + Lys): 20

Coposición atómica:

Carbon	C	1114
Hydrogen	H	1763
Nitrogen	N	321
Oxygen	O	325
Sulfur	S	10

Formula: C₁₁₁₄H₁₇₆₃N₃₂₁O₃₂₅S₁₀

ANEXO 4

Elemento /Fuentes:	PM del compuesto	Elemento (g/100 g biomasa)	g elemento/mol compuesto	Cantidad (g) compuesto en batch (V = 801 ml)	Cantidad (g) de elemento en batch	Concentración de elemento en batch (g l ⁻¹)	Biomasa teórica (g l ⁻¹) sustentada
Carbono							
Glucosa	180	50	72	18.00	7.20	8.99	6.8 ^a
Nitrógeno							
(NH ₄) ₂ SO ₄	132	14	28	2.95	0.63	0.78	5.6
Fósforo							
K ₂ HPO ₄	174.18	3	31	9.53	1.70	2.12	70.6
KH ₂ PO ₄	136.09	3	31	1.91	0.43	0.54	18.1
Azufre							
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.14	1	32	2.95	0.71	0.89	89.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	1	32	0.36	0.05	0.058	5.8
Potasio							
K ₂ HPO ₄	174.18	1	78.2	9.53	4.28	5.34	53.4
KH ₂ PO ₄	136.09	1	39.1	1.91	0.55	0.68	68.5
Sodio							
NaCl	58.44	1	23	1.47	0.58	0.72	72.13
Cloro							
NaCl	58.44	1	23	1.47	0.58	0.72	72.1
Magnesio							
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	0.5	24.3	0.36	0.04	4.43E-02	8.9
Hierro							
FeCl ₃	162.21	0.2	55.85	1.83E-02	0.01	7.87E-03	3.9
Calcio							
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	0.01	40.1	3.31E-03	9.02E-04	1.13E-03	11.3
Cobre							
CuSO ₄	249.68	0.01	63.55	3.54E-03	9.01E-04	1.13E-03	11.3
Zinc							
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	0.005	65.37	1.98E-03	4.51E-04	5.63E-04	11.3
Cobalto							
CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	0.001	58.93	3.64E-04	9.01E-05	1.13E-04	11.3
Molibdeno							
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	0.0002	95.94	4.55E-05	1.80E-05	2.25E-05	11.3
Manganeso							
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197.94	0.01	54.94	3.25E-03	9.01E-04	1.12E-03	11.3

Tabla A4.1 Biomasa teórica obtenida a partir de la composición del medio MD inicial utilizado en cultivos semicontinuo. ^aLa biomasa sustentada está calculada en base a la composición elemental promedio de procariontes (Kenneth, 1995), excepto para glucosa donde se utiliza un valor del rendimiento teórico aproximado biomasa/glucosa ($Y_{X/S} = 0.3$) para el cálculo de la biomasa teórica que se podría generar.

ANEXO 4

Elemento /Fuentes:	Biomasa teórica (g l ⁻¹) sustentada		TOTAL Biomasa sustentada
	Etapa discontinua	Etapa semicontinua	
Carbono			
Glucosa	6.7	107	113.7 ^a
Nitrógeno			
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.6	-	5.6 ^b
Fósforo			
K ₂ HPO ₄	70.6	Adiciones puntuales	88.7 ^c
KH ₂ PO ₄	18.1		
Azufre			
(NH ₄) ₂ SO ₄	89.3		166.7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.8	71.6	
Potasio			
K ₂ HPO ₄	534	-	602.5
KH ₂ PO ₄	68.5	-	
Sodio			
NaCl	72.1	-	72.1 ^d
Cloro			
NaCl	72.1	-	72.1 ^e
Magnesio			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8.9	108.8	117.7
Hierro			
FeCl ₃	3.9	98.1	102
Calcio			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11.3	143.0	154.3
Cobre			
CuSO ₄	11.3	143.0	154.3
Zinc			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	11.3	142.9	154.2
Cobalto			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	11.3	142.9	154.2
Molibdeno			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	11.3	142.9	154.2
Manganeso			
MnCl ₂ ·4H ₂ O	11.3	142.9	154.2

Tabla A4.2. Biomasa teórica obtenida a partir de la composición del medio MD inicial durante la etapa discontinua y alimento añadido en la etapa semicontinua para el ensayo donde se logró obtener la mayor velocidad específica de crecimiento en la etapa semicontinua. El promedio de la velocidad específica de crecimiento obtenida durante la etapa semicontinua fue de 0.36 h⁻¹. Biomasa final obtenida = 95.1 g_{PS} l⁻¹ (factor 0.37). ^a La biomasa sustentada está calculada en base a la composición elemental promedio de procariotas (Kenneth, 1995), excepto para glucosa donde se utiliza un valor del rendimiento teórico aproximado biomasa/glucosa ($Y_{X/S} = 0.3$) para el cálculo de la biomasa teórica que se podría generar. ^b La compensación de pH por NH₄OH permitió mantenerlos niveles de amonio dentro de un intervalo de forma que no representó un elemento limitante ni inhibidor del crecimiento. ^c No se tomó en cuenta para el cálculo las adiciones puntuales de fosfatos. ^d El sodio no representó un elemento limitante, posiblemente porque la composición en las células de *E. coli* M15 (pQErham) sea menor al dato obtenido en la

bibliografía. ^e No se tomó en cuenta para el cálculo el volumen de HCl añadido para compensar el incremento de pH al final de la etapa discontinua.

Publicaciones

High-level production of recombinant His-tagged rhamnulose 1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*

L Vidal, O Durany, T Suau, P Ferrer, MD Benaiges and G Caminal*

Unitat de Biocatàlisi Aplicada Associada al IIQAB (UAB-CSIC), Departament d'Enginyeria Química, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Abstract: An expression system based on *Escherichia coli* and the T5 promoter allowed the overproduction of a his-tagged rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhuA; EC 4.1.2.19), an enzyme with applications in the production of deoxyzasugars and deoxysugars compounds. Shake flask and bioreactor cultivation with *E. coli* M15 (pQErham) were performed under different media and inducing conditions for RhuA expression. A Defined Medium (DM) with glucose as carbon source gave a high volumetric and enzyme productivity (3460 AU dm⁻³ and 288 AU dm⁻³ h⁻¹ respectively) compared with Luria–Bertoni (LB) medium (2292 AU dm⁻³ and 255 AU dm⁻³ h⁻¹). The minimum quantity of (isopropyl- β -D-thiogalactoside) IPTG for optimal induction was estimated in 18–20 μ mol IPTG gDCW⁻¹. The highest volumetric production of RhuA (8333 AU dm⁻³) was obtained when IPTG was added in the late log-phase. No significant differences were found in specific RhuA activity for induction temperatures of 30 and 37 °C. An effective two-step purification process comprising affinity chromatography and gel permeation has been developed (overall recovery 66.5%). These studies provide the basis for the further development of an integrated process for recombinant RhuA production suitable for biotransformation applications.

© 2003 Society of Chemical Industry

Keywords: recombinant aldolase; His-tagged; purification; bioreactor; *E. coli*

1 INTRODUCTION

Enzymes are increasingly recognized as valuable tools for organic synthesis. One of the main assets of enzymes is their ability to perform reactions in a stereoselective way, which is difficult to achieve employing protective group chemistry methods. Their high regio- and stereoselectivity and catalytic efficiency make enzymes especially useful for the synthesis of complex molecules like carbohydrates, which play an important role in metabolism, as well as in cellular recognition, adhesion, molecular signalling and other relevant biological functions.¹

In this context, aldolases constitute one of the most interesting groups of enzymes employed in monosaccharide synthesis.² Aldolases belong to the class of lyases and are present in bacteria, fungi, algae and higher organisms. Although these enzymes are mainly involved in the metabolism of carbohydrates, they also play a role in aminoacids and hydroxyacids metabolism. Their function *in vivo* is often related to degradative cleavage of metabolites, but the reactions are reversible *in vitro* under appropriate conditions. This property enables aldolases to catalyse

C–C bond formation leading to enantiomerically pure polyhydroxy products, even when the starting materials are non-chiral substrates.³

A great number of aldolases have been identified and investigated as potential catalysts for organic synthesis, the dihydroxyacetone phosphate (DHAP) dependent aldolases being an important group. They catalyse C–C bond formation using DHAP as the donor substrate and an aldehyde as the acceptor substrate, generating a ketose 1-phosphate with specific C3/C4 diol group stereochemistry.⁴ Rhamnulose 1-phosphate aldolase (RhuA; EC 4.1.2.19) is a DHAP-dependent aldolase which catalyses the reversible asymmetrical aldol addition of DHAP to L-lactaldehyde generating (3*R*,4*S*) L-rhamnulose 1-phosphate. RhuA from *E. coli* is specific for DHAP; however, it accepts a wide range of natural and non-natural aldehydes as the acceptor substrate, increasing its potential for asymmetric synthesis applications.⁵ This enzyme has been used as a catalyst for the synthesis of deoxyzasugars and deoxysugars,^{6,7} which could be used as inhibitors of enzymes associated with carbohydrate processing, particularly glycosidases and glycosyltransferases.

* Correspondence to: G Caminal, Unitat de Biocatàlisi Aplicada Associada al IIQAB (UAB-CSIC), Departament d'Enginyeria Química, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain
E-mail: gloria.caminal@uab.es

Contract/grant sponsor: CiCYT; contract/grant number: BIO99-1219-C02-01

Contract/grant sponsor: CiCYT; contract/grant number: PPQ 2002-04625-C02-01

(Received 31 March 2003; revised version received 20 June 2003; accepted 8 July 2003)

RhuA from *E coli* has been cloned and expressed recombinantly in this organism.⁸ In this study, we describe the basis for the development of a process to obtain enough quantities of pure enzyme suitable for biotransformations.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) and glycerol phosphate dehydrogenase (GDH) were from Fluka. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from Gibco BRL. Low-range protein molecular weight standards for SDS-PAGE were from Bio-Rad. All other chemicals were reagent grade.

2.2 Bacterial strains and plasmids

E coli XL1 Blue MRF⁺ harbouring the vector pTrcrham with the *rhaD* gene was provided by Dr García Junceda (Instituto de Química Orgánica, CSIC, Madrid). The K-12 derived *E coli* strain M15 [pREP4] and vector pQE-40 (Qiagen) were used for *rhaD* overexpression. Frozen stock cultures containing 20% (v/v) glycerol were stored at -80°C .

2.3 Plasmid and strain construction

The *rhaD* gene was excised from vector pTrcrham digesting the plasmid with restriction enzymes *Bam*HI and *Hind*III. The 0.82 kbp fragment containing the *rhaD* gene was inserted into the pQE-40 vector linearized with the same enzymes to give rise to pQErham. This resulted in a translational fusion between a start codon followed by a synthetic region coding for six histidine residues, and the *rhaD* gene. Plasmid constructions and manipulations were carried out using standard methods.⁹ Purification of plasmids and DNA fragments was performed using Qiagen DNA purification kits.

Transformation of *E coli* M15 [pREP4] competent cells with the DNA ligation reaction was performed according to standard procedure.⁹ Transformants were grown on Luria-Bertoni (LB) agar plates containing $100\ \mu\text{g cm}^{-3}$ of ampicillin and $25\ \mu\text{g cm}^{-3}$ of kanamycin. The integrity of pQErham constructs in the selected transformants was verified by restriction enzyme digestion with *Bam*HI and *Hind*III.

2.4 Preparation of cleared cell lysates

Samples from culture broths were withdrawn and centrifuged at $12\,000g$ for 5 min. The pellet was resuspended in $100\ \text{mmol dm}^{-3}$ TrisHCl (pH 7.5) to a final optical density at 600 nm (OD_{600}) of 3 for enzyme activity determination, and with start buffer ($20\ \text{mmol dm}^{-3}$ sodium phosphate, $0.5\ \text{mol dm}^{-3}$ NaCl, $10\ \text{mmol dm}^{-3}$ imidazole, pH 7.4) to a final cell density OD_{600} of 20 to carry out protein purification.

In both cases, cell suspensions were placed in ice and sonicated with four 15 s pulses with 2 min intervals in ice between each pulse using a VibracellTM model VC50 (Sonics & Materials). Cellular debris was removed by

centrifugation at $12\,000g$ for 10 min and the clear supernatant was collected.

2.5 Purification of RhuA

An FPLC system (Amersham Biosciences) was used for purification of recombinant RhuA. The crude supernatant of *E coli* M15 (pQErham) was applied to a $0.7 \times 2.5\ \text{cm}$ HiTrap[®] Chelating column (Amersham Biosciences). The column was washed with $5\ \text{cm}^3$ of start buffer and the recombinant protein was eluted with a gradient of 10 to $500\ \text{mmol dm}^{-3}$ imidazole in $20\ \text{mmol dm}^{-3}$ sodium phosphate, $0.5\ \text{mol dm}^{-3}$ NaCl, pH 7.4 at a flow rate of $1\ \text{cm}^3\ \text{min}^{-1}$. Fractions with RhuA activity were pooled and checked by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). A 12% SDS-PAGE was performed in a MiniProtean[®] II (Bio-Rad) instrument according to the manufacturer's instructions.

The imidazole in the pooled fractions was removed using an HiTrap Desalting column ($1.6 \times 2.5\ \text{cm}$) pre-packed with Sephadex[®] G-25 Superfine (Amersham Biosciences) equilibrated with $10\ \text{mmol dm}^{-3}$ TrisHCl, pH 7.5, working at a flow rate of $5\ \text{cm}^3\ \text{min}^{-1}$. Fractions containing RhuA were pooled and stored at -80°C .

2.6 Synthesis of rhamnulose 1-phosphate

Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) was obtained by acid hydrolysis of the ethyl-hemiacetal tri-sodium salt dimer,¹⁰ which was prepared in our laboratory by organic synthesis.¹¹ L-lactaldehyde was also synthesized in our laboratory according to the method of Zagalak *et al.*¹² Bis(cyclohexylamine) rhamnulose 1-phosphate was prepared enzymatically from DHAP and L-lactaldehyde, using purified RhuA, according to the procedure of Fessner *et al.*¹³ Rhamnulose 1-phosphate synthesis was monitored by HPLC using ion-pair reversed chromatography according to the procedure of Tjioe *et al.*¹⁴ and the ¹H NMR spectrum of the cyclohexylammonium salt of rhamnulose 1-phosphate, newly synthesized, was determined.

2.7 Enzyme activity for RhuA

Determination of RhuA activity was carried out with a coupled continuous assay based on the modified method of Chiu and Feingold.¹⁵ In summary, in the first step, rhamnulose 1-phosphate is cleaved to L-lactaldehyde and DHAP; in the second step, DHAP is reduced using rabbit muscle glycerol 3-phosphate dehydrogenase and NADH. In the assay, $0.01\ \text{cm}^3$ of the clear supernatant obtained from sonicated and centrifuged cells was mixed with $0.99\ \text{cm}^3$ of a solution containing (in mmol dm^{-3}): 0.15 NADH, 2.0 bis(cyclohexylamine) rhamnulose 1-phosphate, 100.0 KCl, 50.0 TrisHCl, pH 7.5, and 2.5 activity units (AU) cm^{-3} GDH. The reaction was incubated at 25°C and the absorbance at 340 nm monitored in a UV-VIS Cary (Varian) spectrophotometer. One unit of RhuA activity was defined as the amount of enzyme

required to convert 1 μmol of rhamnulose 1-phosphate in DHAP per minute at 25 °C.

2.8 Medium and cultivation conditions

Shake flask cultures of *E. coli* were performed in either LB medium (see below) or Defined Medium (DM, see below). Bioreactor cultures of *E. coli* were carried out in DM. The medium used for preinoculum cultures was LB.

The LB medium contained 10 g dm^{-3} tryptone, 10 g dm^{-3} NaCl and 5 g dm^{-3} yeast extract. LB plates contained 1.5% (w/v) agar in addition.

The Defined Medium (DM) used contained, in g dm^{-3} : 13.2 K_2HPO_4 , 2.6 KH_2PO_4 , 4.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 NaCl, 0.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 thiamine and, in mg dm^{-3} : 25.4 FeCl_3 , 33.0 Citrate, 4.6 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.13 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.7 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4.9 CuSO_4 , 0.03 H_3BO_3 , 4.5 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.03 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.06 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Glucose was added at different concentrations depending on the experiment. Vitamins, antibiotics, FeCl_3 , citrate and IPTG were filter-sterilized (0.2 μm). Glucose, salts and trace elements were sterilized separately by autoclaving. Media were supplemented with ampicillin and kanamycin at a final concentration of 100 mg dm^{-3} and 25 mg dm^{-3} , respectively.

Preinoculum cultures of *E. coli* (15 cm^3) were grown from a frozen stock overnight in LB medium at 37 °C with shaking (250 rpm). In shake flask experiments, 3.5 cm^3 of preinoculum culture was transferred to a 500 dm^3 shake flask containing 46.5 cm^3 of LB medium or DM with 10 g dm^{-3} glucose, and incubated at 37 °C with shaking at 250 rpm. For induction of RhuA expression, IPTG was added and cultivation temperature decreased to 30 °C to minimize the potential formation of inclusion bodies.⁸

In bioreactor cultivation experiments, 15 cm^3 of preinoculum culture was transferred to a 1 dm^3 shake flask containing 0.2 dm^3 of DM, and incubated at 37 °C for 13 h with shaking at 250 rpm. Then, 0.08 dm^3 of this culture was used as inoculum for the bioreactor containing 0.8 dm^3 of DM with 25 g dm^{-3} glucose. Glucose was sterilized separately by autoclaving at 121 °C for 20 min and added to the basal medium after its heat-sterilization and cooling. All fermentations were carried out using a Biostat[®] B reactor (Braun Biotech Int) equipped with a 2 dm^3 jar with a working volume of 0.8 dm^3 . The pH was adjusted to pH 7.0 by adding a 25% (w/v) NH_4OH solution to the reactor. The temperature was kept at 37 °C and decreased to 30 °C after induction with IPTG unless indicated. The $p\text{O}_2$ value was maintained at 50% saturation by adapting the stirrer speed and with a air flow rate of 2 vvm. Foaming was suppressed by controlled supply of 10% (v/v) silicone-antifoam (Fluka).

2.9 Analytical methods

Growth of *E. coli* was monitored by optical density measurements at 600 nm using a spectrophotometer

(Uvicon 941 Plus, Kontron). Optical densities were converted to dry cell weight using a calibration curve. Dry cell weights (DCW) of culture samples were determined after removal of the medium by centrifugation at 5000 g for 15 min; the pellets were washed with two volumes of deionized water and dried at 100 °C to constant weight.

Protein concentration was determined using a Coomassie[®] Protein Assay Reagent supplied by Pierce (Rockford, Illinois, 61105 USA) based on the method of Bradford.¹⁶

Glucose was analysed by HPLC (Hewlett Packard 1050) on an Aminex HPX-87H (Biorad) column at 25 °C with an IR detector (HP 1047) using 15 mmol dm^{-3} H_2SO_4 (pH 3.0) as eluent, and a flow rate of 0.6 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Cloning of RhuA in pQE-40

Initial RhuA over-expression studies were carried out using the preexisting *E. coli* XL1 Blue MRF['] (pTrcrham) construction in shake flask cultures. SDS-PAGE analysis of bacteria harvested after IPTG induction revealed that the recombinant RhuA showed poor over-expression levels (Fig 1, lanes B and C). To circumvent this problem, an alternative expression system has been investigated, namely the *E. coli* M15 [pREP-4]/pQE system from Qiagen.

Hence, the *rhaD* gene from vector pTrcrham was subcloned into plasmid pQE-40 under the transcriptional control of the T5 promoter (Fig 2). The new construction, pQErham, was used to transform *E. coli* M15 harbouring plasmid pREP-4, which contains the *lac I* gene encoding the lac repressor. Multiple copies of pREP4 present in the

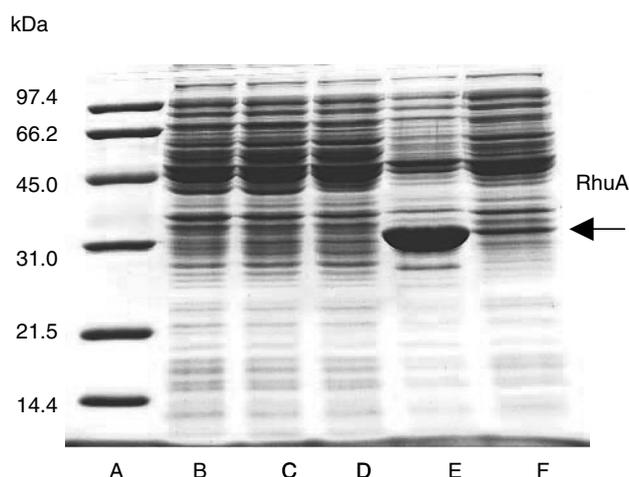


Figure 1. SDS-PAGE analysis of the expression level of recombinant RhuA in LB media from different *E. coli* strains. The cell extracts were loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue after electrophoresis. Lanes: A: Molecular mass standards; B: *E. coli* XL1 Blue MRF['] (pTrcrham) with IPTG (50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$); C: *E. coli* XL1 Blue MRF['] (pTrcrham) without IPTG; D: *E. coli* XL1 Blue MRF['] (wild type); E: *E. coli* M15 (pQErham) with IPTG (50 $\mu\text{mol dm}^{-3}$); F: *E. coli* M15 (pQErham) without IPTG.

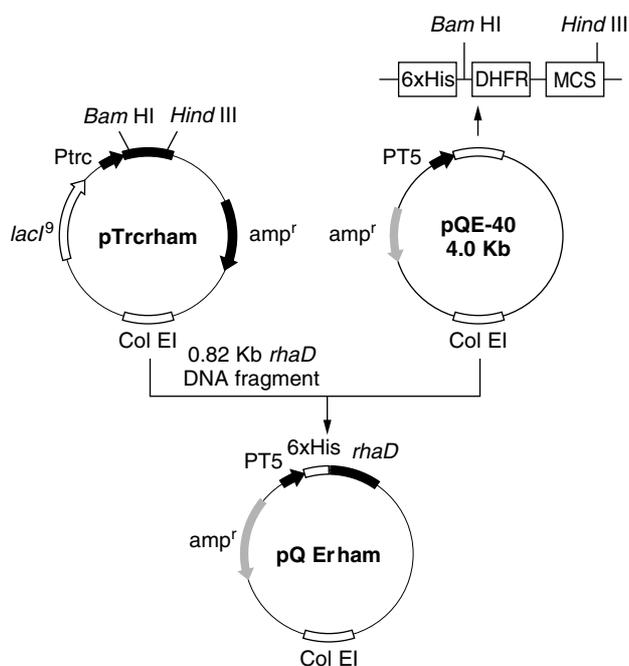


Figure 2. Strategy for pQErham plasmid construction. The 820 bp fragment from pTrcrham was cloned with *Hind*III and *Bam*HI and inserted into pQE-40 vector (Qiagen) to obtain the final plasmid pQErham with the His-tag at the N-terminal end under the control of T5 promoter.

host cell ensure high levels of lac repressor, allowing tight regulation of protein expression. The pQE-40 expression cassette contains a 6x histidine residue and the murine dihydrofolate reductase (DHFR) coding sequences upstream of the multiple cloning site (MCS). Since additional aminoacids in the N- or C- terminus of the recombinant protein might play a critical role its function and cell toxicity,¹⁷ minimizing the length of additional transcriptionally fused sequences at both ends of the *rhaD* gene was considered. Therefore, the excision of pQE-40 with *Bam* HI and *Hind* III allowed us to keep the number of aminoacids added to the protein along with the 6x Histag to a minimum. The DNA fragment corresponding *rhaD* gene was inserted into the modified pQE-40 so that RhuA was expressed as a fusion protein with a six histidine tail at its N-terminus, with just two aminoacids between the aldolase and the 6x Histag peptide.

The resulting transformants, *E coli* M15 [pQErham], were tested for RhuA overproduction in shake flask cultures in LB medium supplemented with kanamycin and ampicillin. The cultures were induced with $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ IPTG, decreasing the temperature to 30°C to minimize potential formation of inclusion bodies. After 6 h of induction, cells were collected, sonicated and intracellular proteins analysed by SDS-PAGE. Overexpressed RhuA appeared as an intense protein band with an apparent molecular mass of about 32 kDa corresponding to the estimated molecular weight of the monomeric form of recombinant RhuA (Fig 1, lane E). Densitometric image analysis of SDS-PAGE gel led to an estimation of

RhuA at 50% of total intracellular proteins of induced *E coli* [pQErham] cells, compared with the 8% in cells harvested before induction of expression (Fig 1, lane F).

3.2 Set up of the RhuA activity assay

On the basis of the above results, it was clear that RhuA was expressed in high quantities. However, no information about its functionality was obtained. The assay for RhuA activity determination is based on the cleavage of its natural substrate, rhamnulose 1-phosphate. Due to its non-commercial availability, rhamnulose 1-phosphate had to be synthesized in our laboratory. Aldol condensation of L-lactaldehyde and DHAP using purified RhuA was chosen as the method of synthesis to obtain a high quality rhamnulose 1-phosphate.

In order to provide enough purified RhuA for rhamnulose 1-phosphate synthesis, a shake flask culture of *E coli* M15 [pQErham] in LB medium was carried out; bacteria were subsequently harvested and treated as described in Section 2. The cleared lysate was subjected to metal chelate affinity chromatography. Recombinant RhuA was detected in the 500 mmol dm^{-3} imidazole fraction (Fig 3). About 24 mg of purified RhuA (*c* 40% of the total intracellular soluble proteins) was recovered from a 20 cm^3 bacterial culture. In a second step, gel permeation chromatography was performed in order to remove imidazole present in the pooled fractions containing RhuA. A protein recovery of about 95% was obtained in this step, successfully eliminating imidazole.

Purified RhuA (5 mg) was used to catalyse the aldol condensation of L-lactaldehyde and DHAP to rhamnulose 1-phosphate, which was further purified, neutralized with cyclohexylamine and the final product characterized by $^1\text{H-NMR}$, obtaining results in accordance with those described by Fessner.¹³

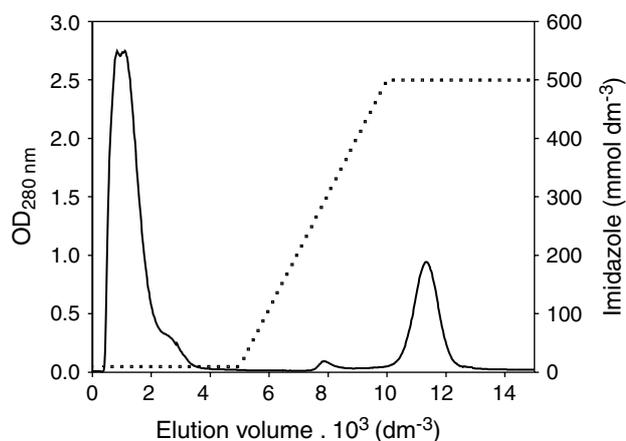


Figure 3. Affinity chromatography of recombinant RhuA. Cell extract was loaded onto $0.7 \times 2.5 \text{ cm}$ HiTrap[®] Chelating column (Amersham Biosciences) and recombinant protein was eluted using a gradient of 10 to 500 mmol dm^{-3} imidazole in 20 mmol dm^{-3} sodium phosphate, 0.5 mol dm^{-3} NaCl, pH 7.4. Protein concentration was monitored by OD_{280} . Solid line corresponds to OD_{280} ; dashed line corresponds to imidazole concentration.

It is well known that monovalent cations modulate enzyme activity of RhuA, K^+ being the most effective activator.¹⁵ Hence, the effect of potassium on aldolase activity was studied. A concentration of 100 mmol dm^{-3} of KCl was found to be the optimal value because higher concentrations did not significantly increase the enzyme activity. Finally, the assay conditions were standardized as reported in Section 2. The reproducibility of the assay was $>95\%$ ($p < 0.01$) with a wide range of linearity ($48\text{--}1270 \text{ AU dm}^{-3}$). The K_m and r_m values for recombinant RhuA were estimated by the method of Lineweaver–Burk as 2.5 mmol dm^{-3} and $16.6 \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$, respectively.

3.3 RhuA over-expression in shake flask cultivations

Shake flask cultures studies in LB medium were performed in order to compare the recombinant strains *E coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) and *E coli* M15 (pQErham) in terms of RhuA production. For both strains biomass and enzyme production were evaluated under identical conditions.

Generally, it is well established that IPTG induction can decrease cell growth.^{18,19} However, the opposite effect was observed in our assays with M15. A variation of the correlation $\text{g DCW}/\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ was identified as an explanation for this incongruence. Experimentally, biomass was initially measured using a turbidimetric method ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$) and converted to dry weight with a previously obtained and well-tested correlation. This calibration had been obtained with non-induced cells (for recombinant strain M15, $\text{gDCW}/\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.37$). Following this procedure, we observed that, for *E coli* M15, the calculated biomass in induced cultures was higher than in non-induced control cultures. After these results, a new correlation was experimentally determined using induced bacteria. The new ratio was $0.26 \text{ gDCW}/\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ and this value remained constant after 2 h induction (data not shown). When this factor was applied to the experimental $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ values obtained for strain M15-induced cultures, the biomass obtained in grams of dry cell weight (DCW) dm^{-3} was slightly lower than for the non-induced one (see Fig 4(a)) and, for both strains, the final biomass was similar.

Figure 4(b) shows time profiles of specific enzymatic activity for the same experiment. RhuA activity of IPTG-induced *E coli* M15 increased 1335% in respect to non-induced cells, and 2117% compared with induced *E coli* XL1 Blue MRFx. Since the new construction provided a good regulation and a higher level over-expression, it was selected for subsequent experiments.

3.4 Medium influence on enzyme production

Since the final objective was to develop a high cell density cultivation process for high-level production of RhuA, it was desirable to establish a defined medium.^{20–22} In previous studies, we formulated a

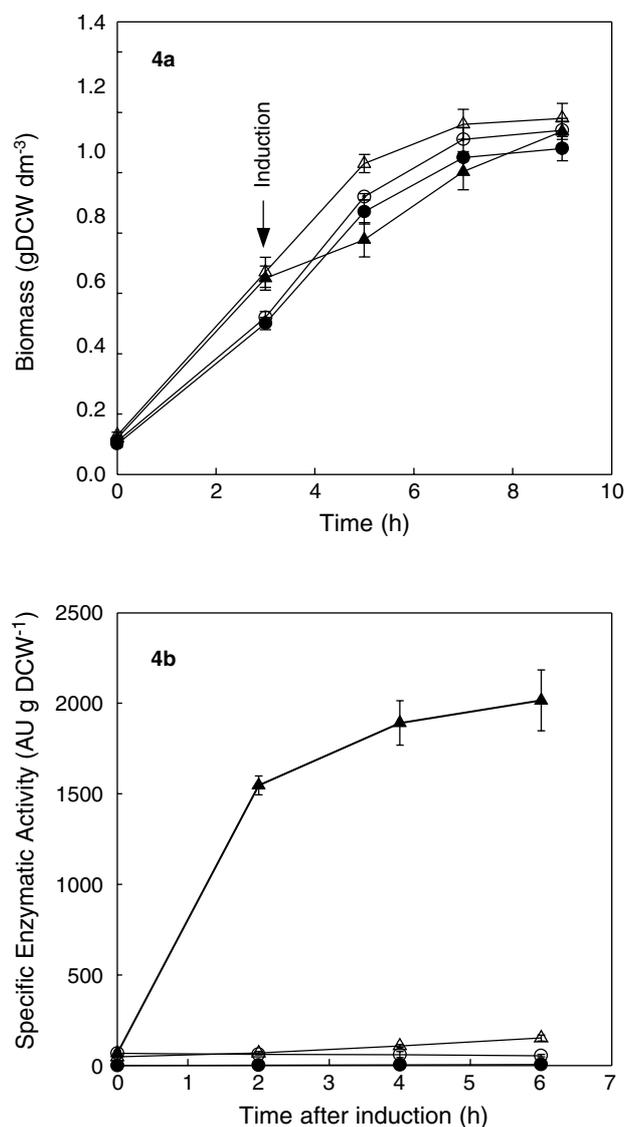


Figure 4. Cell growth curve (a) and specific RhuA activity profile (b) for flask cultures of *E coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) and *E coli* M15 (pQErham) in LB media. Induction with IPTG ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) was done 3 h after inoculation. The growth was carried out at 37°C and after induction, the temperature was decreased to 30°C . Experiments were made in triplicate and the results are the average and standard deviation. —●— *E coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) with IPTG; —○— *E coli* XL1 Blue MRF' (pTrcrham) without IPTG (control); —▲— *E coli* M15 (pQErham) with IPTG; —△— *E coli* M15 (pQErham) without IPTG (control).

defined medium considering the nutritional requirements of a 100 g dm^{-3} *E coli* XL1 Blue (pTrcHisfuc) culture. This optimized medium was tested for M15 strain in shake flask cultivations; the results are presented in Fig 5.

As can be observed in Fig 5(a), growth of *E coli* M15 (pQErham) in DM is over two-fold compared with that in LB medium, but with a lower initial specific growth rate. This may be explained on the basis that the inoculum was carried out in LB medium and, therefore, cells required a period for adaptation to the new growth conditions. After this period, the specific growth rate was higher in DM. The induction criterion for both media was to add IPTG ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ final

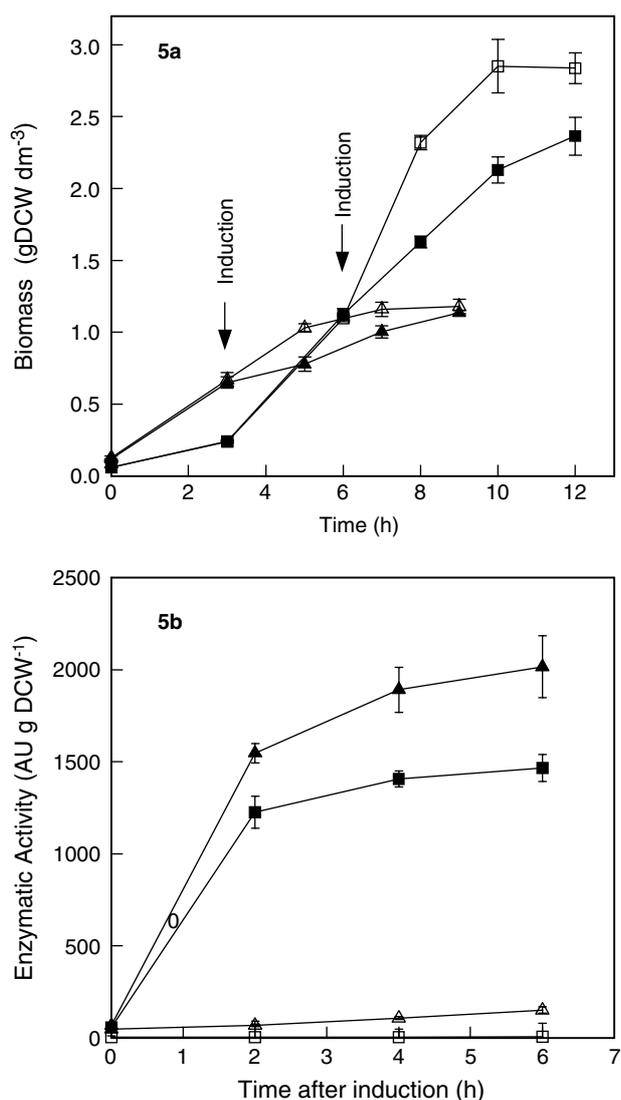


Figure 5. Cell growth curve (a) and specific RhuA activity profile (b) of *E coli* M15 (pQErham) in LB and DM media in Erlenmeyer flasks. Induction with IPTG ($50 \mu\text{mol dm}^{-3}$) was done 3 h after inoculation. The growth was carried out at 37°C and after induction, the temperature was decreased to 30°C . Experiments were made in triplicate and the results are the average and standard deviation. —▲— LB media with IPTG; —△— LB media without IPTG (control); —■— MD media with IPTG; —□— MD media without IPTG (control).

concentration) at the middle exponential growth phase (3 h for LB and 6 h for DM). After induction, a lower specific growth rate was observed in both media compared with the not-induced (control), the decrease being more significant in DM.

Table 1. Biomass, specific enzyme activity, volumetric production and productivity from *E coli* M15 (pQErham) growing on LB and Defined Media (DM) in Erlenmeyer flasks induction was carried out at 3 h (LB) and 6 h (DM) with $50 \mu\text{M}$ IPTG. For productivity calculation, the final time of culture was 9 h for LB and 12 h for DM. Experiments were performed in triplicate and the results are the average and standard deviation

	Defined medium (DM)		LB medium	
	With IPTG	Without IPTG	With IPTG	Without IPTG
Biomass (g dm^{-3})	2.36 ± 0.13	2.84 ± 0.11	1.14 ± 0.04	1.18 ± 0.05
Specific enzyme activity (AU gDCW^{-1})	1466 ± 63	54 ± 7	2016 ± 169	151 ± 17
Enzyme production (AU dm^{-3})	3460 ± 63	151 ± 14	2292 ± 218	179 ± 13
Productivity ($\text{AU dm}^{-3} \text{h}^{-1}$)	288 ± 5	13 ± 1	255 ± 24	20 ± 1

Specific enzymatic activities were determined (Fig 5(b)) in induced cells harvested from both cultivations. A 1.4-fold higher value was attained in LB medium ($2016 \text{ AU gDCW}^{-1}$) compared with DM ($1466 \text{ AU gDCW}^{-1}$). Table 1 shows the enzyme production (AU dm^{-3}), as well as the productivity ($\text{AU dm}^{-3} \text{h}^{-1}$) for both media. As can be seen, in spite of the lower specific enzyme activity in DM, the final volumetric RhuA is 1.5 times higher than in LB medium, and also productivity is increased.

As the main objective of this work is to maximize the enzyme production while minimizing cost, DM was chosen as the best option.

3.5 Optimization of induction

Optimization of IPTG concentration for recombinant protein synthesis induction is also an important aspect to consider because it is an expensive component. Studies were conducted in order to determine the minimum quantity of IPTG required to obtain maximum expression. As can be observed in Fig 6, $18\text{--}20 \mu\text{mol IPTG gDCW}^{-1}$ (corresponding to $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$) were enough to achieve the highest specific activity. This concentration is significantly lower than that routinely used for protein expression controlled by the lac promoter or that recommended by Qiagen ($1000 \mu\text{mol dm}^{-3}$).²³ This value represents an important factor to ensure optimal cell induction in future experiments at high cell density cultures.²⁴

3.6 Bioreactor experiments

The effect of induction time and temperature has been studied in 0.8 dm^3 batch aerated cultures. Figure 7(a) shows the growth of induced and non-induced cells of *E coli* M15 (pQErham) in DM. In order to obtain maximum RhuA specific activity levels, the highest cell concentration obtained under non-inducing conditions (12 gDCW dm^{-3}) was employed in order to calculate the amount of IPTG required for optimal induction ($176 \mu\text{mol}$). As with experiments in the Erlenmeyer flask, temperature was reduced from 37 to 30°C when inducing protein expression in order to minimize the formation of inclusion bodies and to favour correct folding of protein.⁸

Two induction times were assayed (5.6 h and 6.8 h). The growth rate decreased in both cases after induction and ceased at 12.0 h and 10.8 h respectively. Although both cultures were similarly affected by

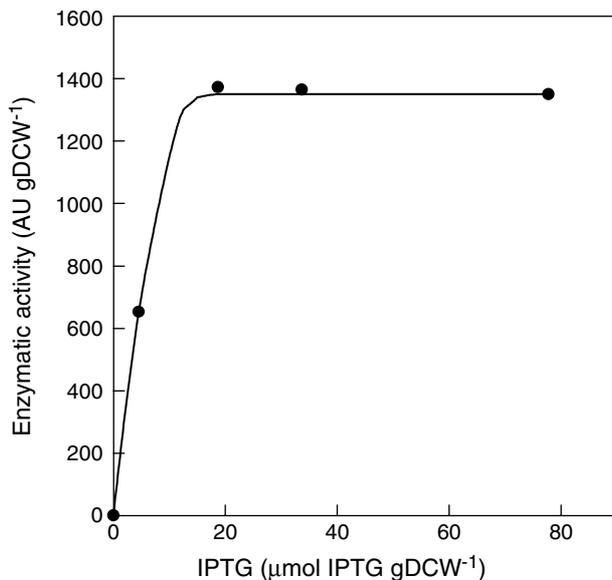


Figure 6. Effect of IPTG concentration on specific RhuA activity of *E coli* M15 (pQErham). Assays were done in Erlenmeyer flasks with DM. The growth was carried out at 37 °C and after induction, the temperature was decreased to 30 °C. To calculate the ratio $\mu\text{mol IPTG gDCW}^{-1}$, the final biomass obtained in Erlenmeyer flask cultures was taken for different IPTG concentrations studied (10, 30, 50, 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$). Experiments were performed in duplicate and the results are the average of each condition.

IPTG induction, the final biomass concentration was lower for the induction in an earlier stage (5.6 h), reaching only 5 gDCW dm^{-3} compared with 8 gDCW dm^{-3} when inducing later (6.8 h). The final biomass concentrations observed in both induction times were always lower compared with non-induced conditions.

The specific RhuA activity and glucose profiles are presented in Fig 7(b). A slightly higher specific RhuA activity was achieved by inducing at 5.6 h (1250 AU gDCW^{-1}) compared with the induction at 6.8 h (1040 AU gDCW^{-1}). These differences could be caused by glucose limitation at the end of fermentation; however, the volumetric production of RhuA was higher by inducing at 6.8 h (8333 AU dm^{-3}) compared with induction at 5.6 h (6021 AU dm^{-3}).

An additional culture without temperature reduction after induction was carried out in order to determine the effect of this variable on enzyme production. Figure 8 presents the results of two expression experiments carried out at the same induction time (5.6 h) and different temperatures after induction (30 and 37 °C). As shown in Fig 8(a), although the same final biomass concentrations are attained in both conditions, different times are required to achieve a stationary growth phase (7.5 h at 37 °C and 12 h at 30 °C). It has to be pointed out that cell growth stops 1.9 h after induction at 37 °C and 6.4 h at 30 °C. Similar final RhuA specific activity (1250 AU gDCW^{-1}) was reached 2–3 h after induction in both cases, the evolution profiles also being similar (Fig 8(b)). This suggests that the specific enzyme activity levels and specific enzyme production rate are not temperature

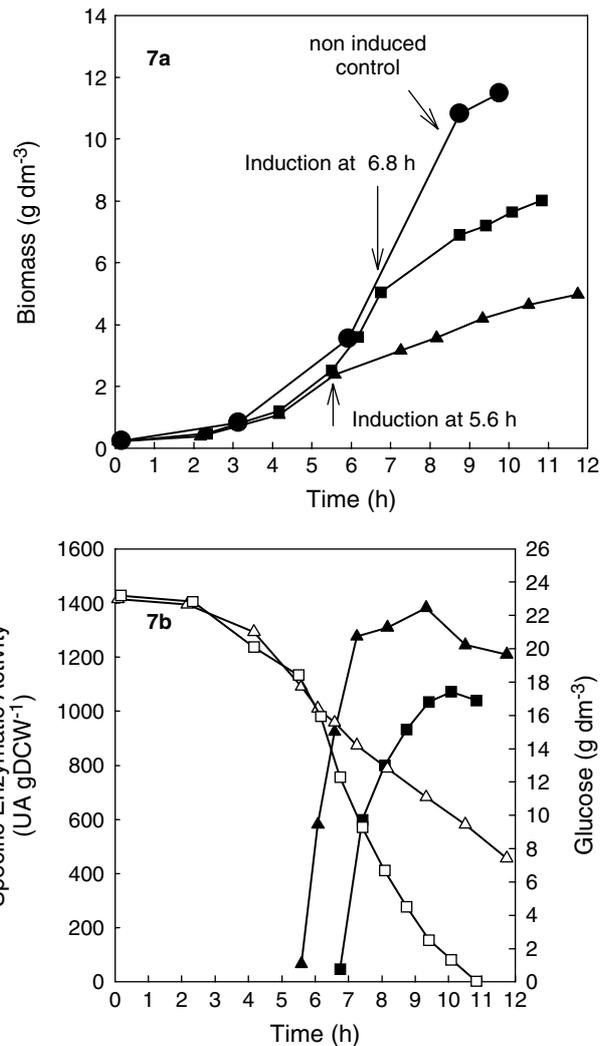


Figure 7. Cell growth curve at different time inductions (a) and glucose concentration and specific RhuA activity evolution (b) of *E coli* M15 (pQErham) growing in a 2 dm^3 fermenter with DM (working volume: 0.8 dm^3). Induction was done with 176 $\mu\text{mol IPTG}$. In (b), Full symbols correspond to biomass and specific enzymatic activity and empty symbols to glucose concentration.

dependent in the studied range. These results indicate that induction at 37 °C does not present more protein mis-folding than induction at 30 °C.

The volumetric enzyme production is faster at the induction temperature of 37 °C than 30 °C (Fig 8(c)). However, the final value reached is similar in both conditions (6000 AU dm^{-3}). Consequently, the productivity at 37 °C is higher (800 $\text{AU dm}^{-3} \text{h}^{-1}$) than at 30 °C (500 $\text{AU dm}^{-3} \text{h}^{-1}$).

Table 2 shows the specific growth rate (μ) and apparent biomass-glucose yield ($Y_{x/s}$) before and after induction for all the bioreactor experiments. As stated, the specific growth rate before induction corresponds to μ_{max} since the induction was made in the middle exponential growth phase; μ_{ind} corresponds to the highest specific growth rate after induction. There is a significant decrease in μ and $Y_{x/s}$ after addition of IPTG in all cases. This fact could be attributed to the metabolic response to recombinant protein overexpression. Concerning μ_{ind} , the decrease effect

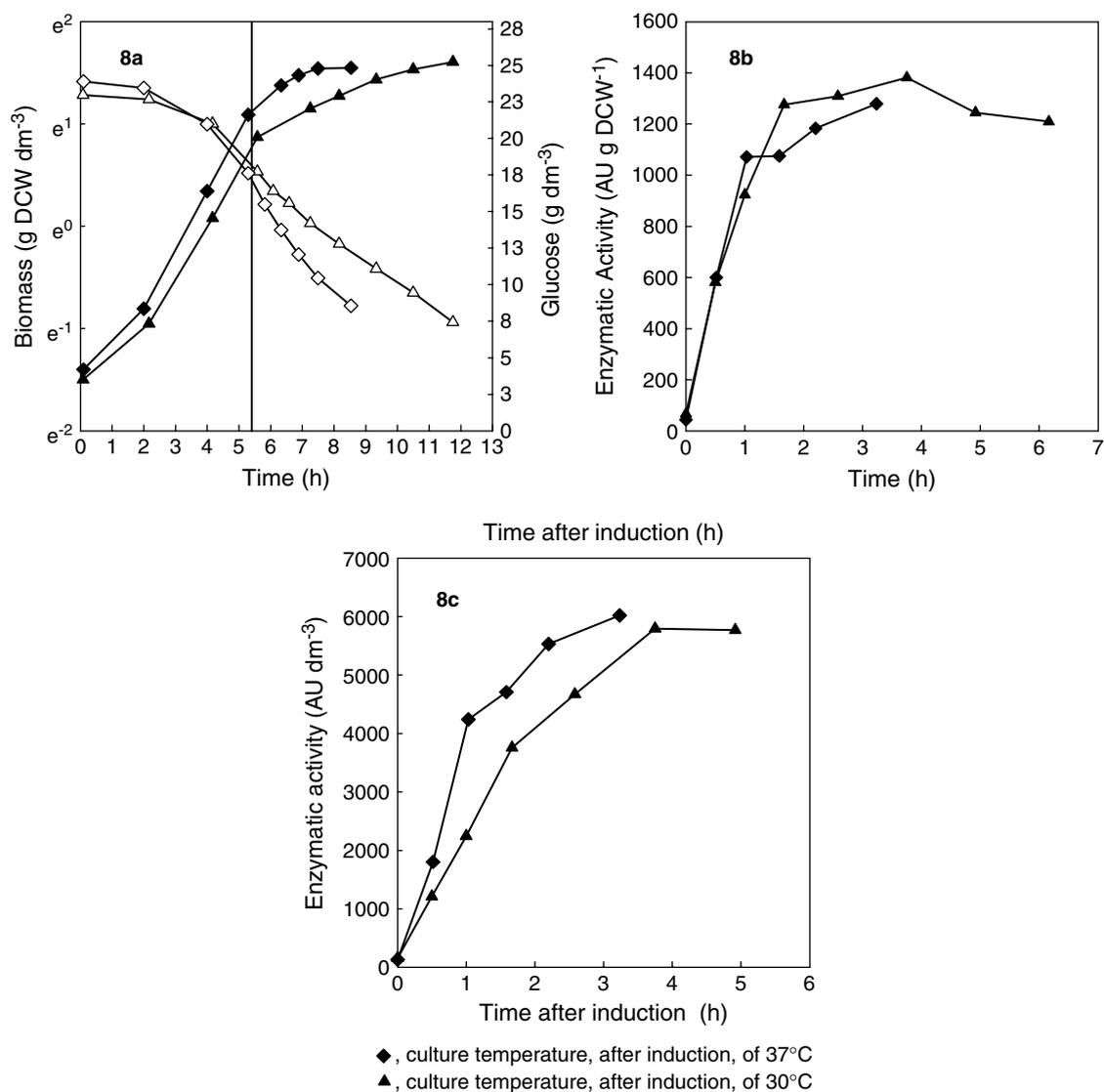


Figure 8. Effect of temperature after induction on growth and glucose consumption (a), (b) specific RhuA activity and (c) volumetric enzyme production for *E coli* M15 (pQErham) growing in a 2 dm³ fermenter with DM (working volume: 0.8 dm³). Induction was done with 176 μmol IPTG at 5.6 h. Full symbols correspond to biomass, volumetric enzyme production and specific RhuA activity and empty symbols to glucose concentration.

Table 2. Culture temperature, specific growth rate (μ), and apparent biomass/glucose yield ($Y_{X/S}$) before and after induction with IPTG for different batch fermentations

	Temperature (°C)		μ (h ⁻¹)		$Y_{X/S}$ (gDCW g glucose ⁻¹)	
	Before	After	Before (μ_{max})	After (μ_{ind})	Before	After
Fermentation A (without induction)	37	—	0.52	—	0.43	—
Fermentation B (induction at 6.8 h)	37	30	0.53	0.16	0.46	0.26
Fermentation C (induction at 5.6 h)	37	30	0.53	0.16	0.45	0.25
Fermentation D (induction at 5.6 h)	37	37	0.57	0.25	0.43	0.19

on specific growth rate seems to be caused mainly by the induction itself and less by the influence of a lower culture temperature.

In addition, apparent biomass/glucose yields are also lower after induction. For the induction at 37 °C this reduction effect seems to be higher, reflecting a greater influence of induction on metabolic behaviour.

Thus, an important conclusion from these experiments can be formulated: the maximum specific RhuA

activity of *E coli* M15 (pQErham) can be achieved working at an induction temperature between the range of 30 and 37 °C if there is no nutrient limitation.

3.7 Purification of RhuA

Finally, the purification sequence previously proposed was studied from the point of view of activity recovery. For this purpose, induced cells were disrupted as explained above. In a first step, 7 cm³ of centrifuged

cleared lysate supernatant containing 24 623 µg of total protein and 84.7 AU was loaded to the affinity column Ni-NTA. About 70% of RhuA activity was recovered in a high purity elution fraction. In the second chromatographic step, gel permeation was used, obtaining a 95% activity recovery. An overall RhuA purification yield of 66.5% was achieved. The purified enzyme had 6.2 AU mg⁻¹ protein, that means a 1.8-fold purification factor.

4 CONCLUSION

The studies presented in this work have demonstrated the suitability of the new recombinant *E coli* M15 (pQErham) strain in terms of culture performance using defined media, as well as specific aldolase production both at Erlenmeyer and bioreactor scale. These aspects, together with the advantage of an easy and effective purification system, allows the design and scale-up of an integrated process for high-level production of recombinant RhuA with high possibilities of success to be envisaged.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge financial support from CICYT (Projects: BIO99-1219-C02-01 and PPQ 2002-04625-C02-01). The Department of Chemical Engineering is the Unit of Biochemical Engineering of the Centre de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya (CeRBa). The authors thank also Dr Garcia-Junceda for supplying the strain and Dr Parella for the NMR spectra of rhamnulose 1-phosphate.

REFERENCES

- 1 Rojo J, Morales JC and Penades S, Carbohydrate-carbohydrate interactions in biological model systems. *Topics in Current Chemistry* **218**:45-92 (2002).
- 2 Wymer N and Toone EJ, Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Curr Opin Chem Biol* **4**:110-119 (2000).
- 3 Gijzen H, Qiao L, Fitz W and Wong CH, Recent advances in chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrates mimetics. *Chem Rev* **96**:443-473 (1996).
- 4 Takayama S, McGarvey GJ and Wong CH, Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars. *Annu Rev Microbiol* **51**:285-310 (1997).
- 5 Fessner WD, Sinerius G, Schneider A, Dreyer M, Schulz GC, Badía J and Aguilar J, Diastereoselective enzymatic aldol additions: L-rhamnulose and L-fuculose 1-phosphate aldolases from *E coli*. *Angew Chem Int Ed Engl* **30**:555-558 (1991).
- 6 Liu KKC, Kajimoto T, Chen L, Zhong Z, Ichikawa Y and Wong CH, Use of dihydroxyacetone phosphate dependant aldolases in the synthesis of deoxyzasugars. *J Org Chem* **56**:6280-6289 (1991).
- 7 Moris-varas F, Qian XH and Wong CH, Enzymatic/chemical synthesis and biological evaluation of seven-membered iminocyclitols. *J Am Chem Soc* **118**:7647-7652 (1996).
- 8 Garcia-Junceda E, Shen G, Sugai T and Wong C, A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of the three DHAP-dependent aldolases: rhamnulose-1-phosphate aldolase, fuculose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase. *Bioorgan Med Chem* **3**:945-953 (1995).
- 9 Sambrook J, Maniatis T and Fritsch EF, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- 10 Effenberg F and Straub A, A novel convenient preparation of dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions. *Tetrahedron Lett* **28**:1641-1644 (1987).
- 11 Jung SH, Jeong JH, Miller P and Wong CH, An efficient multigram-scale preparation of dihydroxyacetone phosphate. *J Org Chem* **59**:7182-7184 (1994).
- 12 Zagalak B, Frey P, Karabatsos GL and Abeles R, The stereochemistry of the conversion of D and L 1,2-propanediols to propionaldehyde. *J Biol Chem* **241**:3028-3035 (1996).
- 13 Fessner WD, Schneider A, Eyrich O, Sinerius G and Badía J, 6-Deoxy-L-lyxo- and 6-Deoxy-L-arabino-hexulose 1-phosphates, Enzymatic synthesis by antagonistic pathways. *Tetrahedron-Asymmetry* **4**:1183-1192 (1993).
- 14 Tjioe TT, Van der Wiel JP, Stickelman RM, Straathof AJJ and Van Rantwijk F, High-performance liquid chromatographic determination of glucose 1-phosphate and glucuronic acid 1-phosphate. *J Chromatogr* **330**:412-414 (1985).
- 15 Chiu TH and Feingold DS, L-Rhamnulose 1-phosphate aldolase from *E coli*. Crystallization and properties. *Biochem* **8**:98-108 (1969).
- 16 Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **7**:248-254 (1976).
- 17 Viaplana E and Villaverde A, Polylinker-encoded peptides can confer toxicity to recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **12**:723-727 (1996).
- 18 Miao F and Kompala DS, Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by T7 promoter: I. Batch cultures and kinetic modelling. *Biotechnol Bioeng* **40**:787-796 (1992).
- 19 Bentley WE, Mirjalili N, Andersen DC, Davis RH and Kompala DS, Plasmid-encoded protein: the principal factor in the 'metabolic burden' associated with recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng* **35**:668-681 (1990).
- 20 Yee L and Blanch HW, Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **41**:781-790 (1993).
- 21 Wilms B, Hauch A, Reuss M, Syldatk CCH, Mattes R, Siemann M and Altenbuchner J, High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rhaBAD* promoter. *Biotechnol Bioeng* **73**:95-103 (2001).
- 22 Fuchs C, Köster D, Wiebusch S, Mahr K, Eisbrenner G and Märkl H, Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli* *J Biotechnol* **93**: 243-251 (2002).
- 23 Donovan RS, Robinson CW and Glick BR, Review: optimising inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J Ind Microbiol* **16**:145-154 (1996).
- 24 Kweon D-H, Han NS, Park K-M and Seo J-H, Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem* **36**:537-542 (2001).

Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase production by *Escherichia coli* using the T5 promoter

Luis Vidal^{a,b}, Pau Ferrer^{a,b}, Gregorio Álvaro^{a,b},
M. Dolors Benaiges^{a,b}, Gloria Caminal^{a,b,*}

^a *Departament d'Enginyeria Química, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain*

^b *Unitat de Biocatàlisi Aplicada Associada al IIQAB (UAB-CSIC), Spain*

Received 16 June 2004; received in revised form 18 February 2005; accepted 25 February 2005

Abstract

Fed-batch culture techniques were employed to grow *Escherichia coli* at high-cell densities for the intracellular production of a recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase (RhuA) under the transcriptional control of the strong promoter T5, using a commercially available expression system (*E. coli* strain M15 and plasmid vector pQE40). A predetermined exponential feeding strategy at constant specific growth rate was selected to maintain carbon source limited growth using a defined medium. Growth rates below 0.36 h^{-1} did not cause a severe formation of acetic acid while cell concentration increased exponentially up to $95 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ l}^{-1}$. The intrinsic biomass-substrate yield ($\gamma_{X/S} = 0.48 \text{ g g}^{-1}$) and the maintenance coefficient ($m_S = 0.10 \text{ g}_{\text{substrate}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were calculated from fed-batch growths at different specific growth rates. These values have been employed to determinate the addition profile during the fed-batch growth until IPTG induction, reaching a specific RhuA production levels of $565 \text{ AU g}_{\text{biomass}}^{-1}$ which was lower than in batch ($1250 \text{ AU g}_{\text{biomass}}^{-1}$). An inverse correlation between volumetric IPTG concentration and specific RhuA activity was found. A correlation between the ratio biomass/OD_{600nm} and the quantity of recombinant protein produced was found. Finally, the proposed process, after optimization of the IPTG concentration, led to significant increase in enzyme concentration and volumetric productivity compared to batch mode (2680 and 1338%, respectively).

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fed-batch culture; Rhamnulose 1-phosphate aldolase; *Escherichia coli*; T5 promoter; Bioprocess design

1. Introduction

Aldolases are an interesting group of enzymes due to their ability to catalyze the formation of C–C bonds

* Corresponding author. Tel.: +34 935812144;
fax: +34 935812013.

E-mail address: gloria.caminal@uab.es (G. Caminal).

with a defined stereochemistry leading to enantiomerically pure products, even when the starting materials are non-chiral substrates (Gijsen et al., 1996). One of the most interesting groups of aldolases is the dihydroxy acetone phosphate (DHAP) dependent aldolases family. Rhamnulose 1-phosphate aldolase (RhuA) is one of the four DHAP dependent aldolases which, catalyzes in vivo the reversible cleavage of L-rhamnulose 1-phosphate to DHAP and L-lactaldehyde. This enzyme plays an important role in the central metabolism of L-rhamnose (Boronat and Aguilar, 1981). The retroaldol reaction employing RhuA as biocatalyst has been previously studied and it has been demonstrated that it can accept a wide range of natural and non-natural aldehydes for the stereoselective synthesis of 3R/4S diol compounds, such as carbohydrates and other derivatives of pharmaceutical interest (Fessner et al., 1991; Liu et al., 1991; Morís-Varas et al., 1996).

RhuA is not commercially available and therefore, there is a need for the development of a cost-effective production process in order to make RhuA economically attractive for the chemical industry and academic research. A first step towards this objective was done when RhuA from *Escherichia coli* K-12 was cloned into a plasmid vector controlled by a *trc* promoter and overexpressed as a recombinant his-tagged protein (Garcia-Junceda et al., 1995). Recently, the use of a commercially available low-copy expression plasmid with the strong promoter T5 (*E. coli* M15/vector pQE40, from Quiagen, Germany) led to high intracellular RhuA synthesis levels after optimizing the induction conditions in batch cultures (Vidal et al., 2003).

A suitable strategy to obtain higher levels of intracellular recombinant protein could be to operate in fed-batch mode to obtain high-cell density cultures (Yee and Blanch, 1993a; Wilms et al., 2001). By employing fed-batch cultures, cell densities up to 148 g l^{-1} have been reported for recombinant *E. coli* (Korz et al., 1995). More recently, values above 200 g l^{-1} have been reported for dialysis cultivations (Fuchs et al., 2002). Different feeding methods can be found in literature; in this study, a predetermined exponential feeding strategy to maintain specific growth rate (μ) constant has been chosen. The selection of an appropriate specific growth rate will allow the control of acetate formation, which occurs at growth rates above 0.30 h^{-1} (Keehyun et al., 1992; Suarez and Kilikian, 2000). Moreover, by using defined media, nutrients concentration (glu-

cose, ammonia, magnesium, phosphorus, zinc, etc.) can be controlled below inhibition levels to maintain cell growth (Yee and Blanch, 1992). Other considerations must be taken into account for recombinant protein production such as the host strain selection, the plasmid copy number and induction strategy. Obviously, each case must be studied if optimization of the process is desired. In this context, no systematic optimization studies of recombinant protein production processes using high-cell density cultivations strategies based on commercially available *E. coli* expression systems, such the one employed in this study, have been reported.

In this study, the capacity of *E. coli* M15 for recombinant RhuA overexpression using a pQE-based system (QUIAGEN) and the effect of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration in different operation modes (batch and fed-batch) has been investigated with the aim to develop a suitable production process for this enzyme.

2. Materials and methods

2.1. Strain

The construction of *E. coli* M15 (pQErham) strain has been previously described (Vidal et al., 2003). The strain was conserved at -80°C in glycerol stocks prepared from exponential phase cultures in Luria–Bertani (LB) medium.

2.2. Media

LB medium was used for preinoculum cultures. It was supplemented with ampicillin and kanamycin to a final concentration of 100 and 25 mg l^{-1} , respectively.

The defined medium (DM) used contained (g l^{-1}): $13.2 \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $2.6 \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $4.1 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4$, 2.0 NaCl , $0.5 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.025 FeCl_3 , 0.033 citrate ; 3.2 ml l^{-1} trace elements solution (TES); thiamine, ampicillin and kanamycin at a final concentration of 100, 100 and 25 mg l^{-1} , respectively, and glucose at different concentrations depending on the experiment. TES contained (g l^{-1}): $1.44 \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.042 \text{ AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.87 \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.16 \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.6 CuSO_4 , $0.01 \text{ H}_3\text{BO}_3$, $1.42 \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.01 \text{ NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.02 \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Vitamin,

antibiotics, TES, FeCl₃ and IPTG were filter-sterilized (0.2 μm). Glucose and salt solution were sterilized separately by autoclaving at 121 °C for 20 min.

The feed medium used in fed-batch experiments contained (g l⁻¹): 580 glucose, 11.6 MgSO₄·7H₂O, 0.6 FeCl₃, 0.35 ampicillin, 0.09 kanamycin, 0.4 thiamine and TES 78 ml l⁻¹.

Phosphates were not included in the feeding medium to avoid precipitations. A separated stock solution containing 500 g l⁻¹ K₂HPO₄ and 100 g l⁻¹ KH₂PO₄ was sterilized separately by autoclaving and added by pulses.

2.3. Cultivation conditions

Preinoculum cultures of *E. coli* were grown from glycerol stocks in a 100 ml shake flask containing 15 ml LB media and incubated overnight at 37 °C on a rotary shaker at 250 rpm. A final OD_{600 nm} = 3–4 was usually achieved. To prepare inoculum culture, 15 ml of preinoculum culture was transferred to a 1 liter shake flask containing 200 ml of DM medium with glucose 10 g l⁻¹ and it was incubated at 37 °C for 13 h with shaking at 250 rpm. A final OD_{600 nm} of 4–5 was usually achieved.

For bioreactor experiments, 80 ml of inoculum culture were transferred to the bioreactor containing 720 ml of DM medium with 25 g l⁻¹ glucose. All growths were carried out using a Biostat[®] B bioreactor (Braun Biotech Int.) equipped with a 2 l jar. The pH was maintained at 7.00 ± 0.05 by adding 2 M H₂SO₄ or 25% (w/v) NH₄OH solution to the reactor. The temperature was kept at 37 °C throughout the growth. The pO₂ value was maintained to 50% saturation by adapting the stirrer speed between 450 and 960 rpm and supplying air and/or pure oxygen at a flow rate of 2 vvm. Foaming was suppressed by controlled supply of 50% (v/v) silicone-antifoam (Fluka).

2.4. Fed-batch experiments

All fed-batch experiments were performed using a predetermined exponential feeding profile to keep specific growth rate constant (Korz et al., 1995). Glucose was the limiting substrate. Feeding solution was supplied in a discrete way using an automatic microburette (MICRO BU 2030, Crison Instruments and Microliter Syringe, Hamilton) of 2.5 ml capacity. When glucose

depletion was achieved after the batch step (near 8 h after inoculation), substrate feeding was initiated.

Material balance of glucose and biomass in a fed-batch bioreactor can be combined and integrated between a time $t_0 = 0$ and a time $t = t$ to obtain a continuous feeding equation. Assuming that the variation of volume between time $t_0 = 0$ and time t is only due to the feed introduced, the following equation is obtained for discrete additions (Durany et al., 2005):

$$\Delta V = V - V_0 = \frac{X_0 V_0}{S_f Y_{X/S}} (\exp(\mu_{\text{set}} t) - 1) \quad (1)$$

where ΔV is the feeding solution to be added at time t (l); V the liquid volume in the bioreactor at time t (l); V_0 the liquid volume in the bioreactor at time t_0 (l); μ_{set} the desired specific growth rate (h⁻¹); X_0 the biomass concentration at time t_0 (g_{biomass} l⁻¹); t the actual time (h); S_f the glucose concentration in the feed solution (g_{glucose} l⁻¹); $Y_{X/S_{\text{ap}}}$ the apparent yield (g_{biomass} g_{glucose}⁻¹). Eq. (1) was implemented in a Visual Basic Program to command the microburette additions of the feeding solution (Durany et al., 2005).

2.5. Analytical methods

Growth of *E. coli* was monitored by optical density measurements at 600 nm using a spectrophotometer (Uvicon 941 Plus, Kontron). Samples were diluted with distilled water until the final OD_{600 nm} value was in the range of 0.3–0.9. The biomass was expressed as dry cell weight (DCW). This was measured by withdrawing 25 ml of the medium and centrifuged at 5000 × *g* for 20 min at 4 °C; the pellets were washed once with 30 ml of deionized water and dried at 100 °C for 24 h until constant weight.

For other determinations, one millilitre of culture medium was clarified by centrifugation at 13,000 × *g* for 5 min. The supernatant was then used for glucose, organic acids, ammonium and phosphate measurements. Glucose, acetic and lactic acid were analyzed by HPLC (Hewlett Packard 1050) on an Aminex HPX-87H (Biorad) column at 25 °C with IR detector (HP 1047) using 15 mmol l⁻¹ H₂SO₄ (pH 3.0) as eluent, and a flow rate of 0.6 ml min⁻¹. Ammonium was determined by continuous flow analysis (CFA) as previously described (Baeza et al., 1999). Phosphate concentration was determined by capillary electrophoresis using a Capillary Ion Analyzer (Waters, QANTA 4000E)

with a 75 $\mu\text{m} \times 60$ cm fused silica capillary and Waters IonSelectTM High Mobility Anion electrolyte at 20 °C.

2.6. Enzyme activity for RhuA

Determination of RhuA activity was carried out as described by Vidal et al. (2003). One unit of RhuA activity was defined as the amount of enzyme required to convert 1 μmol of rhamnulose 1-phosphate in DHAP per minute at 25 °C.

2.7. Plasmid stability assay

Bioreactor samples were diluted with sterile 0.9% NaCl and plated per duplicate on LB agar plates with and without ampicillin supplementation. The fraction of plasmid-containing cells was calculated as the average ratio of viable colonies on LB with antibiotic to those on LB without antibiotic.

3. Results and discussion

Initial growth experiments at different theoretical growth rates (with a fixed apparent yield biomass per glucose) were carried out in order to set the programmed pattern of exponential feeding. Once determined the parameters of the model from the experimental data, the inductions experiments were made.

3.1. Set up of fed-batch growth

The selected control strategy for fed-batch mode operation of *E. coli* M15 (pQErham) was a pre-determined exponential feeding profile, i.e. allowing to keep a specific growth rate constant. The feeding solution was supplied as specified in Section 2 according to Eq. (1), where values of apparent biomass/glucose yield ($Y_{X/S}$) and specific growth rate (μ_{set}) parameters should be fixed. In fed-batch cultures at high-cell densities, the fraction of glucose consumed for cell maintenance purposes may be relevant. As it is well known, the intrinsic yield value ($\gamma_{X/S}$) is higher than apparent biomass/glucose yield, which includes maintenance term. As a first approximation, a $Y_{X/S} = 0.3$ was fixed for fed-batch cultures. At this fixed yield, fed-batch cultures were carried out changing the μ_{set} from 0.1 up to 0.3 h^{-1} . In all cases, the evolution pro-

files for glucose, phosphate, ammonium and organic acids were similar. Fig. 1 shows a fed-batch experiment carried out at fixed μ_{set} of 0.3 h^{-1} . A first batch step (about 8 h) was performed until glucose depletion was achieved. Although high values of μ were achieved during batch step ($\mu = 0.5 \text{ h}^{-1}$), acetate concentration only reached 1.3 g l^{-1} , which was below inhibitory levels (5 g l^{-1}) (Lee, 1996). This acid was quickly consumed at the beginning of the fed-batch step. Immediately after the batch step, a sudden increase in pH from 6.95 was detected as a consequence of a change in the metabolism of *E. coli* due to glucose depletion. After this increase of pH, the feeding was started being glucose the limiting substrate. Glucose concentration throughout fed-batch step was practically zero. The ammonium concentration was between 0.7 and 1.5 g l^{-1} . These values avoided nitrogen limitation and also, a possible inhibitory effect by ammonium described for values over 3 g l^{-1} (Thompson et al., 1985). Punctual phosphate additions avoided the depletion of phosphorous. The yield coefficients for ammonium and phosphate during fed-batch were $Y_{X/\text{NH}_4^+} = 9.3 \text{ g g}^{-1}$ and $Y_{X/\text{PO}_4^{2-}} = 10.0 \text{ g g}^{-1}$. Even though the dissolved oxygen signal did not show any oxygen limitation, acetate and lactate increased up at the end of fed-batch step up to 1.3 and 0.4 g l^{-1} , respectively.

The acetate production is one of the main problems in fed-batch cultures of *E. coli* because high concentrations may inhibit cell growth. A suitable solution consists in operating at growth rates below 0.3 h^{-1} and thus, avoiding its formation (Wilms et al., 2001; Yoon and Kang, 1994; Li et al., 1998). Using this strategy, the fed-batch cultures of *E. coli* M15 (pQErham) did not reach the acetate inhibitory levels in any case.

The final biomass obtained in this experiment was 95 g l^{-1} (equivalent to an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 256). Since the medium composition had been stoichiometrically defined to support up to 100 g l^{-1} of biomass, and taking into account that the bioreactor design, in terms of oxygen transfer, does not allow to overcome this biomass concentration, an increase of nutrients concentration in the medium formulation was not considered.

During the fed-batch step, a constant growth rate could be maintained. However, the calculated value ($\mu_{\text{exp}} = 0.36 \text{ h}^{-1}$) was higher than the pre-fixed one ($\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$; Eq. (1)). Moreover, the experimental apparent yield (0.41 g g^{-1}) was also higher than that used in the mass balance equation ($Y_{X/S} = 0.3$, Eq. (1)).

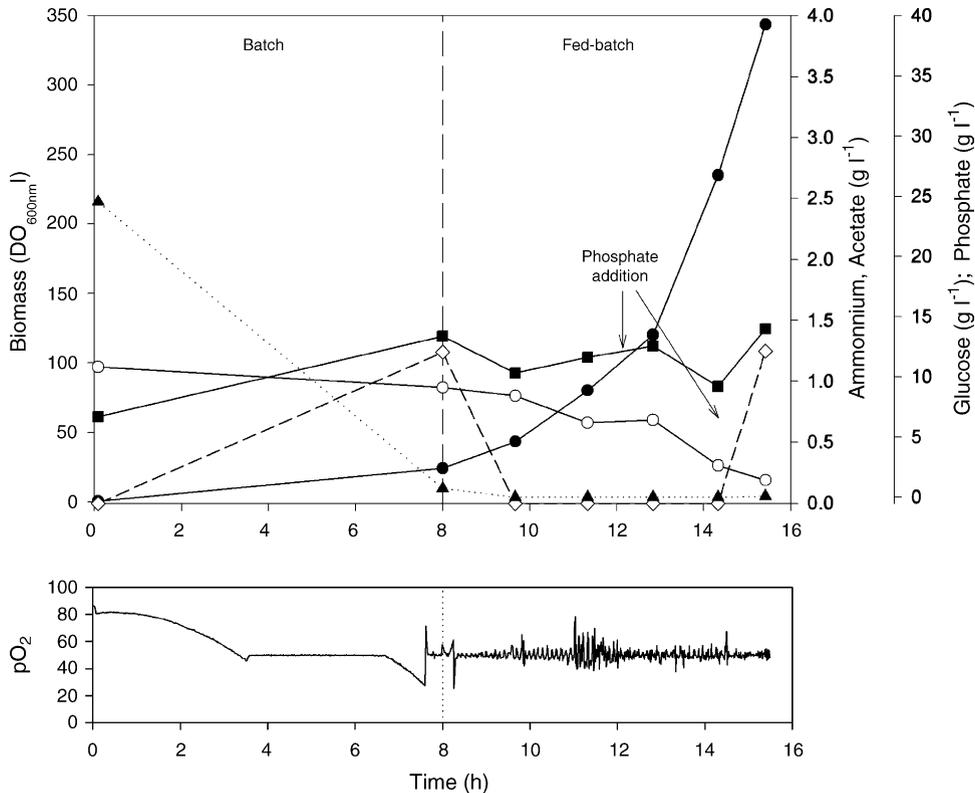


Fig. 1. Time course of a non-induced fed-batch growth of *E. coli* M15 (pQErhan) in defined medium ($\mu_{\text{exp}} = 0.37 \text{ h}^{-1}$): (●) biomass ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ l); (▲) glucose (g l^{-1}); (■) ammonium (g l^{-1}); (○) phosphate (g l^{-1}) and (◇) acetate (g l^{-1}).

In fact, the apparent yield is defined as

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} \quad (2)$$

where r_X is the biomass production rate and r_S the glucose consumption rate, which can be expressed as $r_X = \mu X$ and $r_S = \frac{\mu}{\gamma_{X/S}} X + m_S X$, where $\gamma_{X/S}$ is the intrinsic biomass/glucose yield and m_S the maintenance coefficient. These expressions can be combined to lead:

$$Y_{X/S} = \frac{1}{\frac{1}{\gamma_{X/S}} + \frac{m_S}{\mu}} \quad (3)$$

Therefore, from fed-batch experiments carried out at different constant growth rate, it is possible to obtain the maintenance coefficient and the intrinsic yield values.

The theoretic (set) and experimental (exp) values of μ and $Y_{X/S}$ for these experiments are presented in Table 1. The lineal correlation be-

tween $(Y_{X/S})_{\text{exp}}^{-1}$ and μ_{exp}^{-1} allows to calculate the equation coefficients: $m_S = 0.095 \text{ g}_{\text{substrate}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $\gamma_{X/S} = 0.439 \text{ g g}^{-1}$, with a correlation factor of $r^2 = 0.975$. These values introduced in Eq. (3) lead to calculate the right apparent yield for a specific μ and

Table 1

Theoretic (set) and experimental (exp) specific growth rate (μ) and apparent biomass/glucose yield ($Y_{X/S}$) for several fed-batch experiments

$(Y_{X/S})_{\text{set}}$	μ_{set} (h^{-1})	μ_{exp} (h^{-1})	$(Y_{X/S})_{\text{exp}}$	X ($\text{g}_{\text{biomass}} \text{ l}^{-1}$)	Time (h)
0.3	0.1	0.086	0.294	30.9	23.5
0.3	0.1	0.087	0.289	43.4	25.0
0.3	0.1	0.107	0.329	95.4	33.3
0.3	0.2	0.234	0.376	91.6	19.7
0.3	0.3	0.361	0.385	95.1	15.4

Final biomass concentration reached at corresponding final time experiment. The initial batch step in all these experiments had as average $\mu = 0.5 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0.45$; $X = 11 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ l}^{-1}$ a duration time of 8 h.

it allows controlling the growth at the desired μ_{set} in the fed-batch step. It is important to remark that every *E. coli* strain has its own m_S and $\gamma_{X/S}$. For instance, a $m_S = 0.04 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $\gamma_{X/S} = 0.5 \text{ g g}^{-1}$ has been reported for a recombinant *E. coli* BL21 strain to L-carbamoylase production (Wilms et al., 2001), and a $m_S = 0$ and $\gamma_{X/S} = 0.42$ for a recombinant *E. coli* X90 strain in glucose-limited chemostat cultures (Yee and Blanch, 1993b).

Also, the maximum biomass concentration values achieved at different μ_{set} are presented in Table 1. Biomass levels obtained for two first experiments at $\mu_{\text{set}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$ were lower due to operational problems. For the others experiments, similar biomass levels were reached (around 95 g l^{-1}) independently of the specific growth rate. This biomass concentration was considered high enough for the recombinant aldolase production.

3.2. Recombinant RhuA production in fed-batch cultures

The use of the strong promoter systems often leads to a sudden protein synthesis which may inhibit cell growth due to a severe metabolic burden (Hoffmann et al., 2002). In batch cultures employing different media and induction conditions, cell growth rate of *E. coli* M15 (pQErham) decreased very quickly when IPTG was added and maximal RhuA specific activity was achieved 2 h after induction (Vidal et al., 2003). This characteristic influences in the selection of induction time. Thus, in this study in order to maximize volumetric activity, induction in fed-batch cultures was performed 2 h before the maximum biomass concentration could be achieved.

As described in Section 2, the amount of Zn^{2+} in both the defined basal medium and the feeding solution was initially calculated to support growth up to 100 g l^{-1} of biomass using the referenced ratio of $0.05 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1}$ (Mak et al., 1995). However, given that RhuA is a tetramer metallo-enzyme which contains per mole of enzyme 2 g Zn^{2+} (Schwartz et al., 1974), it may be expected that zinc cell requirements will increase after induction. For this reason, zinc biomass content from an induced culture with a specific activity around $1200 \text{ AU g}_{\text{biomass}}^{-1}$ was analyzed by atomic adsorption. Results revealed a ratio of $0.103 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1}$. As consequence, a pulse of

ZnSO_4 solution containing 10 mg Zn^{2+} was supplied in all cultures before enzyme induction in order to have this trace element in excess.

To select adequate growth rate for enzyme production, it has been taking into account that no considerable acetic acid formation was detected in non-induced fed-batch growths, even working at $\mu_{\text{exp}} = 0.36 \text{ h}^{-1}$. However, at the end of each batch step ($\mu_{\text{max}} = 0.5 \text{ h}^{-1}$) acetic acid production was relevant, suggesting that acetate formation may occur at growth rates between 0.36 and 0.5 h^{-1} . To carry out the following experiments, a μ_{set} of 0.3 h^{-1} was chosen because the productivity of the process will be obviously higher due to the operational time saving.

In previous batch studies, a ratio of $18\text{--}20 \mu\text{mol IPTG g}_{\text{biomass}}^{-1}$ was used obtaining maximal specific activity 2 h after the induction. Following the same criteria, the biomass concentration for cells growing at $\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$ was estimated 2 h before maximum reached ($95 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ l}^{-1}$). Thus, the induction was carried out when $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ was around 160.

Cultivation data from the first induced fed-batch experiment at $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$ are shown in Fig. 2. As expected, before induction, the cultivation follows the same behaviour that one presented in Fig. 1. Growth rate progressively decreased and stopped around 2 h after induction. The final biomass was experimentally determined as $70.2 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ l}^{-1}$. Glucose and acetate began to accumulate in the medium up to 40 and 3 g l^{-1} , respectively, after induction, without arriving at inhibitory levels. The evolution profiles of the RhuA specific activity and organic acids production are shown in Fig. 3. RhuA levels reached a maximum value of $565 \text{ AU g}_{\text{biomass}}^{-1}$, which is considerably lower than the $1250 \text{ AU g}_{\text{biomass}}^{-1}$ obtained in previous batch experiments.

A possible explanation to those observations may be related to the strong metabolic burden suffered by the cell associated to overexpression of RhuA after induction of the T5 promoter. It is well known that a high-energy demand for a non-growth-related process (in this case, the synthesis of the recombinant protein) can decrease the observed biomass yield coefficient (Bhattacharya and Dubey, 1995). Besides, a higher energy demand increases the catabolic fluxes for energy generation (Weber et al., 2002) and reduces the material available for biosynthesis and cell growth, i.e. negatively affecting the growth rate (Hoffmann et al., 2002).

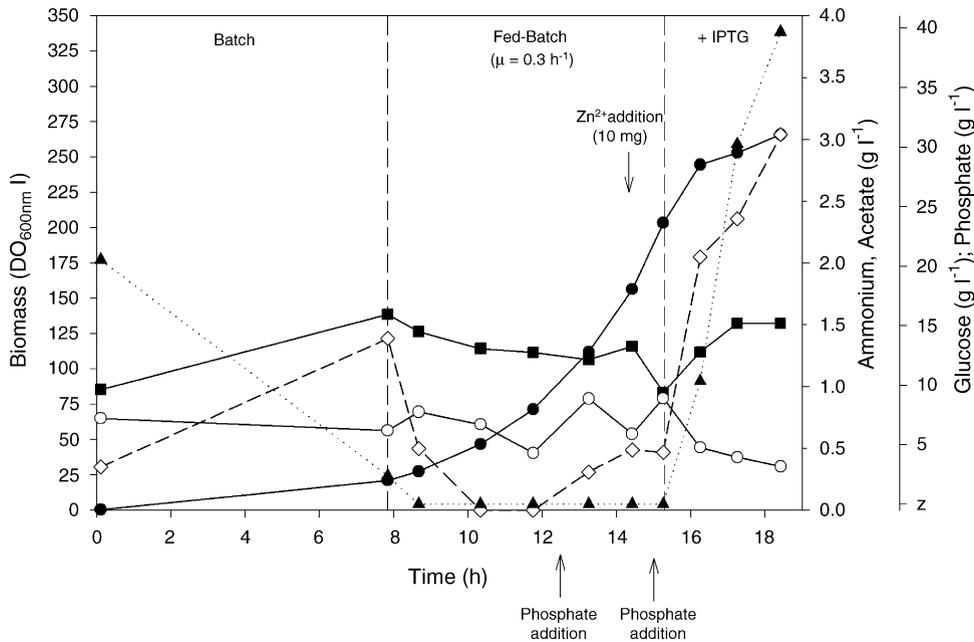


Fig. 2. Time course of an induced fed-batch growth of *E. coli* M15 (pQErlan) in defined medium ($\mu_{\text{exp}} = 0.31 \text{ h}^{-1}$). IPTG was added at a final concentration of $1433 \mu\text{mol l}^{-1}$: (●) biomass ($\text{OD}_{600\text{nm l}}$); (▲) glucose (g l^{-1}); (■) ammonium (g l^{-1}); (○) phosphate (g l^{-1}) and (◇) acetate (g l^{-1}).

Additionally, metabolic adaptation to the increased energy demands could be the cause of the increase in acetate formation. Since the set values of μ_{set} and $Y_{X/S}$ in feed equation (1) were not modified during the induction phase, the addition program assumed these parameters constant even though they changed. Through this phase, more substrate than required was consequently added and glucose accumulated.

3.3. Effect of aminoacid additions

Two factors were initially considered to be responsible for the reduced recombinant product yield. First, a limited availability of aminoacids for protein biosynthesis due to a higher drainage of metabolite intermediates towards the energy-yielding metabolism. Second, a negative effect of acetate formation over recombinant protein production (Bech Jensen and Carlsen, 1990; Brown et al., 1985).

Thus, in a first attempt to increase the specific productivity of recombinant RhuA, co-addition of powdered casaminoacids (1% (w/v) final concentration) to the reactor simultaneously to the addition of IPTG

was studied. In principle, the supply of a source of aminoacids should result in a reduction of energetic demand, since cells would not need to synthesize them de novo, acetate formation would be also minimized. However, even though acetate concentration diminished (0.5 g l^{-1}), the maximum RhuA specific activity reached ($415 \text{ AU g}_{\text{biomass}}^{-1}$) was lower than the previous experiment. Moreover, glucose accumulated up to similar levels (34 g l^{-1}) and lactate formation was significant (Fig. 3C).

Secondly, in order to avoid glucose and organic acids accumulation and, if possible, to increase the specific enzyme activity, a decrease of the μ_{set} at induction time in the feed equation (1) was considered. Additionally, supplementation with complex LB medium (0.75% (w/v) final concentration) was chosen instead of casaminoacids. It has been reported that the addition of yeast extract is more effective than other aminoacid and complex protein supplements (i.e. casaminoacids) for enhancing overall protein expression in several *E. coli* strains (Donovan et al., 1996). When μ_{set} was fixed at 0.1 h^{-1} at induction time with the simultaneous addition of LB as aminoacid source, glucose accumulation

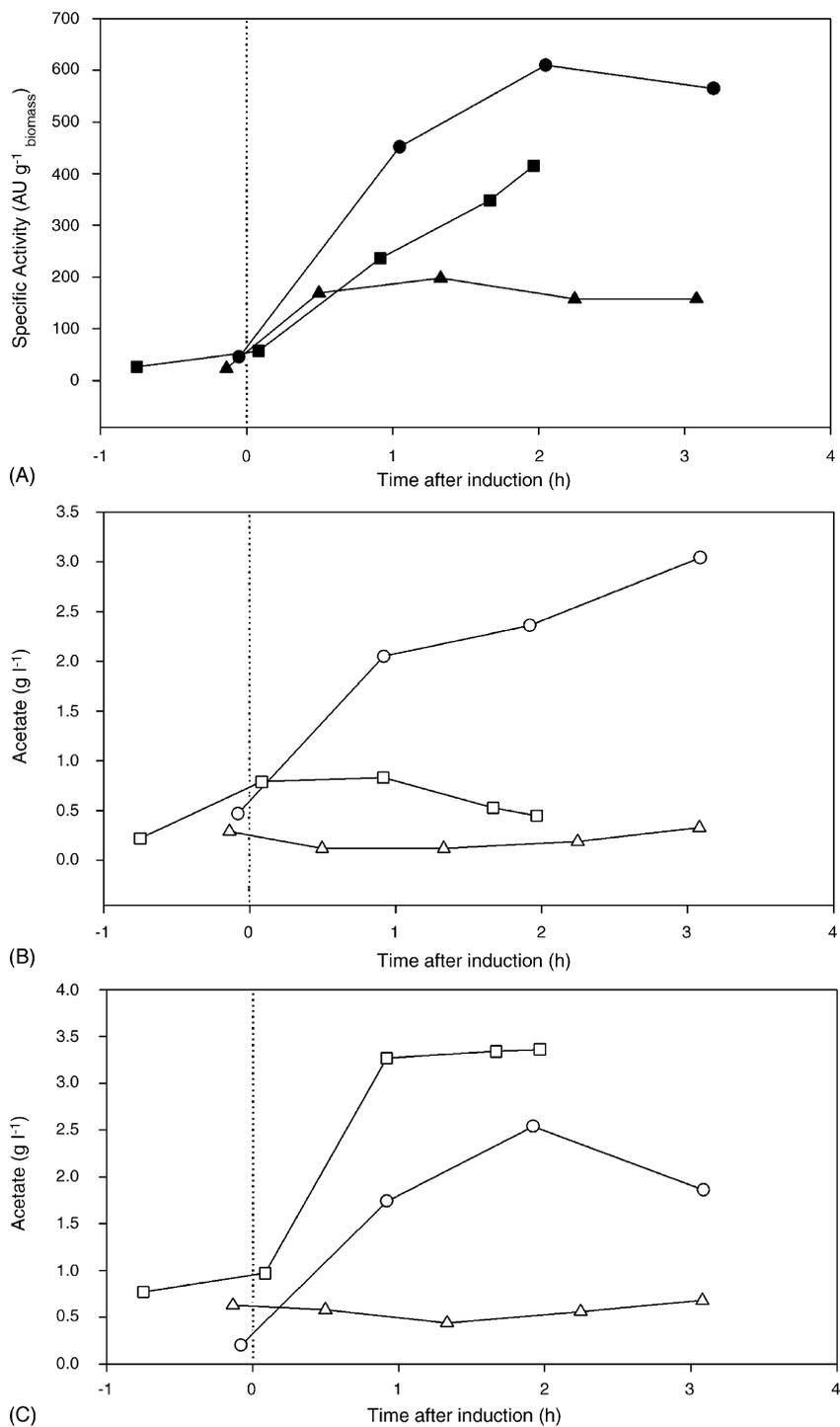


Fig. 3. Influence of an aminoacid source addition during induction in fed-batch operation mode; without aminoacid addition (●, ○); with casaminoacid addition (■, □); with LB powder and $\mu_{set}=0.1$ (▲, △) at induction time: (A) effect over RhuA production; (B) acetate production; (C) lactate production.

was not observed and acetate and lactate were produced up to 0.65 and 1.0 g l⁻¹, respectively. However, specific RhuA activity did not increase (197 AU g_{biomass}⁻¹).

3.4. Effect of antibiotic pulse additions

A third hypothesis to consider in order to explain the lower specific activity obtained in fed-batch cultures, even after aminoacid supplementation and organic acid and glucose concentrations were controlled, was plasmid segregational instability. This phenomenon, together with a high metabolic burden, has been described to be the reason for low specific productivities when using high-copy number plasmid systems (Wilms et al., 2001). This observation led us to select a low-copy number expression plasmid (pQE-40) for *rhaD* gene expression. However, when plasmid stability was checked during the fed-batch phase previous to induction, less than 30% of the cells carried the pQErham plasmid (data not shown). This result would partially explain the low specific activity levels obtained compared with batch mode cultures. A possible explanation for this observation would be the decrease of the ampicillin concentration in culture medium due to its degradation by β -lactamase encoded by the pQE vector resulting in the loss of selective pressure. Jung et al. (1988) reported that ampicillin at concentration of 100 mg l⁻¹ can be degraded in less than 30 min by the secreted β -lactamase in high-cell density cultures. As a result, a heterologous population could be present, where only a fraction of the cell population would be capable of synthesizing the recombinant protein. In the present case, discrete ampicillin pulse additions in the reactor medium during the fed-batch phase previous to induction seemed to solve this trouble. It was observed that after two separated pulses of ampicillin stock (100 mg each) before induction, plasmid stability increased up to 100%. However, specific activity did not increase even when ampicillin pulses were added.

3.5. Effect of IPTG concentration

In previous experiments in shake flask cultures, the optimal concentration of IPTG for a complete titration of repressor molecules was 30 μ mol l⁻¹ which is considerable lower than the recommended value by QIAGEN (1000 μ mol l⁻¹). Although the IPTG quantity

used for expression in *lac*-based promoters systems are given in mmol l⁻¹, we initially considered appropriated for high-cell density cultures to express the IPTG quantity for induction by gram of biomass rather than in volumetric units. The calculated value from shake flask experiments was 20 μ mol g_{biomass}⁻¹ and was used as a reference parameter for the initial set of fed-batch induction experiments. However, this strategy resulted in a lower specific RhuA activity compared to those previously obtained in batch mode. Thus, the effect of IPTG over RhuA production was studied in a new range of IPTG concentration.

An inverse correlation was found between volumetric IPTG concentration and specific RhuA activity (Fig. 4), being this effect independent of the cultivation mode (shake flask, batch bioreactor or fed-batch bioreactor). Hence, the specific RhuA activity increases with the decrease of IPTG concentration within the range of IPTG concentration studied. Remarkably, it was not possible to obtain the same level of specific activity working in fed-batch or in batch mode at the same IPTG concentration.

To try to understand the phenomenon concerning the specific RhuA activity level and IPTG concentration, two parameters were analyzed from fed-batch experiments: the specific growth rate and specific enzyme production rates (q_p) profiles. Fig. 5 shows the evolution of these parameters after induction for three different IPTG volumetric concentrations (148, 791 and 1433 μ mol l⁻¹). After induction, specific growth rate decreased for all IPTG concentrations assayed (Fig. 5A). Besides, the reduction was more severe at higher IPTG concentrations. The q_p also decreased progressively after induction (Fig. 5B) and the decay rate ($-d(q_p)/dt$) was directly proportional to the volumetric IPTG concentration assayed (Fig. 5C). In summary, growth and enzyme production rates are reduced with the increase of IPTG concentration but for all the strategies (batch and fed-batch).

A possible explanation for the different protein yields obtained in both operation modes (batch and fed-batch) could be the different physiological state of the cells. It is obvious that the cellular responses to substrate limiting conditions will not be the same compared to an unrestricted culture. In fed-batch mode, cells have been growing in a substrate limiting condition possibly leading to the synthesis of stress proteins and concomitant intensifying protein degradation.

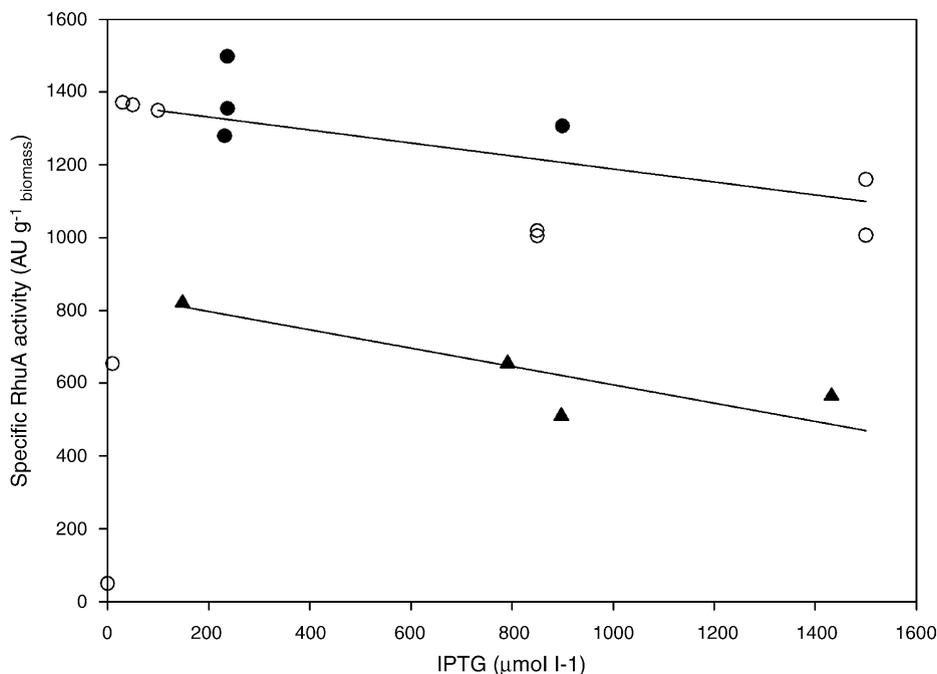


Fig. 4. Effect of IPTG concentration on specific activity. Experimental points are for all batch assays in flask (○) and in bioreactor (●); fed-batch operation experiments (▲).

Other factors to consider are mRNA instability, distribution of the microbial cell population stages and limited transcription and translation kinetics. Besides, we do not exclude the possibility that RhuA overexpression may become critical on cell viability under fed-batch conditions.

With the aim to compare the RhuA production in fed-batch and batch modes, the maximum enzyme concentration and volumetric productivity are presented in Table 2. As can be observed, these two variables present a significant increase compared to batch mode (2680 and 1338%, respectively) that means an unambiguous process improvement, coinciding with the main objective of this work.

Table 2

Comparison between the two operation modes from the point of view of enzyme production evaluation

Operation mode	Specific activity (AU g _{biomass} ⁻¹)	Concentration (AU l ⁻¹)	Productivity (AU l ⁻¹ h ⁻¹)
Batch	1250	2292	255
Fed-batch	850	61436	3413

3.6. Variation of the biomass/OD_{600nm} ratio as function of RhuA specific activity

In previous batch work (Vidal et al., 2003) a significant decrease of the ratio $g_{\text{biomass}} l^{-1} OD_{600\text{nm}}^{-1}$ after induction was pointed out. Lee et al. (1994) observed a similar phenomenon during polyhydroxy butyrate (PHB) production from a recombinant *E. coli* XL1 Blue, where OD_{600nm} continuously increased due to accumulation of PHB even after cell growth stopped. In spite of the fact that no apparent changes in induced *E. coli* M15 (pQErham) morphology were observed by electronic microscopy (scanning and transmission) compared to non-induced cells, the variation of the relationship between biomass and OD_{600nm} has to be attributed to changes in cell composition, specifically to the accumulation of the recombinant protein expressed. For this reason, after each induction experiment, biomass was calculated and a new ratio determined from experimental data. Interestingly, a new relationship was found between the ratio and specific RhuA activity level (Fig. 6). Variations of the ratio between 0.39 and 0.25 were considered significant because mean a

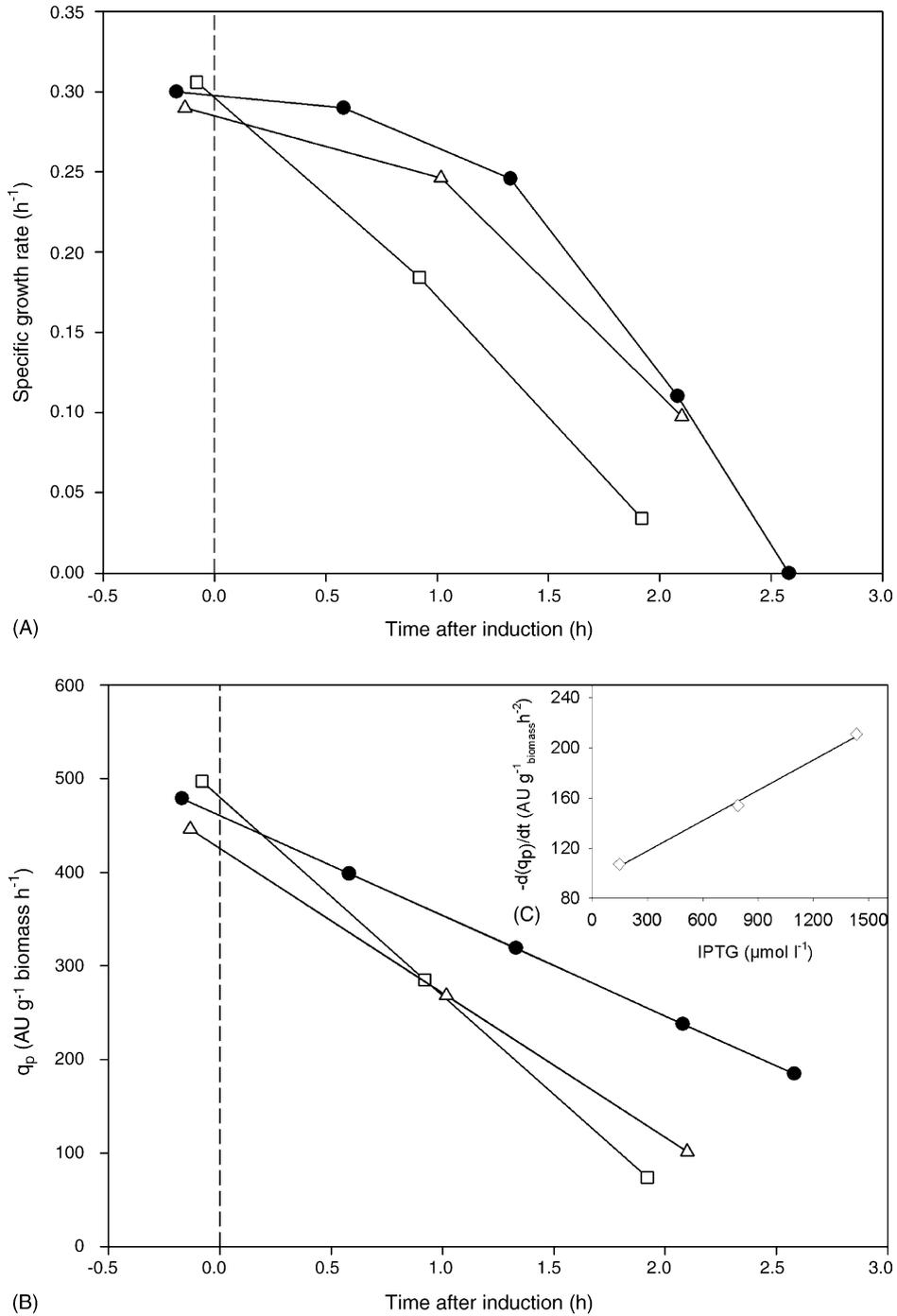


Fig. 5. Time courses of several variables after induction: (A) specific growth rate (μ); (B) enzyme production rate (q_p) and (C) enzyme production rate variation $d(q_p)/dt$ vs. IPTG concentration: ●, 148 $\mu\text{mol l}^{-1}$; Δ , 791 $\mu\text{mol l}^{-1}$; \square , 1433 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

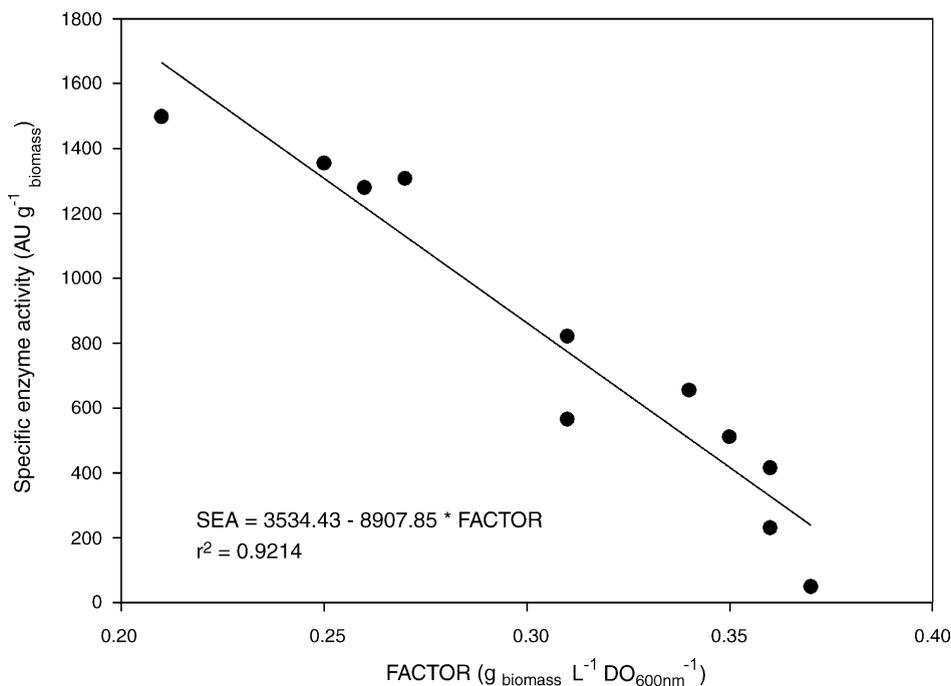


Fig. 6. Dependence between specific activity and $g_{\text{biomass}} \text{ l}^{-1} \text{ OD}_{600\text{nm}}^{-1}$ ratio (factor).

very different biomass concentration. This fact implies the impossibility of using a constant factor to transform $\text{OD}_{600\text{nm}}$ to biomass after induction. For this reason, the evolution of biomass in Figs. 1 and 2 is presented as absorbance units instead of $g_{\text{biomass}} \text{ l}^{-1}$. The determination of the experimental biomass and $\text{OD}_{600\text{nm}}$ at the end of each induced fed-batch allowed us to have a first quickly idea about the level of the target protein produced. This useful method was used as an easy way to predict the specific RhuA activity.

4. Conclusions

This work has demonstrated that the use of a strong promoter conditions the operation mode. In the same way, the concentration of IPTG in the bioreactor influences significantly the cellular growth and concomitantly the product rate formation since both variables are related when using this expression system. Hence, an efficient process has been designed from the point of view of enzymatic concentration and productivity allowing an economic and technique viability process.

Acknowledgements

Authors wish to acknowledge financial support from CICYT (Project: PPQ 2002-04625-C02-01). The Department of Chemical Engineering is the Unit of Biochemical Engineering of the Centre de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya (CeRBA).

References

- Baeza, J., Gabriel, D., Lafuente, J., 1999. An expert supervisory system for a pilot WWTP. *Environ. Model. Softw.* 14, 383–390.
- Bech Jensen, E., Carlsen, S., 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36, 1–11.
- Bhattacharya, S.K., Dubey, A.K., 1995. Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpressing target gene. *Biotechnol. Lett.* 17, 1155–1160.
- Boronat, A., Aguilar, J., 1981. Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: differences in induction of propanediol oxidoreductase. *J. Bacteriol.* 147 (1), 181–185.
- Brown, S.W., Meyer, H.P., Fiechter, A., 1985. Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and

- continuous cell lysis in a two stage chemostat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 5–9.
- Donovan, R., Robinson, C., Glick, B., 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J. Ind. Microbiol.* 16, 145–154.
- Durany, O., Mas, C., de López-Santín, J., 2005. Fed-batch production of recombinant fucose-1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 40, 707–716.
- Fessner, W.D., Sinerius, G., Schneider, A., Dreyer, M., Schulz, G.C., Badía, J.I., Aguilar, J., 1991. Diastereoselective enzymatic aldol additions: L-rhamnulose and L-fucose 1-phosphate aldolases from *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 555–558.
- Fuchs, C., Koster, D., Wierbusch, S., Mahr, K., Eisbrenner, G., Markl, H., 2002. Scale up of a dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 93, 243–251.
- García-Junceda, E., Shen, G., Sugai, T., Wong, C., 1995. A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of the three DHAP-dependent aldolases: rhamnulose-1-phosphate aldolase, fucose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase. *Bioorgan. Med. Chem.* 3 (7), 945–953.
- Gijzen, H., Qiao, L., Fitz, W., Wong, C.H., 1996. Recent advances in chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrates mimetics. *Chem. Rev.* 96, 443–473.
- Hoffmann, F., Weber, J., Rinas, U., 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production. 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 80 (3), 313–319.
- Jung, G., Deneffe, P., Becquart, J., Mayaux, J.F., 1988. High-cell-density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human interleukin-1. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiology* 139, 129–146.
- Keehyun, H., Lim, H.C., Hong, J., 1992. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 663–671.
- Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A., Deckwer, W.D., 1995. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 39, 55–59.
- Lee, S.Y., 1996. High cell density cultures of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14, 98–105.
- Lee, S.Y., Yim, K.S., Chang, H.N., Chang, Y.K., 1994. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 32, 203–211.
- Li, Y., Chen, J., Mao, Y., Lun, S., Koo, Y., 1998. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 33, 709–714.
- Liu, K.K.C., Kajimoto, T., Chen, L., Zhong, Z., Ichikawa, Y., Wong, C.H., 1991. Use of dihydroxyacetone phosphate dependant aldolases in the synthesis of deoxyzasugars. *J. Org. Chem.* 56 (22), 6280–6289.
- Mak, K.W.Y., Yap, M.G.S., Teo, W.K., 1995. Formulation and optimization of two culture media for the production of tumour necrosis factor- β in *Escherichia coli*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62, 289–294.
- Morís-Varas, F., Qian, X.H., Wong, C.H., 1996. Enzymatic/chemical synthesis and biological evaluation of seven-membered iminocyclitols. *J. Am. Chem. Soc.* 118 (33), 7647–7652.
- Schwartz, N.B., Abram, D., Feingold, D.S., 1974. L-Rhamnulose 1-phosphate aldolase of *Escherichia coli*. The role of metal in enzyme structure. *Biochemistry* 13 (8), 1726–1730.
- Suarez, D.C., Killikian, B.V., 2000. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 35, 1051–1055.
- Thompson, B.G., Kole, M., Gerson, D.F., 1985. Control of ammonium concentration in *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 818–824.
- Vidal, L., Durany, O., Suau, T., Ferrer, P., Benaiges, M.D., Caminal, G., 2003. High-level production of recombinant rhamnulose 1-phosphate aldolase in *E. coli*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 1171–1179.
- Weber, J., Hoffmann, F., Rinas, U., 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production. 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechnol. Bioeng.* 80 (3), 320–330.
- Wilms, B., Hauch, A., Reuss, M., Syldatk, C.H., Mattes, R., Siemann, M., 2001. High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rha* BAD promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 95–103.
- Yee, L., Blanch, H., 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology* 10, 1550–1556.
- Yee, L., Blanch, H., 1993a. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 781–790.
- Yee, L., Blanch, H., 1993b. Defined media optimisation for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 221–230.
- Yoon, S.K., Kang, W.K., 1994. Fed-batch operation of recombinant *Escherichia coli* containing *trp* promoter with controlled specific growth rate. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 995–999.

L. Vidal · J. Calveras · P. Clapés ·
P. Ferrer · G. Caminal

Recombinant production of serine hydroxymethyl transferase from *Streptococcus thermophilus* and its preliminary evaluation as a biocatalyst

Received: 25 November 2004 / Revised: 31 January 2005 / Accepted: 3 February 2005 / Published online: 23 February 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract The *glyA* gene encoding a serine hydroxymethyl transferase (SHMT) with threonine aldolase activity was isolated from *Streptococcus thermophilus* YKA-184 chromosomal DNA. This aldolase is a pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme that stereospecifically catalyzes the interconversion of L-threonine to glycine and acetaldehyde. The enzyme was overexpressed in *Escherichia coli* M15 as a recombinant protein of 45 kDa with a His6-tag at its N-terminus. The recombinant enzyme was purified to homogeneity by a single chromatographic step using Ni-nitrilotriacetic acid affinity, obtaining a high activity-recovery yield (83%). Lyophilized and precipitated enzymes were stable at least for 10 weeks when stored at -20°C and 4°C . It was observed that the K_m for L-*allo*-threonine was 38-fold higher than that for L-threonine, suggesting this enzyme can be classified as a specific L-*allo*-threonine aldolase. The optimum pH range of threonine aldolase activity for the recombinant SHMT was pH 6–7. When tested for aldol addition reactions with non-natural aldehydes, such as benzyloxyacetaldehyde and (R)-N-Cbz-alaninal, two possible β -hydroxy- α -amino acid diastereoisomers were produced, but with moderate stereospecificity. The enzyme showed potential as a biocatalyst for the stereoselective synthesis of β -hydroxy- α -amino acids.

Introduction

Aldolases are an interesting class of enzymes that have recently received much attention due to their ability to catalyze the formation of C–C bonds with a defined stereochemistry, leading to stereochemically pure products, even when the starting materials are non-chiral substrates (i.e., chiral induction; Gijzen et al. 1996). An interesting group of aldolases is the glycine-dependent aldolases family, being the threonine aldolase (TA) group the most studied. They catalyze in vivo the reversible cleavage of threonine to acetaldehyde and glycine. They can be classified into L-type and D-type based on their stereospecificity for the α -carbon of threonine. Moreover, depending on their stereospecificity towards the β -carbon of threonine, they can also be classified as: (1) specific TA, (2) low-specific TA and (3) specific *allo*-TA. Until now, all of them have been detected in different microorganisms, except for D-specific TA and D-*allo*-TA (Liu et al. 2000a).

These enzymes can be utilized in the synthesis of multifunctional homo chiral β -hydroxy- α -amino acids (glycine plus and aldehyde as acceptor) and in the chemical resolution of racemates (Kimura et al. 1997; Liu et al. 2000b). β -Hydroxy- α -amino acids are an important class of natural products with biological activity both on their own and as constituents in many naturally occurring complex compounds, such as antibiotics and immunosuppressants (Saeed and Young 1992; Yadav et al. 1995). These compounds can also be constituents of peptidomimetics and other non-proteinogenic peptide-like structures.

Acetaldehyde is known to be an important flavor component of several dairy products. In milk fermentation for yoghurt manufacture, the amount of acetaldehyde produced by lactic acid bacteria (LAB) is considerably important in the final flavor product, along with lactic acid, acetone, diacetyl and other carbonyl compounds (Xanthopoulos et al. 2001). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* are reported to be responsible for the production of acetaldehyde in yoghurt fermentation (Wilkins et al. 1986). Although the major pathway in LAB for acetaldehyde production is currently unclear, it is reported

L. Vidal · P. Ferrer · G. Caminal (✉)
Unitat de Biocatàlisi Aplicada Associada al IIQAB (CSIC-UAB),
Departament d'Enginyeria Química,
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria,
Universitat Autònoma de Barcelona,
Barcelona, 08193, Spain
e-mail: gloria.caminal@uab.es
Tel.: +34-93-5812144
Fax: +34-93-5812013

J. Calveras · P. Clapés
Institute for Chemistry and Environmental Research—CSIC,
Jordi Girona 18-26,
Barcelona, 08034, Spain

that *S. thermophilus* has a serine hydroxymethyl transferase (SHMT; EC 2.1.2.1) with threonine aldolase activity (Chavez et al. 2002). SHMT catalyzes the transfer of the hydroxymethyl group of serine to tetrahydrofolate, to form 5,10-methylenetetrahydrofolate and glycine (Plamann and Stauffer 1983). In vertebrates, this enzyme exists in both a cytoplasmic and a mitochondrial form, whereas only one form is found in prokaryotes (Ogawa et al. 2000).

The present study describes the cloning of the *glyA* gene encoding the SHMT from *S. thermophilus*, its overexpression as a recombinant his-tagged protein in *Escherichia coli* M15, the purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme and its synthetic utility as a biocatalyst.

Materials and methods

Chemicals

Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), L-threonine, L-allo-threonine, D-threonine and yeast alcohol dehydrogenase (ADH) were from Sigma (St. Louis, Mo., USA). Low-range protein molecular weight standards for SDS-PAGE were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, Calif., USA). Benzoyloxyacetaldehyde (Fig. 3, structure 1) was from Aldrich (Milwaukee, USA). N-Benzoyloxycarbonyl-3-amino propanal (Fig. 3, structure 2) and (S)-N-benzoyloxycarbonyl-alaninal (Fig. 3, structure 3) were synthesized in our laboratory by previously described procedures (Espelt et al. 2003). All other chemicals and reagents used in this work were of analytical grade.

Bacterial strains and plasmids

S. thermophilus YKA-184 (generously provided by Prof. N. Tzanetakys, Thessaloniki University, Greece) was used as a source of chromosomal DNA. *E. coli* DH5 α (F $^{\phi}$ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r $_{k}^{-}$, m $_{k}^{+}$) *phoA supE44* λ ⁻*thi-1 gyrA96 relA1*) from Invitrogen (San Diego, Calif., USA) and *E. coli* M15 [pREP4] (*mal*^s, *str*^s, *rif*^s, *thi*⁻, *lac*⁻, *ara*⁺, *gal*⁺, *mtl*⁻, F $^{\phi}$, *recA*⁺, *uvr*⁺, *lon*⁺) from Qiagen (Hilden, Germany) were used as host strains for gene cloning and expression, respectively. Plasmid pUC18 was used as a vector for gene subcloning. Plasmid pQE40 from Qiagen was used for overexpression of cloned *glyA* gene.

General recombinant DNA techniques

Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Fermentas (Vilnius, Lithuania) and used according to the manufacturer's instructions. Transformation of *E. coli* with the DNA ligation reactions was performed by electroporation, using a Gene Pulser II electroporator from Bio-Rad according to the manufacturer's protocol. Transformants were grown on LB agar plates containing 100 μ g/ml of

ampicillin, or ampicillin plus 25 μ g/ml of kanamycin when using M15 cells. Purification of plasmids and DNA fragments were performed using Qiagen DNA purification kits and following the instructions of the manufacturer. Chromosomal DNA from *S. thermophilus* was isolated using a phenol-chloroform standard procedure (Sambrook et al. 1989).

PCR-amplification of the threonine aldolase gene (*glyA*)

Isolation of the complete coding region of the *glyA* gene from *S. thermophilus* YKA-184 was obtained from purified genomic DNA from this strain by PCR-amplification. The reaction was carried out in a mixture containing 50 μ l of 0.12 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 0.01% Triton X-100, 0.001% bovine serum albumin (BSA), 1 mM MgCl₂, 0.2 mmol of each nucleoside triphosphate, 0.4 μ mol of each primer, 1 μ g of genomic DNA and 1.25 units of KOD polymerase (Novagen from Merck Biosciences; Darmstadt, Germany). PCR-amplification was conducted at 95°C for 15 s, 46°C for 30 s and 72°C for 1 min for a total of 30 cycles. The 3' and the 5' primers had the following sequences: 5'-TATCCGCTGCA GTATTAATAGAGTGGGAAAGC-3' and 5'-GCGAAAA CCCGGGCCTATTAGACCTCAAAG-3', with restriction enzymes sites *Pst*I and *Sma*I (in italics) introduced to allow insertion of the obtained PCR product in the pUC18 vector. These primers were identical to those used by Chavez et al. (2002) to amplify the *glyA* gene from *S. thermophilus* NIZOB130, except for the new restriction sites introduced. The amplified PCR product (1.2 kb) thus obtained, containing the *glyA* ORF sequence, plus the upstream region containing the ribosome-binding site, was separated by agarose gel electrophoresis, digested with *Pst*I and *Sma*I, purified and ligated into the pUC18 multicloning site, yielding the plasmid pUCglyA1. This construction was used to transform *E. coli* DH5 α . The nucleotide sequence of the amplified PCR fragment containing the *glyA* gene was determined. Once the nucleotide sequence coding for the first six amino acids (MIFDKE) was established, a second pair of primers was used to amplify from genomic DNA only the *glyA* ORF and to allow its cloning into the pQE40 vector. The 5' primer (5glyA1) containing the ATG initiation codon (lowercase letters) and the 3' primer (3glyA1) with the TAA termination codon (lowercase letters) had the following sequences, respectively: 5'-ATC GAGGATCCatgATTTTTGATAAAGAAG-3' and 5'-AAT GTGTCGACTtaaTAGAGTGGGAAAGCA-3'. To facilitate the cloning, an additional restriction site (sequence in italics) was incorporated in each primer. The amplified PCR product was separated by agarose gel electrophoresis, digested with *Bam*HI and *Sal*I, purified and inserted downstream of the T5 promoter of pQE40. This ligation was used to transform M15(pREP4) competent cells. The constructed plasmid was designated pQEGlyA1. To confirm that no errors had been introduced during PCR amplification, the nucleotide sequences of the *glyA* gene from pUCglyA1 and pQEGlyA1 were determined and compared. The

nucleotide sequences were determined by the dideoxy nucleotide chain-termination method with an ABI Prism 377 sequencer (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) at the DNA Service of IIQAB-CSIC (Barcelona, Spain).

Media and cultivation conditions

Recombinant *E. coli* cells were cultivated at 37°C in LB medium (1% w/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 1% w/v NaCl, pH 7.2) containing the appropriated antibiotics. *S. thermophilus* YKA-184 was cultivated in a shake-flask with Bacto M17 (Difco, Franklin Lakes, N.J., USA) at 39°C.

Cultivation conditions for recombinant SHMT expression were as follows: preinoculum cultures of *E. coli* M15 (pQEglyA) were grown from a frozen stock overnight in LB with ampicillin (0.1 mg/ml) plus kanamycin (0.025 mg/ml) at 37°C on a rotary shaker at 250 rpm. A final optical density at 600 nm (OD_{600}) of 3–4 was usually achieved. An aliquot of 25 ml of preinoculum was transferred to a 1,000-ml shake-flask containing 225 ml of LB with ampicillin plus kanamycin and incubated at 37°C with shaking at 250 rpm. For induction, 0.05 mM IPTG was added during the middle exponential phase growth and the cultivation temperature decreased to 30°C to minimise potential inclusion bodies formation. All strains were conserved at –80°C in glycerol stocks prepared from exponential-phase cultures.

Enzyme activity for TA

TA activity was measured spectrophotometrically as described by Liu et al. (1998a) with slight modifications. The assay mixture comprised 100 μ mol of potassium phosphate, pH 6.5, 0.05 μ mol of pyridoxal-5-phosphate (PLP), 0.15 μ mol of NADH, 30 units of ADH and appropriate amounts of enzyme and substrate, in a final volume of 1 ml. One unit of TA activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 μ mol/min of acetaldehyde (1 μ mol of NADH oxidized) at 37°C. For precipitated samples, an aliquot of 0.2 ml of the suspension was centrifuged at 13,000 g for 5 min, the supernatant discarded and the precipitate dissolved in 0.5 ml of 200 mM potassium phosphate, pH 8.0. For lyophilized samples, approximately 1 mg of enzyme powder was dissolved in 1 ml of cold distilled water. Appropriate dilutions with deionized cold water were done to measure enzyme activity.

Purification of SHMT

Preparation of cell-free extract

Cells from four 250-ml induced-culture broths were withdrawn and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended with start buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) to a

final cell density (OD_{600}) of 50, to carry out protein purification. The cell suspension was placed in ice and sonicated with four 30-s pulses with 2-min intervals in ice between each pulse, using a Vibracell model VC50 (Sonics and Materials, Newdown, Conn., USA). Cellular debris was removed by centrifugation at 12,000 g for 30 min at 4°C and the clear supernatant was filtered through a 45- μ m filter (Millipore Corp., Bedford, Mass., USA) and collected.

Ni-nitrilotriacetic acid chromatography

A FPLC system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was used for purification of recombinant TA. The clear supernatant of induced *E. coli* M15 (pQEglyA) was applied to a HiTrap chelating column (Amersham Biosciences) with 50 cm³ bed vol. The column was washed with 5 \times column vol. of start buffer and the recombinant protein was eluted with 400 mM imidazole in 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, pH 7.4, at a flow rate of 5 ml/min. Fractions with threonine aldolase activity were pooled and checked by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Fractions containing SHMT were pooled and stored at 4°C.

Ammonium sulfate precipitation

A fraction containing the recombinant protein was brought to 40% saturation with ammonium sulfate at 4°C for 24 h. The suspension was centrifuged at 13,000 g for 30 min. The supernatant was discarded (i.e., eliminating the imidazole-containing buffer) and the precipitated material was collected, resuspended in ice-cold ammonium sulfate (40%) and stored at 4°C in a dark receptacle.

Lyophilization

A fraction containing the recombinant protein was dialyzed against 250 vol. of PBS buffer, pH 8.0, containing 0.01 mM PLP at 4°C for 24 h. The dialyzed solution was frozen at –80°C and lyophilized using a benchtop 5-l lyophilizer (Virtis Sentry, Gardiner, N.Y., USA). The yellow powder obtained was stored at different temperatures in a dark receptacle.

Protein determination

Protein concentration was determined with the Coomassie protein assay kit (Pierce, Rockford, Ill., USA), using BSA as standard.

Molecular mass determination

The subunit molecular mass of the enzyme was determined by 12% SDS-PAGE, using MiniProtean II (Bio-Rad) equip-

ment according to the manufacturer's instructions. Gels were stained with Coomassie blue. Polypeptide SDS-PAGE molecular weight standards were from Bio-Rad.

Aldol additions catalyzed by SHMT

Aldol additions of glycine to aldehydes (Fig. 3, structures 1–3) were conducted in emulsion systems (Espelt et al. 2003), which consisted of ternary mixtures of water (90 wt%), technical grade tetra(ethylene glycol) tetradecyl ether surfactant, $C_{14}H_{29}(OCH_2CH_2)_4OH$ ($C_{14}E_4$) (4 wt%), with an average of 4 mol of ethylene oxide per surfactant molecule and hexadecane (C_{16} , 6 wt%). Reactions were carried out in 10-ml screw-capped test tubes. The aldehyde (0.27 mmol), the oil (0.3 g) and the surfactant (0.2 g) were mixed vigorously. Then, a glycine solution (4.5 ml, 0.225 zmmol) at pH 6.5 was added drop-wise while stirring at 25°C with a vortex mixer, followed by the addition of a solution of PLP (60 μ l, 0.3 μ mol). Finally, the reaction was started by adding the enzyme (20 units). The final reaction volume was 5 ml. The test tubes were placed on a horizontal shaking bath (100 rpm) at constant temperature (37°C). The reactions were followed by HPLC until the peak of the product reached a maximum. The enzymatic reactions were stopped by the addition of methanol; and the final crude was purified as described below.

HPLC analyses

HPLC analyses were performed on a Lichrograph HPLC system (Merck), fitted with a reverse-phase (RP)-HPLC cartridge (250×4 mm) filled with Lichrosphere 100 (RP-18, 5 μ m; Merck). Samples (50 mg) were withdrawn from the reaction medium, dissolved in methanol (0.5–1.0 ml) to stop any enzymatic reaction and analyzed subsequently by HPLC. The solvent system was the following: solvent A was 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in H_2O ; and solvent B was 0.095% (v/v) TFA in $H_2O:CH_3CN$ 1:4. The HPLC conditions for reaction monitoring depended on the acceptor aldehyde: (1) reaction with benzyloxyacetaldehyde, gradient elution from 0% to 60% B in 30 min and (2) reaction with *N*-benzyloxycarbonyl-3-aminopropanal and (*R*)-*N*-benzyloxycarbonyl-alaninal, gradient elution from 10% to 70% B in 30 min. In all cases, the flow rate was 1 ml/min and detection was performed at 215 nm.

Purification procedures

The crude reaction mixtures were evaporated under vacuum to eliminate the methanol. The residue obtained was dissolved in water and washed successively with ethyl acetate (3× 150 ml). The aqueous layer, containing the product, was freeze-dried and then purified by semi-preparative RP-HPLC on a Perkin-Elmer 250×25 mm column, filled with C_{18} , 5- μ m-type stationary phase, using the following procedure. First, the column was equilibrated

with 0.1% (v/v) TFA in water. Then, the sample was adjusted to pH 2–3 with TFA and loaded onto the column. The salts were eliminated by washing with 100 ml of 0.1% (v/v) TFA in water. Then, the product was eluted with a gradient of 0.1% (v/v) TFA in CH_3CN (0–56% in 30 min). The flow rate was 10 ml/min and the products were detected at 254 nm. The pure fractions were pooled and lyophilized for further characterization by NMR.

GenBank accession number

The sequence reported in this study was submitted to the GenBank database, with the accession number AY837501

Results

Cloning of the *glyA* gene

The genome sequence project of *S. thermophilus* (1.8 Mb) was very recently completed (Bolotin et al. 2004) and coordinated by the Université Catholique de Louvain, Life Sciences Institute (<http://www.biol.ucl.ac.be/gene/genome/>). At the time when this study was performed, access to the DNA sequences was restricted and only a protein database of possible translated ORFs >100 bp was open to the public. Chavez et al. (2002) reported the amplification of the *glyA* gene (including the ribosomal-binding site and flanking regions) from *S. thermophilus* NIZOB130 using specific primers. Using these primers with additional sequences for restriction sites, we were able to amplify a 1.2-kb fragment potentially containing the *glyA* gene of the YKA-184 strain and clone it into the pUC18 vector. Its sequence confirmed that it contained a 1,253-bp ORF starting at AUG and finishing with a stop codon (TAA). The second pair of primers (primers 5glyA1, 3glyA1) was used to amplify this ORF exclusively. The PCR fragment obtained with these primers was ligated into the *Bam*HI and *Sal*I sites of the pQE40 vector. The new construction, pQEglyA1, was used to transform *E. coli* M15 (pREP4). The nucleotide sequence of the insert was determined (for both strands) to confirm the DNA sequence.

The pQE40 expression cassette contains a 6× histidine sequence and the mouse dihydrofolate reductase (DHFR) coding sequence upstream of the multiple cloning site. Since additional amino acids in the N- or C-terminus of the recombinant protein might play a critical role its function and cell toxicity (Viaplana and Villaverde 1996), we considered minimizing the length of additional transcriptionally fused sequences at both ends of the *glyA* gene. Therefore, the excision of a *Bam*HI-*Sal*I fragment from pQE40 containing the DHFR-coding sequence allowed us to minimize the number of amino acids added to the recombinant protein. The DNA fragment with the *glyA* gene was inserted into the modified pQE40, so that SHMT was expressed under the transcriptional control of the IPTG-inducible T5 promoter as a fusion protein with a 6-histidine

tail at its N-terminus, i.e. with a total of 12 additional amino acids at the N-terminus (including the His6-tag peptide).

Overexpression of the *glyA* gene

E. coli M15 (pQEglyA1) was tested for SHMT overproduction in shake-flask cultures with LB medium supplemented with kanamycin and ampicillin. At 6 h after IPTG induction, cells were harvested, lysed and intracellular proteins analyzed by SDS-PAGE. Recombinant SHMT appeared as an intense protein band with an apparent molecular mass of about 45 kDa (Fig. 1, lane B), which is in good agreement with the estimated molecular weight calculated from the deduced amino acid sequence of the *S. thermophilus* YKA-184 *glyA* gene (46.5 kDa). As revealed by densitometric analysis of the SDS-PAGE of induced *E. coli* M15 (pQEglyA1), the recombinant SHMT represented nearly 58% of the total cellular protein.

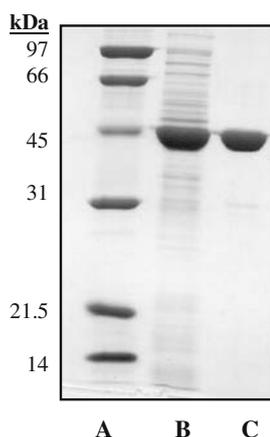
Sequence similarity relative to other proteins

The translated DNA sequence from *S. thermophilus* YKA-184 was homologous to the sequence for *glyA* deduced from the strain LMG18311 genome sequence (BCCM collection, *S. thermophilus* genome project) except for one residue (substitution of Val₈₈ by Ala₈₈). However, we did not consider this substitution critical for the enzyme activity, since both amino acids are non-polar and also seem not to be involved with the active site.

Enzyme purification

The purification was studied from the point of view of enzymatic activity recovery. For this purpose, induced cells were disrupted as explained in [Materials and methods](#). In a first step, 42 ml of centrifuged and filtered clear lysate supernatant containing a total of 704 mg of protein and 443 units of activity were loaded onto the Ni-NTA affinity column. The recombinant protein was eluted with 400 mM imidazole (Fig. 1, lane C). Nearly 83% of the L-threonine

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the cell lysate of *E. coli* M15 (pQEglyA1) expressing the recombinant SHMT and the purified fraction obtained with Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) affinity chromatography. Samples were loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue after electrophoresis. Lane A Molecular mass standards, lane B cell lysate of *E. coli* M15 (pQEglyA1) induced with 50 μ M IPTG in LB medium, lane C purified SHMT eluted fraction with 400 mM imidazole



aldolase activity was recovered in a high-purity elution fraction, representing 55% of the total intracellular proteins (Table 1). This value agrees with the result obtained from the densitometric analysis of SDS-PAGE. This fraction had a yellow color and exhibited maximal absorption around 280 nm and 420 nm. As demonstrated with other PLP-containing enzymes, the absorption peak at 420 nm is characteristic of an azomethine linkage between the coenzyme and a protein amino group (Schirch and Mason, 1962).

Precipitation and lyophilization

For further elimination of the imidazole present in the purified fraction, two alternative strategies were considered: (option 1) precipitation with ammonium sulfate and (option 2) dialysis and lyophilization. As can be seen in Table 1, high recovery yields of enzyme activity were obtained for both downstream processes. In option 1, 79% of activity recovery was achieved. In option 2, the activity increased after dialysis in 20 mM potassium phosphate, pH 8.0, containing 0.01 mM PLP. After dialysis and lyophilization process, 72% of activity recovery was achieved. The global yield (referring to chromatography plus precipitation) was 66%, compared with 60% in the case of lyophilization.

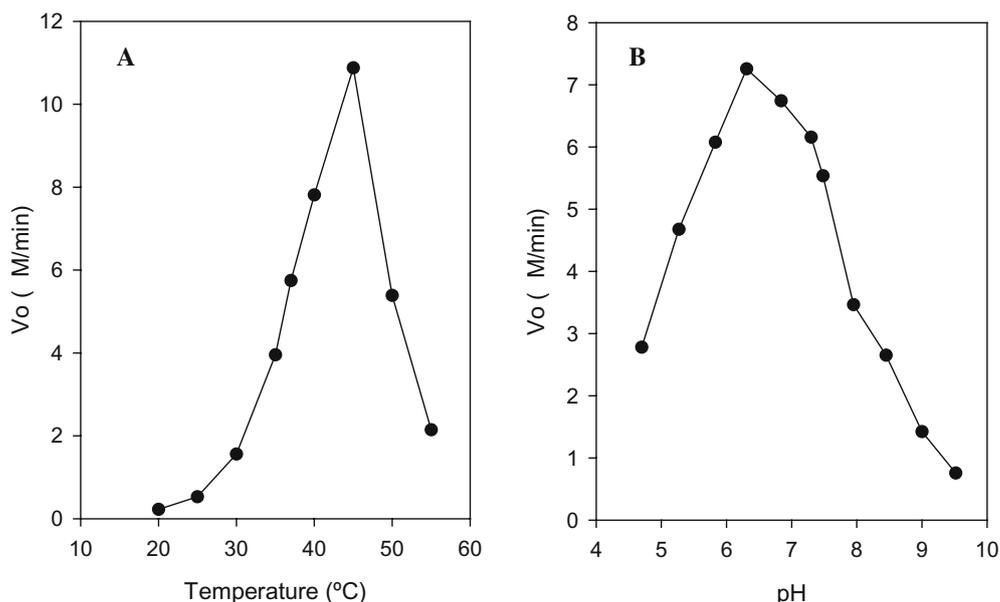
pH and temperature effects on enzyme activity

For characterization of the recombinant SHMT, the effect of temperature and pH on threonine aldolase activity was studied. At a fixed pH of 8.0, maximum SHMT activity was observed at 45°C (Fig. 2a). The increase in temperature over this value caused enzyme denaturation and a sharp drop in the specific activity. Hence, 37°C was the temperature of choice for the rest of the enzymatic activity measurements. The effect of pH on the enzyme activity was studied. Fig. 2b shows the initial reaction rate (V_0) measured by the standard assay method, using L-threonine

Table 1 Purification of the recombinant SHMT of *S. thermophilus* YKA-184. Threonine aldolase activity was determined with L-threonine as substrate, as described in [Materials and methods](#). The Ni-NTA fraction was divided into two fractions of equal volume for either precipitation (option 1) or lyophilization (option 2). Recovery yield is reported for each step

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification (x-fold)	Recovery (%)
Cell-free extract	443	704	0.63	1.0	100
Ni-NTA chromatography	366	386	0.95	1.5	83
Precipitation (option 1)	144	180	0.80	–	79
Dialysis+ lyophilization (option 2)	132	189	0.70	–	72

Fig. 2 Effect of the temperature (a) and pH (b) on the threonine aldolase activity of SHMT. Buffers employed: Tris-HCl (pH 9.5–7.5), potassium phosphate (pH 7.0–6.0) and acetate (pH 4.5–5.5). L-Threonine was used as substrate. V_0 Initial reaction rate



as substrate, with the following buffers: Tris-HCl (pH 9.5–7.5), potassium phosphate (pH 7.0–6.0) and acetate (pH 4.5–5.5). The maximum activity of SHMT was between pH 6.0 and pH 7.0. Therefore, pH 6.5 was chosen for the rest of the enzymatic assays. Remarkably, all known enzymes with threonine aldolase activity reported so far have their optimum pH in a slightly alkaline environment. However, the threonine aldolase activity from the recombinant SHMT of *S. thermophilus* had an optimum pH below 7.0.

To determine the thermal stability of SHMT at the optimum established pH (i.e., phosphate pH 6.5), the purified enzyme was incubated at 30, 37 and 45°C. The enzyme was stable at least for 6 h in this buffer at 30°C and 37°C. However, when it was incubated at 45°C, the activity decreased and only 50% of activity remained after 4.5 h. These data support the chosen conditions for the enzyme assay as 37°C and pH 6.5.

Enzyme stability of precipitated and lyophilized SHMT

Both enzyme presentations, lyophilized and precipitated, were stable at least for 10 weeks when stored at –20°C and 4°C. However, a 15% activity decrease was observed for the lyophilized product after storage for 10 weeks at 25°C. Nevertheless, we considered this loss as only relevant after long-term storage periods. The high stability of this enzyme could be associated with the absence of cysteine residues in the primary structure, which are particularly sensitive to oxidation by almost all forms of reactive species, i.e. resulting in enzyme damage (Stadtman and Levine 2003).

Substrate specificity

The results of the kinetics parameters of the recombinant SHMT are shown in Table 2. This enzyme acted on both

L-threonine and L-*allo*-threonine, but not on D-threonine. Thus, this SHMT could be classified as a low-specificity L-TA family member.

SHMT catalyzed aldol additions of glycine to selected aldehydes

SHMT was assayed for a preliminary exploration of its ability to catalyze aldol additions with non-natural aldehyde acceptors, such as benzyloxyacetaldehyde (Fig. 3, structure 1), *N*-Cbz-3-aminopropanal (Fig. 3, structure 2) and (*R*)-*N*-Cbz-alaninal (Fig. 3, structure 3) as examples. RP-HPLC analysis of the reaction progress with benzyloxyacetaldehyde and *N*-Cbz-alaninal revealed that a single peak appeared at the beginning of the reaction and decreased with reaction time, concomitantly with the increase of another peak with no baseline recovery. The NMR data of the mixture of both peaks suggested the formation of two diastereoisomers. Since this enzyme did not cleave D-threonine (vide supra) and the “natural” substrate donor, glycine, was used, we assumed that the configuration of the C α was always *S* (Saeed and Young 1992). Hence, the two

Table 2 Steady-state kinetics constants for the SHMT from *S. thermophilus*. Threonine aldolase activity was determined by coupling the reaction of acetaldehyde with yeast alcohol dehydrogenase, as described in Materials and methods. The values of the kinetic constants are averages \pm SD of three different determinations

Compound	Relative activity ^a (%)	V_{\max} (units/mg)	K_m (mM)	V_{\max}/K_m
L-Threonine	100	1.62 \pm 0.06	30.45 \pm 3.04	0.053 \pm 0.007
L- <i>allo</i> threonine	343	5.57 \pm 0.10	0.80 \pm 0.07	7.0 \pm 0.7
D-Threonine	0	–	–	–

^aActivity relative to enzyme activity towards L-threonine

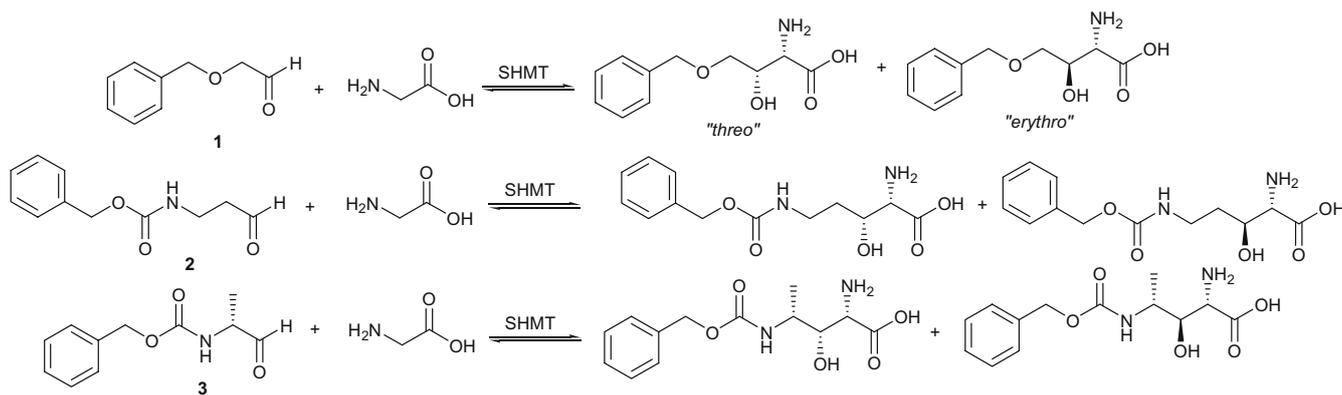


Fig. 3 Reaction scheme of the two possible diastereoisomers produced using SHMT in aldol condensations: *L-erythro* and *L-threo* forms

Table 3 SHMT-catalyzed aldol addition of glycine and selected aldehydes. For the diastereomeric ratio, the relative abundance of each diastereoisomer was calculated from the peak areas in the HPLC analysis. *ND* Not determined (in this case, the putative diastereoisomers *L-erythro* and *L-threo* were not resolved by RP-HPLC)

Aldehyde	Enzyme (units/ml)	Conversion (%), with time (h) in parentheses	Diastereomeric ratio
Structure 1	2	27 (4)	70:30
Structure 2	4	25 (6)	ND
Structure 3	4	24 (24)	80:20

possible diastereoisomers may correspond to the *L-erythro* and *L-threo* products (Fig. 3). Table 3 shows the relative abundance of both products, calculated from the peak areas of the RP-HPLC analysis.

Discussion

The PLP-dependent threonine aldolase (TA) catalyzes the reversible reaction between acetaldehyde and glycine to yield *L*-threonine. It has long been argued that both activities, SHMT and LTA, are catalyzed by the same protein. However, several studies have demonstrated that, in some organisms, these are discrete enzymes, e.g. rat liver SHMT does not exhibit TA activity (Ogawa and Fujioka 1981). In *E. coli*, both reactions depend on one single protein (Plamann et al. 1983; Schirch et al. 1985). Nevertheless, Liu et al. (1998a) recently reported an additional protein in *E. coli* involved in glycine biosynthesis with TA activity, which is encoded by a different gene (*latE*). Until now, only one protein with both *L*-TA and SHMT activities has been reported in *S. thermophilus* (Chavez et al. 2002). This enzyme, encoded by the *glyA* gene, cleaves both *L*-threonine and *L-allo*-threonine into glycine and acetaldehyde, suggesting that it can be classified as a *L*-low-specificity TA. However, the K_m ratio for *L*-threonine/*L-allo*-threonine was 38 under the assay conditions. Considering that this ratio for other previously described low-specificity TA (for *L* and *D* stereoisomers) is between 0.3 and 13 (Liu et al. 1997, 1998a,b, 2000b; Kataoka et al. 1997a), we suggest that this

enzyme can be considered more as a *L-allo*-specific rather than a low-specific TA.

SHMT is a PLP-dependent aldolase whose cofactor is attached to a lysine residue, with the sequence around this amino acid highly conserved in all enzymes of this family. Usually, this lysine residue is located in the middle of the protein sequence. Using ScanProsite software (<http://kr.expasy.org/tools/scanprosite/>), the following motive of the deduced *glyA* amino acid sequence (residues 235–251), containing this lys residue (in italics) was identified: HVT TTTTHKTLRGPRGG. Also, a conserved glycine-rich region (GLQGGP) was identified (residues 258–263), which may play an important role in PLP-binding (Usha et al. 1994).

The *glyA* enzyme from *S. thermophilus* YKA-184 was compared with the *glyA* protein from *E. coli* K-12 for the following reasons: (1) both enzymes play a similar physiological role, being SHMTs with LTA activity, (2) not only is their DNA and primary amino acid sequence available, but also their specificity toward threonine isomers for cleavage reactions and for retro-aldol condensation has been characterized. The alignment of the predicted amino acid sequence of both proteins established 60% identity in their primary structure. Furthermore, both enzymes share a similar PLP-binding motif sequence TTTTHKTL (attachment lysine in italics), which is common for many SHMTs. From the point of view of threonine aldolase activity, these enzymes can be considered more *L-allo*-specific than *L*-low specific, due to their very low K_m value (Kimura et al. 1997) for this threonine isomer (0.8 mM, 0.62 mM, respectively).

When the predicted amino acid sequence of SHMT from *S. thermophilus* was compared with other enzymes with LTA activity but without SHMT function, we found a different sequence for the PLP-binding site. The *ltaA* protein from *Aeromonas jandaei* DK-39, which is considered an authentic *L-allo*-TA (Kataoka et al. 1997b), has the sequence ICLSKGLG. The *ltaE* protein from *E. coli* K-12 also has the same PLP-binding site sequence. Remarkably, when neither of these motifs is close to the lysine PLP-binding site (i.e., CFGGTK, as described for the low-specific TA from *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558), the enzyme cleaves both *L*-threonine isomers indistinctly and the stereospecificity for the retro-aldol condensation is lost

(Liu et al. 1998c). Overall, these observations suggest that LTA enzymes can be classified into two different types, depending on the residues adjacent to the active-site lysine: (1) LTAs with SHMT activity and (2) LTAs without SHMT activity. The latter group contains enzymes with distinct substrate specificity for L-threonine isomers, which could also be subgrouped according to the characteristic sequence motifs in their active site. It should be remarked that L-*allo*-threonine is not a naturally occurring compound, so the physiological significance of this characteristic in threonine aldolases remains unclear.

The novel SHMT was capable of reacting with unnatural aldehydes for the production of β -hydroxy- α -amino acids with moderate stereospecificity, even when the reaction conditions were not fully optimized. A kinetically controlled reaction with SHMT from *E. coli* K12 has been used for the synthesis of hydroxythreonine derivatives, yielding γ -benzyloxy-L-*allo*-threonine and γ -benzyl-oxyethyl-L-*allo*-threonine with high diastereoselectivity (Kimura et al. 1997). These results suggest that the performance of a kinetically controlled reaction with SHMT from *S. thermophilus* could improve the diastereoselectivity of the products. Moreover, these previous results may also suggest that the diastereoselectivity of the product increases when a nitrogen atom exists at the α -position of the substrate aldehyde (Table 3). A similar result has been observed with LTA from *Candida humicola* (Kimura et al. 1997).

Clearly, these preliminary results show that the SHMT from *S. thermophilus* is a promising biocatalyst for the stereoselective synthesis of β -hydroxy- α -amino acids. We are currently investigating the absolute stereochemistry of each diastereoisomer formed, to assess unequivocally the structure of the major and minor aldol adducts and the tolerance of this novel threonine aldolase towards a number of *N*-protected aminoaldehyde acceptor derivatives.

In this context, the availability of an efficient integrated production process based on the use of a commercially available expression system (*E. coli* M15/pQE40) will allow the study and full characterization of SHMT from *S. thermophilus* as a biocatalyst. This expression system has been successfully used for recombinant overexpression of other aldolases in our laboratory, yielding high levels of recombinant protein without inclusion body formation. For instance, rhamnulose 1-phosphate aldolase was overproduced, yielding intracellular levels of 50% of the total soluble protein (Vidal et al. 2003). Moreover, this system has been characterized in high-cell-density fed-batch cultures (unpublished data), i.e. providing the basis for large-scale production of a battery of aldolases with different substrate specificities for their application in biocatalysis.

Acknowledgements The authors wish to acknowledge financial support from CICYT (project PPQ 2002-04625-C02-01). The Department of Chemical Engineering is the Unit of Biochemical Engineering of the Centre de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya (CeRBa). We thank Dr. Tzanetakis (Aristotle University of Thessaloniki, Greece) for providing us with the *S. thermophilus* YKA-184 strain.

References

- Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich D, Kulakauskas S, Lapidus A, Glotsman E, Mazur M, Pusch G, Fonstein M, Overbeek R, Kyprides N, Purnelle B, Prozzi D, Ngui K, Masuy D, Hancy F, Burteau S, Boutry M, Delcour J, Goffeau A, Hols P (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22:1554–1558
- Chavez ACS, Fernandez M, Lerayer ALS, Mierau I, Kleerebezem M, Hugenholtz J (2002) Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* 68:5656–5662
- Espelt L, Clapés P, Esquena J, Manich A, Solans C (2003) Enzymatic carbon-carbon bond formation in water-in-oil highly concentrated (gel emulsions). *Langmuir* 19:1337–1346
- Gijzen H, Qiao L, Fitz W, Wong CH (1996) Recent advances in chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrates mimetics. *Chem Rev* 96:443–473
- Kataoka M, Ikemi M, Morikawa T, Miyoshi T, Nishi K, Wada M, Yamada H, Shimizu S (1997a) Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. *Eur J Biochem* 248:385–393
- Kataoka M, Wada M, Nishi K, Yamada H, Shimizu S (1997b) Purification and characterization of L-*allo*-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39. *FEMS Microbiol Lett* 151:245–248
- Kimura T, Vassilev VP, Shen GJ, Wong CH (1997) Enzymatic synthesis of beta-hydroxy-alpha-aminoacids based on recombinant D- and L-threonine aldolases. *J Am Chem Soc* 119:11734–11742
- Liu JQ, Nagata S, Dairi T, Misono H, Shimizu S, Yamada H (1997) The *GLY1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specificity L-threonine aldolase that catalyses cleavage of L-*allo*-threonine and L-threonine to glycine. Expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of the enzyme. *Eur J Biochem* 245:289–293
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H (1998a) Gene cloning of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 255:220–226
- Liu JQ, Ito S, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H (1998b) Gene cloning, nucleotide sequencing and purification and characterization of the low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 10558. *Appl Environ Microbiol* 64:549–554
- Liu JQ, Ito S, Dairi T, Itoh N, Shimizu S, Yamada H (1998c) Low-specificity L-threonine aldolase of *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558: purification, characterization and its application to β -hydroxy- α -aminoacids synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:702–708
- Liu JQ, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H (2000a). Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *J Mol Catal B Enzym* 10:107–115
- Liu JQ, Odani M, Yasuoka T, Dairi T, Itoh N, Kataoka M, Shimizu S, Yamada H (2000b) Gene cloning and overproduction of low-specificity D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* and its application for production of a key intermediate for Parkinson drug. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:44–51
- Ogawa H, Fujioka M (1981) Purification and characterization of cytosolic and mitochondrial serine hydroxymethyltransferases from rat liver. *J Biochem* 90:381–390
- Ogawa H, Gomi T, Fujioka M (2000) Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? *Int J Biochem Cell Biol* 32:289–301
- Plamann MD, Stauffer GV (1983) Characterization of the *Escherichia coli* gene for serine hydroxymethyltransferase. *Gene* 22:9–18
- Plamann MD, Stauffer LT, Urbanowsky ML, Stauffer GV (1983) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli glyA* gene. *Nucleic Acids Res* 11:2065–2075

- Saeed A, Young DW (1992) Synthesis of L-beta-hydroxy amino acids using serine hydroxymethyltransferase. *Tetrahedron* 48:2507–2514
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schirch LG, Mason M (1962) Serine transhydroxymethylase. Spectral properties of the enzyme-bound pyridoxal-5-phosphate. *J Biol Chem* 237:2578–2581
- Schirch V, Hopkins S, Villar E, Angelaccio S (1985) Serine hydroxymethyltransferase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J Bacteriol* 163:1–7
- Stadtman ER, Levine RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–218
- Usha R, Savithri HS, Rao NA (1994) The primary structure of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyl transferase and analysis of the evolutionary relationships among serine hydroxymethyl transferases. *Biochim Biophys Acta* 1204:75–83
- Viaplana E, Villaverde A (1996) Polylinker-encoded peptides can confer toxicity to recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 12:723–727
- Vidal L, Durany O, Suau T, Ferrer P, Benaiges MD, Caminal G (2003) High-level production of recombinant His-tagged rhamnulose 1-phosphate aldolase in *Escherichia coli*. *J Chem Technol Biotechnol* 78:1171–1179
- Wilkins DW, Schmidt RH, Kennedy L (1986) Threonine aldolase activity in yogurt bacteria as determined by headspace gas chromatography. *J Agric Food Chem* 34:150–152
- Xanthopoulos V, Petridis D, Tzanetakis N (2001) Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yogurts. *J Food Sci* 66:747–752
- Yadav JS, Chandrasekhar S, Ravindra Reddy Y, Rama Rao AV (1995) Synthesis of (2S,3R)-3-hydroxy leucine: a constituent of lysobactin. *Tetrahedron* 51:2749–2754