

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y
FARMACIA



ASPECTOS MOLECULARES DE PRODUCCIÓN DE
MANITOL POR BACTERIAS LÁCTICAS
HETEROFERMENTATIVAS

Lic. Juliana Bleckwedel

Año 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Patricia Eugenia Álvarez

Dr. Raúl Armando Salomón

Bioq. Farm. Ana María del Valle González

Dra. María Eugenia Mónaco

Dra. Carolina Serra Barcellona

Dra. María José Rodríguez Vaquero

Farm. Verónica Pastoriza

Sr. Walter Ricardo Gómez

Sr. Santiago I. Torres Briceño

Sr. Lucio E. Fornaciari

Sr. Bruno M. Torres

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADÉMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución nº: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución nº: Resolución 750- CONEAU -13

Director:

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-Directora:

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Comité Académico:

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Lucia Claps

Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA

Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**ASPECTOS MOLECULARES DE PRODUCCIÓN DE MANITOL POR BACTERIAS
LÁCTICAS HETEROFERMENTATIVAS**

TESISTA

Lic. Juliana Bleckwedel

DIRECTOR

Dr. Raúl Ricardo Raya

DIRECTOR ASOCIADO

Dra. Fernanda Beatriz Mozzi

COMISION DE SUPERVISIÓN

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Dr. Osvaldo Daniel Delgado



Este trabajo de Tesis Doctoral se financió a través de becas y subsidios provistos por las siguientes instituciones: **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)** y **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)**.

Esta Tesis Doctoral se desarrolló en el **Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)**, dependiente de CONICET, de la Fundación Miguel Lillo y de la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC).

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones científicas:

Publicaciones en revistas científicas con referato

Ortiz ME, **Bleckwedel J**, Fadda S, Picariello G, Hebert EM, Raya RR, Mozzi F. 2017. Global analysis of mannitol 2-dehydrogenase in *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 during mannitol production through enzymatic, genetic and proteomic approaches. PLoS ONE 12(1): e0169441. doi:10.1371/journal.pone.016.

Bleckwedel J, Terán LC, Bonacina J, Saavedra L, Mozzi F, Raya RR. 2014. Draft genome sequence of the mannitol-producing strain *Lactobacillus mucosae* CRL573. Genome Announcements. 2(6):e01292-14. doi:10.1128/genomeA.01292-14.

Ortiz ME, **Bleckwedel J**, Raya RR, Mozzi F. 2013. Biotechnological and *in situ* food production of polyols by lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology 97:4713-4726.

Mozzi F, Ortiz ME, **Bleckwedel J**, De Vuyst L, Pescuma M. 2012. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. Food Research International, special issue Foodomics 54(1):1152–1161.

Capítulos de Libro

Ruiz-Rodríguez L, **Bleckwedel J**, Ortiz ME, Pescuma M, Mozzi F. 2016. Lactic acid bacteria. En: Industrial Biotechnology: Microorganisms. Eds C. Wittmann and J. Liao. Weinheim: Wiley-VCH. Páginas 395-451. DOI: 10.1002/9783527807796.ch11.

Comunicaciones Científicas

Posters:

12th International Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, Holanda. 2017. **Bleckwedel J**, Ruiz Rodríguez L, Mozzi F, Raya RR. Identification of the major ldh gene related to D-lactic acid synthesis in *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034.

V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas, Tucumán, Argentina. 2016. **Bleckwedel J**, Mozzi F, Raya RR. Characterization of mannitol activity and mannitol production in mannitol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutants of *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034.

XLVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, Argentina. 2014. **Bleckwedel J**, Terán L, Bonacina J, Saavedra L, Mozzi F, Raya RR. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus mucosae* CRL573, a mannitol producer bacterium.

11th Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, Holanda. 2014. Ortiz ME, **Bleckwedel J**, Hébert EM, Ferranti P, Picariello G, Raya RR, Mozzi F. Fructose induces gene expression of mannitol 2-dehydrogenase of *Lactobacillus reuteri* CRL 1101.

11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, Holanda. 2014. Ruiz Rodríguez LG, **Bleckwedel J**, Illegghems K, Weckx S, De Vuyst L, Hébert EM, Mozzi F. An insight into the microbiota of exotic fruits and flowers of Northern Argentina: Molecular identification of lactic acid bacteria.

IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas, Tucumán, Argentina. 2013. **Bleckwedel J**, Ortiz ME, Mozzi F, Raya RR. Use of the ssDNA Recombineering

technique to knock out the mannitol dehydrogenase gene in *Lactobacillus reuteri* CRL 1101. **Exposición oral y poster.**

IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas, Tucumán, Argentina. 2013. Ruiz Rodríguez LG, **Bleckwedel J**, Raya RR, Hébert EM, Mozzi F. Exploring the lactic microbiota present in guava fruits. Molecular identification of lactic acid bacteria.

XLVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mendoza, Argentina. 2012. Ortiz ME, **Bleckwedel J**, Raya RR, Mozzi F. Mannitol 2-dehydrogenase activity at different growth phases in *Lactobacillus reuteri* CRL 1101.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl R. Raya, mi director, por compartir su conocimiento conmigo, por confiar en mis conocimientos y dejarme trabajar con él y formar parte de su grupo de investigación. Por compartir y contagiar su pasión por la Ciencia, siempre generando desafíos con preguntas capciosas, enseñando el sentido de las palabras y la historia de la ciencia. Muchas gracias, sin él este trabajo de tesis no habría sido posible.

A la Dra. Fernanda Mozzi, mi co- directora de Tesis, por acompañarme en estos 6 años siempre predispuesta y responsable para con mi trabajo. Gracias por guiarme en el mundo de las bacterias lácticas y manitol y por fomentar el trabajo en equipo. Por impulsarme a seguir y terminar la Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de las becas que posibilitaron la realización de esta Tesis.

A la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, a la Universidad Nacional de Tucumán y al Estado Argentino por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de grado de forma gratuita y posgrado.

A Viviana y Osvaldo, miembros de mi comisión de supervisión, totalmente agradecidos con los aportes en cada reunión, siempre contribuyendo a que esta Tesis sea hoy lo que es. Muchas gracias.

A Vicky de Cepario por su buena predisposición siempre y a Mabel por ayudarme en la búsqueda de bibliografía.

A Ignacio Busnelli por compartir sus conocimientos en TEM, aportar ideas en la interpretación de las imágenes y a todo el grupo del CIME.

A Kitty, Lu Ruiz y Peque (Ceci A) compañeros de laboratorio en los principios de mi Tesis, por enseñarme y acompañarme cada día. Por los ensayos compartidos, que

hacía que el trabajo sea más lindo todavía, por las charlas dentro y fuera del laboratorio. Por sus consejos en el trabajo y en la vida.

A mis últimos compañeros de laboratorio Lucre, Flor, Fernando, Ceci R., Lu Mendoza y Lu P. por compartir siempre las ideas, ayudar a entender resultados, acompañarme y apoyarme siempre que lo necesite. Por entender muchas veces mi situación e impulsarme para seguir adelante.

A las compañeras de Box que sin ellas no habría encontrado la fuerza para seguir adelante, por alentarme día a día y su predisposición incondicional. Anto, Lu, Lore y Julietita sin ustedes no habría llegado hasta aquí, gracias de corazón.

A las compañeras de escritura, por entendernos y ayudarnos entre todos, por esos mates y charlas necesarias para encontrar la fuerza e inspiración para escribir. Gracias por hacer que este año sea más fácil Lu R., Lucre, Yani y José.

A los compañeros del día a día Nadia, Male, Jhony y Guille por el aguante y la ayuda de siempre.

A Anto y Ale Co por acompañarme siempre, alentarme y ayudarme en todo lo que necesite sin interés alguno. Por los mates salvadores y por acompañarme y aconsejarme siempre dentro y fuera de CERELA.

A los amigos del SUM y CERELA por acompañarme siempre durante el almuerzo y las escapadas a comprar comida y tomar helado. Por las charlas compartidas y por hacer que ir a trabajar sea más divertido.

A Pablito y Germán por acompañarme, apoyarme y entenderme siempre.

A mis Amigas del alma, personas que fui encontrando en el camino y que siempre estuvieron. ¡Por saber entenderme, acompañarme y alentarme siempre!!! (Pili, Nechu, Gorda, Flaca, Belu, Alex, Lis, Cele, Magui, Mili, Sil, Lou, Mery, Mer).

A mi familia (Papá, Mamá, Ingrid, Ilse, Juan) por apoyarme siempre en lo que quise estudiar y dedicarme. Gracias por permitirme tomar las decisiones que tomé, alentándome siempre para que sea lo mejor para mí. Por ayudarme a seguir adelante siempre. Al resto de mi familia por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	7
INTRODUCCIÓN	11
BACTERIAS LÁCTICAS	13
<i>Generalidades</i>	13
<i>Metabolismo de hidratos de carbono en BL</i>	13
<i>Aplicaciones de las BL</i>	17
MANITOL	20
<i>Propiedades generales y aplicaciones</i>	20
<i>Mercado Mundial del Manitol</i>	22
<i>Legislación Argentina sobre el uso del manitol en alimentos</i>	24
PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE MANITOL	25
<i>Síntesis química</i>	25
<i>Producción enzimática</i>	26
<i>Producción microbiana</i>	28
PRODUCCIÓN DE MANITOL POR BACTERIAS LÁCTICAS	29
<i>Producción biotecnológica de manitol por BL heterofermentativas</i>	29
<i>Manitol 2-deshidrogenasa</i>	30
<i>Ingeniería metabólica de BL para la producción de manitol</i>	31
OBJETIVO GENERAL	35
Objetivos específicos.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Cepas en estudio	39

<i>Origen de las bacterias usadas en esta Tesis</i>	39
Conservación de células	39
Medios de Cultivo	40
Condiciones de cultivo	41
Parámetros de crecimiento	42
<i>Crecimiento celular</i>	42
<i>Determinación del pH</i>	42
Microscopía electrónica de transmisión	42
Plásmidos	43
Técnicas generales de biología molecular	43
<i>Extracción de ADN cromosómico de BL</i>	43
<i>Extracción de ADN plasmídico de BL</i>	44
<i>PCR convencional</i>	45
<i>Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	46
<i>Purificación de productos de PCR por precipitación con polietilenglicol (PEG)</i>	46
<i>Secuenciación de los amplicones de ADN</i>	47
<i>Cebadores utilizados</i>	47
<i>Digestión con Enzimas de Restricción</i>	48
<i>Reacción de Ligado</i>	49
Análisis Bioinformáticos	49
Células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH10B	50
Células electro-competentes de <i>L. reuteri</i> CRL 1101 y <i>F. tropaeoli</i> CRL 2034	51
Construcción de vectores	52
Actividades enzimáticas de Manitol 2-deshidrogenasa (MDH) y Lactato deshidrogenasa (LDH).....	53

<i>Obtención de extractos proteicos intracelulares</i>	53
<i>Determinación de la concentración de proteínas</i>	53
<i>Determinación de la actividad específica de la enzima MDH</i>	53
<i>Determinación de la actividad específica de la enzima LDH</i>	54
Determinación de azúcares y manitol por HPLC	55
<i>Desproteínización de muestras para determinación de azúcares</i>	55
<i>Determinación de azúcares residuales, manitol, ácidos orgánicos y etanol</i>	55
Determinación de D- y L- láctico	56
CAPÍTULO 1: Identificación y análisis <i>in silico</i> de los genes <i>mdh</i> en <i>L. reuteri</i> CRL 1101, <i>L. mucosae</i> CRL 573 y <i>F. tropaeoli</i> CRL 2034. Aislamiento de mutantes de CRL 2034 en genes relacionados a la biosíntesis de manitol	57
Introducción	59
Resultados	60
Identificación y caracterización <i>in silico</i> de los genes <i>mdh</i> de las cepas en estudio	60
<i>L. reuteri</i> CRL 1101	60
<i>L. mucosae</i> CRL 573	61
<i>F. tropaeoli</i> CRL 2034	63
Caracterización de las proteínas MDH de <i>L. reuteri</i> CRL 1101, <i>L. mucosae</i> CRL 573 y <i>F. tropaeoli</i> CRL 2034	66
Caracterización <i>in silico</i> de la proteína fructosa permeasa (FruPer) de <i>F. tropaeoli</i> CRL 2034	71
Estudio filogenético de las enzimas manitol 2-deshidrogenasas	72
Estudios genéticos en <i>L. reuteri</i> CRL 1101 y <i>F. tropaeoli</i> CRL 2034	74
<i>Aislamiento de mutantes <i>mdh</i>⁻ de <i>F. tropaeoli</i> CRL 2034</i>	76

Ensayos de clonado del gen <i>mdh</i> y <i>mdh-per</i>	79
Aislamiento de mutantes en genes relacionados a la biosíntesis de manitol y al balance redox en <i>F. trophaeoli</i> CRL 2034	80
CAPÍTULO 2: Crecimiento y actividades enzimáticas relacionadas con la producción de manitol por <i>Fructobacillus trophaeoli</i> CRL 2034 y sus mutantes	85
Introducción	87
Resultados	87
Análisis comparativo de los fenotipos de las mutantes aisladas.....	88
<i>Mutante mdh⁻</i>	88
<i>Mutantes CRL 2034::per, CRL 2034::ldh1, CRL 2034::ldh2 y CRL 2034::ldh3</i>	90
Características del crecimiento celular en condición estática y agitada	93
<i>Cultivo Estático</i>	93
<i>Cultivo Agitado</i>	95
Actividades MDH y LDH.....	96
Consumo de azúcares, producción de manitol y ácidos orgánicos	98
<i>Producción de manitol, ácido láctico y ácido acético</i>	99
<i>Ácido D- y L- láctico</i>	102
<i>Producción de manitol, rendimiento y producción específica</i>	103
DISCUSIÓN	107
CONCLUSIONES	123
CONCLUSIÓN GENERAL.....	127
PROYECCIONES	129
ANEXO	133
Secuencias utilizadas para el árbol filogenético.....	135

Optimización del protocolo de transformación de CRL 1101.....	137
Aislamientos de mutación del gen <i>mdh</i> y <i>ldh</i> en <i>L. reuteri</i> CRL 1101.....	140
<i>Técnica de recombineering</i>	140
<i>Técnica de recombinación simple</i>	145
BIBLIOGRAFÍA	147

RESUMEN

RESUMEN

El manitol, un azúcar-alcohol con múltiples aplicaciones industriales y en medicina, es producido por ciertas bacterias, hongos, levaduras y plantas. Algunas bacterias lácticas (BL) heterofermentativas son eficientes productoras de manitol, ya que pueden utilizar la fructosa como un aceptor de electrones alternativo y sintetizar manitol por una simple conversión enzimática mediante la enzima manitol deshidrogenasa (MDH), regenerando el NAD(P)⁺. En esta Tesis Doctoral se identificó y caracterizó el contexto genómico de los genes *mdh* en *Lactobacillus reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034, tres BL heterofermentativas seleccionadas en nuestro laboratorio por su elevada producción de manitol. En la cepa CRL 2034, se localizaron y caracterizaron además tres genes que codifican para enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), dos D-*ldh* (*ldh1* y *ldh2*) y una L-*ldh* (*ldh3*), y se confirmó que esta especie carece de la actividad alcohol deshidrogenasa. Para evaluar la influencia de distintos genes en la biosíntesis de manitol, se generaron mutantes en *mdh* y en genes relacionados a *mdh* (gen *per*; putativa permeasa que forma un operón con *mdh*) o al balance redox celular (genes *ldh*). Los genes *mdh*, *per*, *ldh1*, *ldh2* y *ldh3* de la cepa CRL 2034 fueron mutados por recombinación con plásmidos integrativos construidos con el vector pRV300 (EmR) y un fragmento interno de cada gen, de aproximadamente 400 pb. Las diversas mutantes fueron confirmadas mediante secuenciación de 16S rADN y ensayos Rep-PCR, y la inserción correcta de los plásmidos recombinantes mediante amplificación y secuenciación por PCR. Finalmente, se comparó el crecimiento de CRL 2034 y de las mutantes en el medio FYP (20 % de glucosa y 40 % de fructosa) a pH libre, 30 °C y en condición estática o de agitación (200 r.p.m), y se determinaron los parámetros cinéticos (velocidad máxima de crecimiento y de acidificación), actividad MDH y LDH y producción de manitol. La mutante *mdh* no presentó actividad MDH, no produjo manitol y requirió de O₂ para crecer, confirmando su incapacidad de utilizar fructosa como aceptor de electrones. La cepa *::ldh1* mostró aproximadamente el doble de actividad MDH (7,88 U/mg proteína) que la cepa original (CRL 2034 = 4,72U/mg proteína). El comportamiento de las mutantes *::ldh2*, *::ldh3* y *::per* fue similar a la de la cepa CRL 2034, no observándose diferencias

RESUMEN

significativas en sus respuestas a las condiciones evaluadas y en los parámetros determinados. A pesar de los mayores niveles de actividad MDH en la mutante *ldh1*, su producción de manitol fue similar a la observada en la cepa CRL 2034 a las 48 h, siendo los rendimientos de manitol (Y_M) de 84 y 88 %, respectivamente. Sin embargo, la producción específica de manitol por unidad formadora de colonia fue mayor en *::ldh1* ($1,99 \times 10^{-8}$ mg/UFC) que en CRL 2034 ($1,64 \times 10^{-8}$ mg/UFC) demostrando que la mutante es más eficiente para producir manitol, a pesar de su menor crecimiento.

ABSTRACT

Mannitol, a sugar-alcohol with multiple industrial and medical applications, is produced by certain bacteria, fungi, yeasts and plants. Some heterofermentative lactic acid bacteria (LAB) are efficient mannitol producers, since they can use fructose as an alternative electron acceptor and synthesize mannitol by a simple enzymatic conversion by the mannitol dehydrogenase (MDH) enzyme, regenerating NAD(P)⁺. In this Doctoral Thesis the genomic context of *mdh* genes in *Lactobacillus reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 and *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034, three heterofermentative LAB selected in our laboratory for their high mannitol production, were identified and characterized. In the CRL 2034 strain three genes encoding lactate dehydrogenase (LDH), two D-*ldh* (*ldh1* and *ldh2*) and one L-*ldh* (*ldh3*), were also localized and characterized. Additionally, the lack of the activity of the enzyme alcohol dehydrogenase was confirmed in this species. To evaluate the influence of different genes on mannitol biosynthesis, mutants were generated in *mdh* and *mdh-per* genes (a putative permease that forms an operon with *mdh*) or to redox balance- (*ldh* genes) -related genes. The *mdh*, *per*, *ldh1*, *ldh2* and *ldh3* genes of the CRL 2034 strain were mutated by simple recombination with integrative plasmids constructed with the vector pRV300 (EmR) and an internal fragment from each gene (400 bp approximately). The mutants were confirmed by 16S rDNA sequencing and Rep-PCR assays, and the correct insertion of the recombinant plasmids by PCR amplification and sequencing. Finally, the cell growth, kinetic parameters (maximum rate of growth and acidification), MDH and LDH activities and mannitol production of CRL 2034 and its mutants grown in FYP medium (20 % glucose and 40 % fructose) at free pH, 30 °C, under static or stirring conditions (200 r.p.m.) were compared. The *mdh* mutant had no MDH activity, was not able to produce mannitol and required O₂ to grow, confirming its inability to use fructose as an external electron acceptor. The *::ldh1* strain showed approximately twice MDH activity value (7.88 U/mg protein) than the original strain (CRL 2034 = 4.72 U/mg protein). The behavior of the mutants *::ldh2*, *::ldh3* and *::per* were similar to CRL 2034 strain, with no significant differences in their responses to the evaluated culture conditions and studied parameters. Despite the

RESUMEN

higher levels of MDH activity in *ldh1* mutant, its production of mannitol was similar to that of the wild type strain at 48 h, with mannitol yields (Y_M) of 84 and 88 %, respectively. However, the specific mannitol production (mg of produced mannitol per colony forming unit) was higher in *::ldh1* (1.99×10^{-8} mg/CFU) than in CRL 2034 (1.64×10^{-8} mg/CFU) showing that this mutant is more efficient in producing mannitol, despite its lower cell growth.

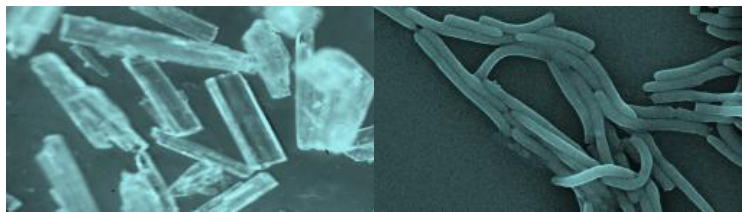
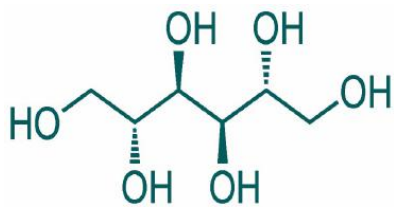
ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

::	Mutación insercional
\triangle	Mutación por deleción
p/v	Peso en volumen
p/p	Peso en peso
v/v	Volumen en volumen
μg	Microgramo/s
μL	Microlitro/s
μm	Micrómetro/s
μM	Micromolar
μF	Microfaradio/s
μmax	Velocidad específica de crecimiento máxima
Ω	Ohmio/s
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ARN	Ácido ribonucleico
Atm	Atmósfera/s
ATP	Adenosina trifosfato
BL	Bacterias lácticas
c. s. p.	Cantidad suficiente para
CAA	Código Alimentario Argentino
CAGR	Tasa de crecimiento anual compuesto, del inglés <i>Compound Annual Growth Rate</i>
cm	Centímetro/s
Cm	Cloranfenicol
col.	Colaboradores
CIF	Costos, seguro y flete, del inglés <i>Cost Insurance and Freight</i>
dNTPs	Desoxinucleósidos
DO	Densidad óptica
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Em	Eritromicina
EMP	Vía Embden-Meyerhof-Parnas
<i>F.</i>	<i>Fructobacillus</i>
FDH	Formiato deshidrogenasa
Fig.	Figura
Fru	Fructosa

g	Gramo/s
GC	Guanina y Citosina
GDH	Glucosa deshidrogenasa
Glu	Glucosa deshidrogenasa
h	Hora/s
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución, del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovoltio/s
L	Litro/s
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lac.</i>	<i>Lactococcus</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
<i>Leu.</i>	<i>Leuconostoc</i>
Log	Logaritmo
M	Molar
M1-PDH	Manitol 1-P-deshidrogenasa
MDH	Manitol 2-deshidrogenasa
MDR	Superfamilia de Reductasas/deshidrogenasas de cadena media, del inglés <i>Medium-chain alcohol/polyol Dehydrogenase/Reductase</i>
mg	Miligramo/s
min	Minuto/s
mL	Mililitro/s
mM	Milimolar
mmol	Milimol/es
Mpb	Megapares de bases
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nm	Nanometro
<i>O.</i>	<i>Oenococcus</i>
ON	Toda la noche (16 h), del inglés <i>overnight</i>
p	Peso
P	Promotor
P-	Fosfato
pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Pico gramos

PK	Vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa
Pseu.	<i>Pseudomonas</i>
r.p.m.	Revoluciones por minuto
s	Segundos
subsp.	Subespecie
SDS	Dodecilsulfato de sodio
T _m	Temperatura de fusión o temperatura de <i>melting</i>
T _n	Toneladas
U	Unidad/es enzimática/s
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltaje
V _f	Volumen final
vol.	Volumen/es
x _g	Multiplicado por la fuerza de la gravedad
Y _M	Rendimiento de manitol en función a la fructosa consumida
Y	Rendimiento de manitol en función a la fructosa total agregada al medio
Y _{MU}	Producción específica de manitol por UFC

INTRODUCCIÓN



BACTERIAS LÁCTICAS

Generalidades

Las bacterias lácticas (BL) pertenecen al filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales, el que incluye seis familias (Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, y Streptococcaceae) y 44 géneros. El género *Lactobacillus* consta de 223 especies y el género *Fructobacillus* de 5 especies descritas hasta agosto de 2017 (LPSN, 2017).

Las BL constituyen un grupo muy diverso de bacterias ácido tolerantes que se caracterizan por producir ácido láctico como principal o único producto de la fermentación de azúcares. Por su inocuidad, son reconocidas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Estas bacterias poseen genomas con un contenido de GC entre 33-51 %, son cocos o bacilos Gram positivos, catalasa negativa, no esporulantes, en general no móviles y la mayoría no son aeróbicas, pero si aerotolerantes (Halász, 2009). Algunas especies son capaces de respirar aeróbicamente utilizando oxígeno como aceptor final de electrones cuando un grupo hemo o grupo hemo y menaquinona están presentes en el medio; el crecimiento en condiciones aeróbicas de estos últimos microorganismos se traduce en una mayor biomasa final (Duwat y col., 2001).

Las BL se encuentran naturalmente en una gran diversidad de nichos, tales como alimentos fermentados, en el tracto gastrointestinal del hombre y animales, en vagina, en plantas, en cereales, en el suelo y en el agua. Sus requerimientos nutricionales son complejos y sus medios de cultivo requieren ser suplementados con aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos, péptidos y carbohidratos, entre otros (Mayo y col., 2010).

Metabolismo de hidratos de carbono en BL

Las BL se clasifican en **homofermentativas** o **heterofermentativas** de acuerdo a como utilizan los carbohidratos como fuente de energía en condiciones estándares de crecimiento (sin glucosa limitante, en presencia de factores de crecimiento como

aminoácidos, vitaminas y precursores de ácidos nucleicos y en limitada disponibilidad de oxígeno). Mientras las BL homofermentativas fermentan los azúcares y producen ácido láctico como principal producto final a través de la vía de **Embden–Meyerhof–Parnas** (EMP) (Fig. 1), las BL heterofermentativas producen cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y acetato por la vía de la **fosfoctolasa** (PK), también conocida como vía de las pentosas fosfato o vía de Warburg-Dickens (Fig. 2) (Wisselink y col., 2002). Las BL heterofermentativas pueden dividirse en facultativas u obligadas: las **BL heterofermentativas facultativas**, fermentan hexosas y pentosas por las vías EMP y PK, respectivamente, mientras que las **BL heterofermentativas obligadas** degradan tanto hexosas como pentosas por la vía PK (Hammes y Vogel, 1995).

Cuando el flujo glucolítico es bajo, las bacterias homofermentativas pueden cambiar su metabolismo hacia la fermentación ácido-mixta y producir, además de lactato, formiato, acetato, dióxido de carbono (CO_2) y etanol en muy bajas concentraciones. El acetato puede acumularse en el medio de cultivo o bien —dependiendo del pH y de la disponibilidad de NAD(P)H— puede reducirse a etanol con consumo de NAD(P)H. Este cambio se debe a la regulación de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y formiato piruvato liasa, que están sujetas a control por las tasas de flujo metabólico y los cambios en la relación $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ (Fig. 1). Esta ruta permite la ganancia adicional de 1 mol de ATP pero con menor producción de ácido láctico. A su vez, dado que el formiato puede descarboxilarse, se puede producir un mol adicional de CO_2 por esta vía (bacterias productoras de gas) (Zaunmüller y col., 2006; Pessione, 2012).

Algunas BL heterofermentativas poseen una baja actividad acetaldehído deshidrogenasa y, en consecuencia, una baja capacidad para re-oxidar el NAD(P)H por la vía de la conversión de acetil-P a etanol, lo que constituye un factor limitante para el crecimiento de estas bacterias en glucosa. En estos casos, el oxígeno, piruvato, citrato o fructosa presente en el medio de cultivo puede utilizarse como aceptor alternativo de electrones proporcionándole mayor velocidad de crecimiento a las células (Zaunmüller y col., 2006; Årsköld y col., 2008).

INTRODUCCIÓN

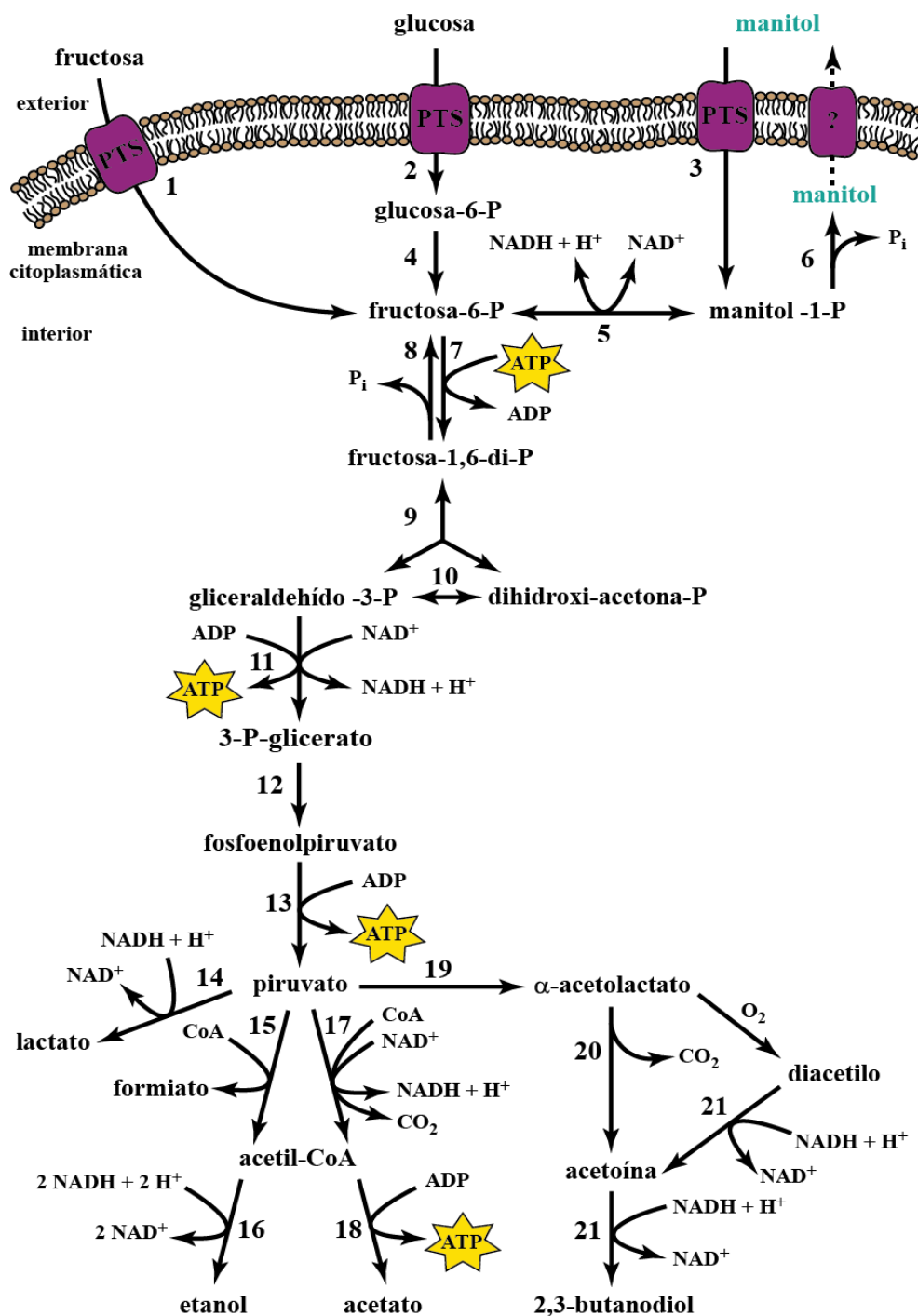


Figura 1. Vía de fermentación de hexosas en BL homofermentativas.

1. Sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa (PTS) para fructosa; 2. Sistema PTS para glucosa; 3. Sistema PTS específico para manitol; 4. Fosfoglucosa isomerasa; 5. Manitol 1-fosfato deshidrogenasa; 6. Manitol 1-fosfatasa; 7. 6-Fosfofructoquinasa; 8. Fructosa-difosfatasa; 9. Fructosa 1,6-difosfato aldolasa; 10. Triosafosfato isomerasa; 11. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; 12. Fosfogliceromutasa y enolasa; 13. Piruvato quinasa; 14. Lactato deshidrogenasa; 15. Piruvato-formiato liasa; 16. Acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa; 17. Piruvato deshidrogenasa; 18. Acetato quinasa; 19. α-acetolactato sintasa; 20. α-acetolactato descarboxilasa; 21. 2,3-butanediol deshidrogenasa. Figura modificada de Ruiz-Rodríguez y col. (2017).

INTRODUCCIÓN

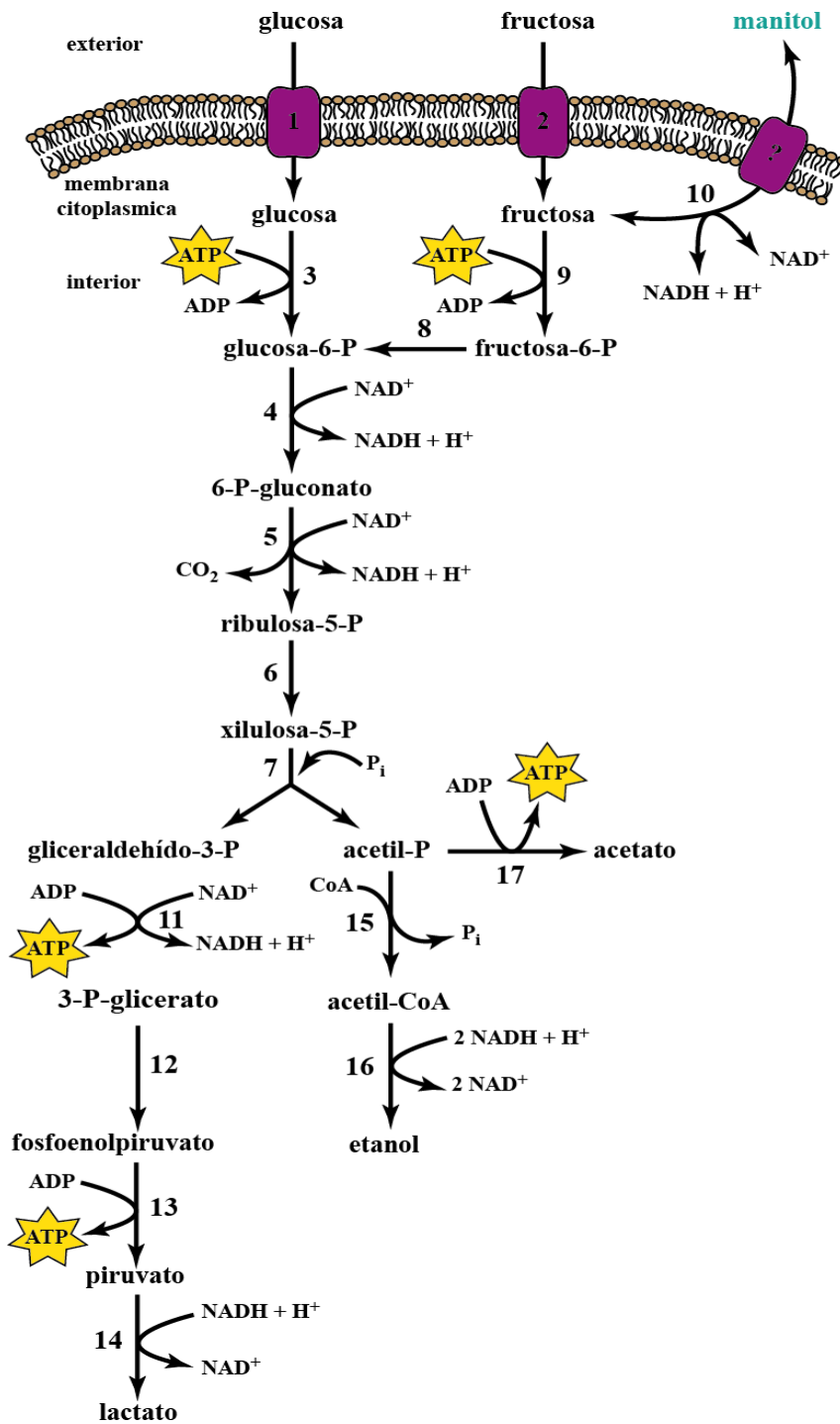


Figura 2. Vía de fermentación de hexosas en BL heterofermentativas.

1. Glucosa permeasa; 2. Fructosa permeasa; 3. Glucoquinasa; 4. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; 5. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa; 6. Epimerasa; 7. D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa; 8. Glucosa-fosfato isomerasa; 9. Fructoquinasa; 10. Manitol 2-deshidrogenasa; 11. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y fosfoglicerato quinasa; 12. Fosfogliceromutasa y enolasa; 13. Piruvato quinasa; 14. Lactato deshidrogenasa; 15. Fosfato acetiltransferasa; 16. Acetaldehído deshidrogenasa y Alcohol deshidrogenasa; 17. Acetato quinasa. Modificada de Ruiz-Rodríguez y col. (2017).

Las BL heterofermentativas que utilizan la fructosa como aceptor de electrones externo lo hacen mediante la acción de la enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH), que cataliza la conversión de la fructosa en manitol. En esta reacción, el NAD(P)H formado en las primeras etapas de la fermentación de azúcares es re-oxidado a NAD(P)⁺, y el acetyl-P acumulado se convierte en acetato, y no en etanol, lo que genera un mol extra de ATP.

Aplicaciones de las BL

Debido a sus características metabólicas, las BL ocupan un papel central en la producción de alimentos y bebidas fermentadas; son utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos fermentados (yogures, quesos y leches fermentadas), masas ácidas, encurtidos, chucrut y embutidos, como así también en la fermentación de frutas, vegetales, cereales y aceitunas. Las BL pueden fermentar una amplia gama de azúcares y transformarlos principalmente en ácido láctico; este proceso de acidificación permite prolongar la vida útil de los productos fermentados ya que inhibe el crecimiento de muchos microorganismos deteriorantes y de los patógenos humanos más comunes. Además de esta función relevante en la conservación de los alimentos, las BL contribuyen al sabor, textura, perfil sensorial agradable y al valor nutricional de los alimentos fermentados mediante la formación de compuestos de aroma, exopolisacáridos, proteínas, vitaminas y polioles (Leroy y De Vuyst, 2004; Hugenholtz, 2008; Gaspar y col., 2013).

Ciertas BL tienen características probióticas, ejerciendo efectos beneficiosos para la salud o siendo capaces de formar compuestos bioactivos, por lo que se las incluyen en la elaboración de alimentos funcionales con propiedades específicas (Stanton y col., 2005; Hebert y col., 2010). Debido a su versatilidad metabólica, las BL pueden ser también utilizadas como fábricas celulares en la producción de productos químicos, farmacéuticos u otros productos industriales relevantes. Esas aplicaciones incluyen la producción industrial de compuestos tales como biopolímeros, enzimas, etanol, ácido láctico, compuestos antibacterianos (por ejemplo bacteriocinas), vitaminas y azúcares de bajas calorías, entre otros (Fig. 3A) (Ruiz-Rodríguez y col., 2017).

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de herramientas genéticas, aplicables a este importante grupo de microorganismos, permitió la manipulación dirigida y efectiva de las BL abriendo el camino a nuevas aplicaciones biotecnológicas. A la fecha, se han desarrollado técnicas para la expresión y secreción de proteínas heterólogas en BL, particularmente en el organismo modelo *Lactococcus lactis* (Gaspar y col., 2013), logrando la producción de compuestos de alto valor como enzimas industriales y proteínas de origen viral, bacteriano o de eucariotas con aplicaciones terapéuticas (Steidler y Rottiers, 2006; Pontes y col., 2011) (Fig. 3).

En el área de la ingeniería metabólica, se llevaron a cabo algunas modificaciones genéticas (en general, en bacterias de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*) para la producción de ácido láctico, 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, biocombustibles, compuestos de aroma, edulcorantes, vitaminas y polisacáridos complejos (Fig. 3B).

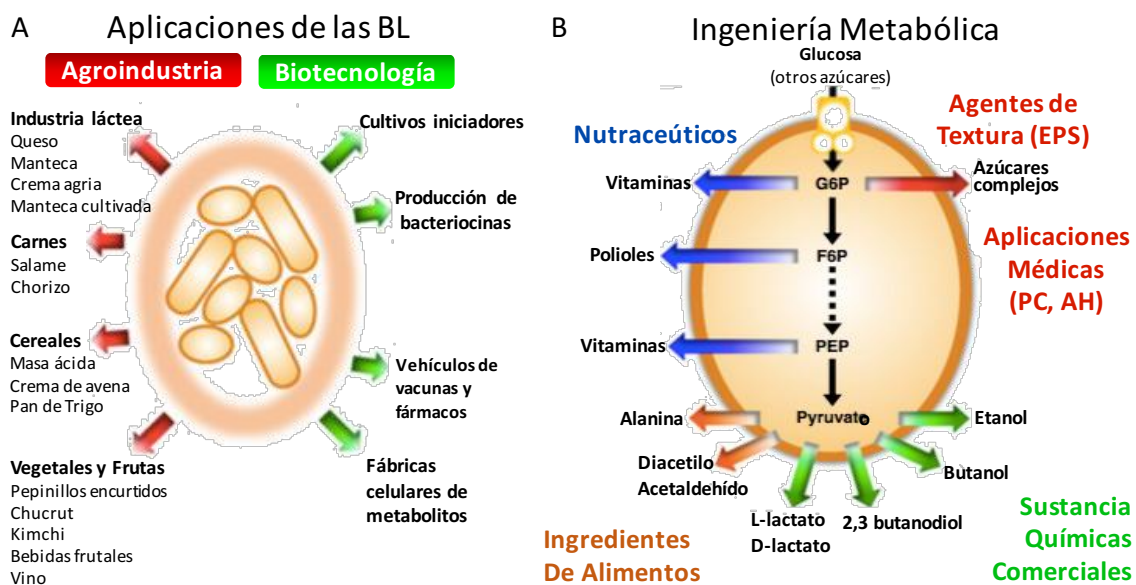


Figura 3. Aplicaciones de BL en (A) agroindustria y (B) biotecnología.

EPS: exopolisacáridos; PC: polisacáridos capsulares; AH: ácido hialurónico; G6P: glucosa 6-fosfato; F6P: fructosa 6-fosfato; PEP: fosfoenolpiruvato. Modificada de Gaspar y col. (2013).

INTRODUCCIÓN

El metabolismo relativamente simple de las BL, sus genomas pequeños (~1,8 a 3,4 Mpb) con escasa redundancia, su crecimiento rápido, las elevadas tasas de captación de azúcares, la posibilidad en desacoplar el crecimiento de la producción de metabolitos y los escasos sistemas de control en comparación con otros modelos de ingeniería metabólica (como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*), han contribuido a la generación de fábricas celulares a partir de las mismas (Gaspar y col., 2013).

POLIOLES

Los polioles, o azúcares alcoholes, son hidratos de carbono hidrogenados no cíclicos en los que el grupo carbonilo (>C=O), aldehído o cetona, del azúcar precursor se reduce al alcohol (>CH-OH) primario o secundario correspondiente (Cummings y Stephen, 2007) (Fig. 4). La denominación "poliol" es una sinopsis de "polialcohol" o "alcohol polihídrico", del inglés "*polyhydric alcohol*" (Livesey, 2003). Algunas de sus propiedades están relacionadas a su poder edulcorante bajo en calorías, de absorción lenta y parcial en el intestino delgado. Estos compuestos también tienen muchos beneficios funcionales y se aplican ampliamente en las industrias alimentaria, química y farmacéutica (Akinterinwa y col., 2008; Patra y col., 2009; Monedero y col., 2010).

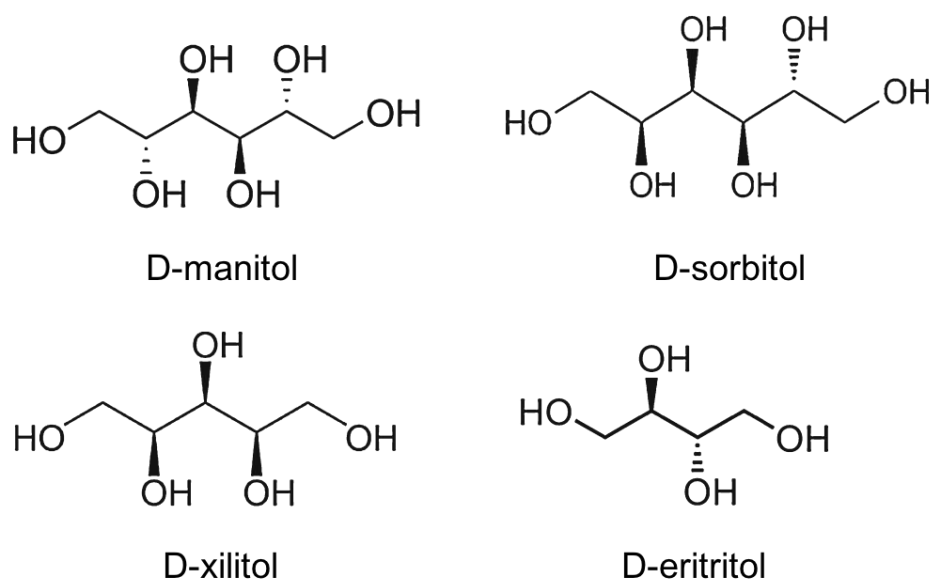


Figura 4. Estructura química de los polioles más comunes utilizados en la industria.

Debido a su dulzura comparable a la de la fructosa y sacarosa, los polioles son sustitutos comunes del azúcar en los productos alimenticios. Además, se les han atribuido ciertas propiedades promotoras de la salud como propiedades de bajo índice glucémico, de baja insulinemia y anticariogénicas, entre otras (Livesey, 2003; Van Loveren, 2004). Los polioles más utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica son manitol, sorbitol, xilitol y eritritol (Fig. 4).

A continuación, se describe el poliol **manitol** ya que en este trabajo de Tesis doctoral se estudia su producción por BL heterofermentativas.

MANITOL

El manitol es un poliol de seis carbonos derivado de la D-fructosa. Se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza y es el poliol más abundante en el reino vegetal. Es el principal constituyente de los exudados secos de árboles y arbustos (plátano, olivo, etc.). El exudado seco de la savia del maná (*Fraxinus ornus*), conocido como azúcar maná, contiene hasta 50 % de manitol (Schwarz, 1994). Se lo puede encontrar también en frutas (i.e., frutillas); en el grano de cacao; en el muérdago; en vegetales comestibles (i.e., calabazas, cebollas, perejil y apio); en los líquenes y en diversas plantas de los géneros *Euonymus*, *Hebe*, y *Digitalis*. Además, el manitol es producido por ciertas algas pardas (*Laminaria*); por algunos hongos comestibles como champiñones frescos; hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*; levaduras del género *Candida*; y bacterias (i.e., *Pseudomonas (Pseu.) putida* y principalmente por algunas BL heterofermentativas) (Kets y col., 1996; Lawson, 1997; Song y Vieille, 2009; Monedero y col., 2010; Schiweck y col., 2012).

Propiedades generales y aplicaciones

Las propiedades del manitol son bastante similares a las de su estereoisómero sorbitol (Fig. 4). Sin embargo, la solubilidad del manitol en agua es significativamente menor a la del sorbitol y a las de la mayoría de los otros polioles. El manitol es escasamente soluble en disolventes orgánicos, como etanol y glicerol, y prácticamente insoluble en éter, cetonas e hidrocarburos. Al solidificar, genera cristales en forma de agujas

INTRODUCCIÓN

ortorrómbicas blancas y su temperatura de fusión es de 165-168 °C (Schwarz, 1994). El sabor dulce del manitol es 50 % menor que el de la sacarosa con un valor calórico también reducido respecto a este azúcar (1,6 frente a 4,0 calorías por gramo). Este poliol genera un efecto refrescante deseable debido a su elevada entalpía de disolución (120,9 kJ/kg), no absorbe el agua como el azúcar (higroscopicidad muy baja), es químicamente inerte, y posee las propiedades generales descritas para los polioles como bajo índice glucémico e insulínico y es anticariogénico (Lawson, 1997; Burger y col., 2000; Livesey, 2003; Schiweck y col., 2012). Por estas propiedades, el manitol es ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica y médica. El manitol es considerado un compuesto GRAS por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) (Salminen y Hallikainen, 2002) y como aditivo alimentario (E421) por la Unión Europea, por lo que su uso en alimentos es considerado seguro (Vrancken y col., 2010).

En la industria alimentaria se utiliza principalmente como edulcorante, especialmente en productos para pacientes diabéticos; para espolvorear la superficie de los chicles en lámina llamados "sin azúcar" (Lawson, 1997); y para mejorar la calidad de los caramelos duros a base de sorbitol o maltitol. Gracias a su baja higroscopicidad, el manitol se añade a los postres instantáneos en polvo para reducir la absorción de humedad y aumentar la fluidez (Schiweck y col., 2012).

Respecto a los efectos benéficos para la salud, el manitol es parcialmente absorbido en el intestino delgado y puede llegar hasta el colon y ser degradado por bacterias produciendo ácidos grasos de cadena corta confiriendo efectos beneficiosos en la salud del huésped. Por ello, la adición de manitol a los alimentos da lugar a productos con valor nutricional adicional (alimentos funcionales) (Munster y Nagengast, 1993; Schiweck H, 1994; Liong y Shah, 2005). Sin embargo, su ingesta diaria no debe exceder los 20 g por persona ya que posee un bajo umbral laxante pudiendo provocar la producción de gas y diarrea.

En la industria farmacéutica el manitol se emplea en formulaciones de comprimidos, tabletas masticables, polvos, granulados, etc. debido a su baja higroscopicidad, su capacidad de enmascarar sabores indeseables, su baja reactividad química y sus

excelentes propiedades mecánicas de compresión (Debord y col., 1987; Schiweck y col., 2012).

En medicina, el manitol se utiliza como un poderoso diurético osmótico (Osmitrol) con el fin de prevenir y tratar la insuficiencia renal aguda y para la eliminación de sustancias tóxicas; en cirugías, ayuda a prevenir edemas cerebrales. El hexanitrateo de manitol es un vasodilatador bien conocido, utilizado en el tratamiento de la hipertensión (Johnson, 1976). El manitol elimina también radicales hidroxilos (Shen y col., 1997). Al ser hipertónico este poliol puede mejorar el transporte de fármacos a través de la barrera hemato-encefálica por lo que se usa para el tratamiento de enfermedades cerebrales (Rapoport, 2001; Miller, 2002). La inhalación del manitol mejora la hidratación y las propiedades superficiales del esputo en pacientes con fibrosis quística (Daviskas y col., 2010; Saha y Racine, 2011).

Mercado Mundial del Manitol

La demanda del mercado mundial de manitol fue de 16.600 toneladas en 2015 y se espera que llegue a 36.000 tn en 2024, incrementando a una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR del inglés *Compound Annual Growth Rate*) de 9 % de 2016 a 2024, alcanzando los 418,3 millones de dólares (USD) según el informe de *Grand View Research, Inc.* En la Fig. 5 se muestran los ingresos del mercado de manitol en Estados Unidos desde el año 2014 proyectado hasta el año 2024, dividido en las distintas categorías de la utilización del mismo (Grand View Research).

El manitol utilizado como aditivo alimentario fue el segmento líder de aplicaciones en 2015, representando el 37 % del volumen total del mercado, debido a la creciente concientización sobre la salud, siendo Asia el mercado regional más dominante ocupando más del 60 % de la demanda mundial. Las principales empresas de la industria que comercializan manitol son Roquette, Cargill, SPI Polyols Inc., SPI Pharma, Bright Moon Seaweed, Singsino Group Ltd., Hebei Huaxu Pharmaceutical Co. Ltd, EMD Millipore y Moga International Ltd.

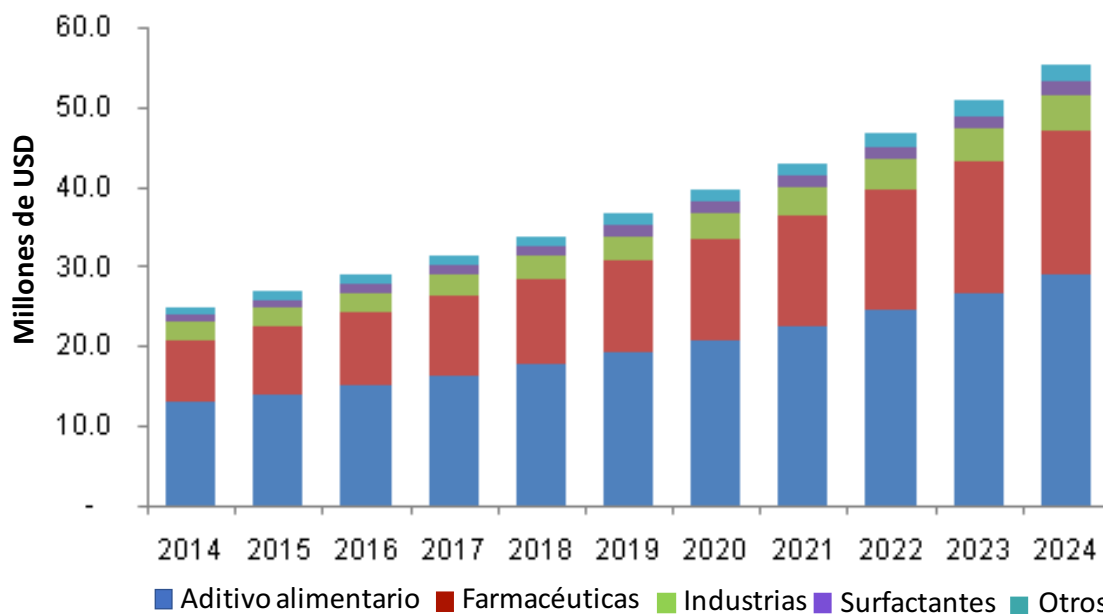


Figura 5. Ingresos (en millones de dólares) del mercado de manitol en los Estados Unidos, proyectado desde 2014 hasta 2024.

Se espera que la creciente demanda de productos de confitería y panadería, como caramelos, gomas de mascar y pastillas, impulse el crecimiento del mercado. Además, se presenta la expectativa de que el cambio en el estilo de vida junto con la prevalencia de enfermedades relacionadas con el consumo de azúcar en China, Japón e India beneficie al mercado. Se cree que el producto farmacéutico es el segmento de aplicación que crecerá más rápidamente a un CAGR estimado del 9,6 % de 2016 a 2024.

La industria del manitol es favorecida por los reglamentos elaborados por los gobiernos europeos y estadounidenses, y por los avances tecnológicos que permiten la producción de materias primas más baratas. Las innovaciones para la producción de manitol con BL se encuentran en desarrollo con lo que se espera aumentar el rendimiento junto con la calidad de alta pureza.

Argentina es un país importador de este azúcar alcohol, siendo Brasil, Estados Unidos y Francia los principales proveedores, según los datos del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC). En la Fig. 6 se pueden observar el volumen en toneladas de manitol importados por país proveedor y los montos totales de costos, seguro y

INTRODUCCIÓN

flete (CIF del inglés *Cost Insurance and Freight*) en millones USD entre los años 2011 hasta el 26 de septiembre de 2017. Se puede observar que existió un aumento en las toneladas de manitol importadas entre 2011 y 2013 superando los 5,5 millones de USD de CIF en el año 2013, un descenso en 2014, y un nuevo aumento en 2015 superando incluso los montos y costos de los años anteriores. En el año 2016, la importación supera las 1000 toneladas y hasta septiembre de este año se importaron más de 500 toneladas de manitol. Estos valores demuestran que existe una gran vacancia de manitol en Argentina y su producción en nuestro país sería muy ventajosa.

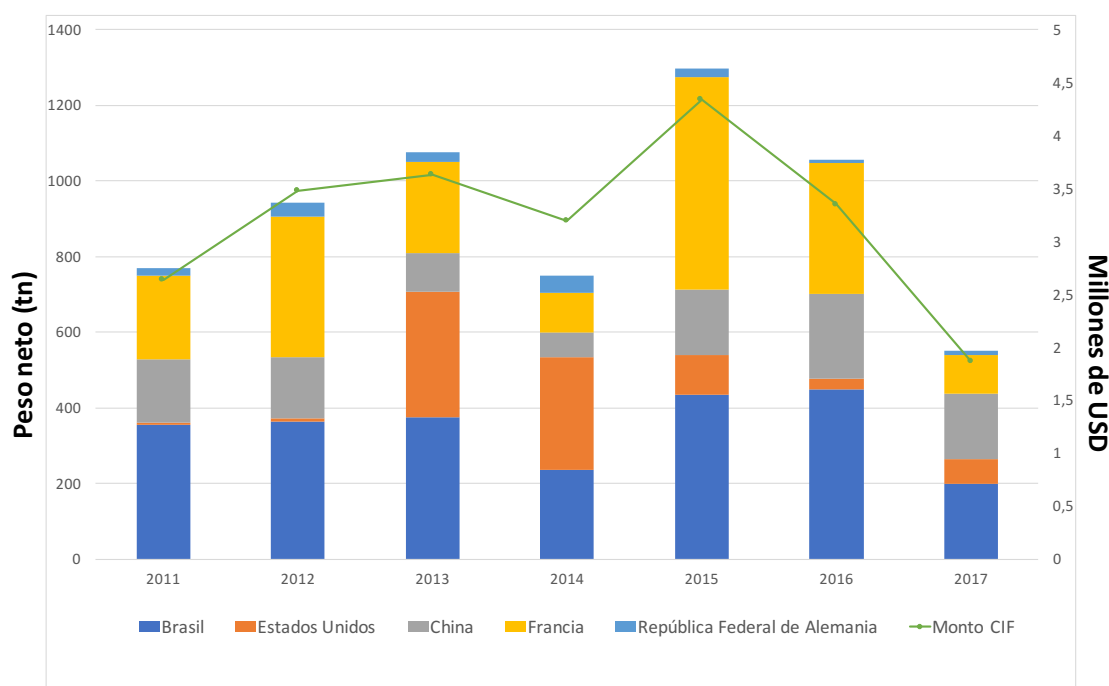


Figura 6. Importación de manitol en Argentina; toneladas por país proveedor y monto total CIF por año (millones de USD); 2011-2017. Fuente: INDEC.

Legislación Argentina sobre el uso del manitol en alimentos

El Código Alimentario Argentino (CAA) puesto en vigencia por la Ley Nº 18.284 y reglamentado por el Decreto Nº 2126/71 (sitio web de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT), en el "Capítulo XVII: Alimentos de Régimen o Dietéticos" (actualización 03/2013) establece que "[...] pueden utilizarse los siguientes edulcorantes nutritivos: Sorbitol, Xilitol y Jarabe de

INTRODUCCIÓN

Maltitol, quedando regulado su empleo por las buenas prácticas de manufactura.

Puede utilizarse manitol con las siguientes limitaciones:

- golosinas y caramelos duros hasta 5 % (p/p)
- chicles hasta 40 % (p/p)
- golosinas blandas, caramelos en barra y chocolate hasta 30 % (p/p)
- pastillas, confites y chocolates para horno hasta 8 % (p/p)
- mermeladas y jaleas hasta 15 % (p/p)
- todo otro alimento hasta 2,5 % (p/p)”

Asimismo, el manitol forma parte de la Lista General Armonizada de Aditivos Alimentarios y sus Clases Funcionales del CAA, bajo el código E421, donde se le asignan las siguientes funciones: edulcorante, estabilizante, anti-humectante, anti-aglutinante, agente de masa, emulsionante y espesante.

PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE MANITOL

Síntesis química

El manitol se produce industrialmente por hidrogenación a alta presión de mezclas de fructosa/glucosa en solución acuosa a altas temperaturas (120-160 °C) con níquel Raney como catalizador y gas hidrógeno (Soetaert, 1990). La α -fructosa se convierte en manitol y la β -fructosa se convierte en sorbitol mientras que la glucosa se hidrogena exclusivamente a sorbitol. Debido a la escasa selectividad del catalizador de níquel, la hidrogenación de una mezcla de fructosa/glucosa 50:50 da como resultado una mezcla aproximada de 25:75 de manitol y sorbitol, respectivamente. El aislamiento de manitol se basa en las diferentes solubilidades que presenta con el sorbitol (Schiweck y col., 2012). Las etapas de purificación generalmente comprenden concentración, cristalización en frío, separación del cristal y secado lo que genera costos de producción aún mayores y rendimientos disminuidos (Johnson, 1976; Soetaert y col., 1995). Incluso la hidrogenación de fructosa pura da lugar a rendimientos de manitol de 48-50 % (Devos, 1995). Este proceso presenta dos grandes

desventajas: i) es económicamente costoso debido a las fuertes condiciones de presión y temperatura utilizadas, así como a la necesidad de emplear sustratos de partida extremadamente puros; ii) está asociado a un bajo rendimiento de manitol y escasa pureza del producto final debido a la baja selectividad del catalizador utilizado. Estas desventajas aumentan el costo global asociado al proceso.

Con el fin de obtener mayores rendimientos de producción de manitol se han empleado varias estrategias, como utilizar la enzima glucosa isomerasa para convertir la glucosa a fructosa (Makkee y col., 1985), y producir manitol a partir de la hidrogenación de la manosa (Devos, 1995) aunque para ello es necesario obtener la manosa por epimerización química de la glucosa aumentando el costo total al utilizar procesos de múltiples etapas.

Producción enzimática

La producción de manitol puede realizarse utilizando enzimas, considerando que la reducción de D-fructosa a D-manitol requiere de la enzima MDH dependiente de NAD(P)H (MDH, EC 1.1.1.67) (Fig. 7). Esta enzima ha sido purificada a partir de varios microorganismos tales como *Lactobacillus brevis* (Martinez y col., 1963; Liu y col., 2005), *Leuconostoc mesenteroides* y *Leu. pseudomesenteroides* (Sakai y Yamanaka, 1968; Aarnikunnas y col., 2002; Hahn y col., 2003), la levadura *Torulaspora delbrueckii* (Nidetzky y col., 1996), otras bacterias como *Rhodobacter sphaeroides* (Schneider, 1989) y *Pseu. fluorescens* (Brünker y col., 1997), y a partir del alga roja *Caloglossa leprieurii* (Karsten y col., 1997). También se aisló y purificó la MDH dependiente de NADPH (EC 1.1.1.138) a partir de hongos filamentosos como *Aspergillus parasiticus* (Niehaus y Dilts, 1982) y bacterias como *Zymomonas mobilis* (Viikari y Korhola, 1986) y *Gluconobacter suboxydans* (Adachi y col., 1999). Más recientemente, se aisló esta enzima a partir de diversas BL, entre ellas *L. sanfranciscensis* (Korakli y Vogel, 2003), *L. intermedius* (Saha, 2004) y *L. reuteri* (Sasaki y col., 2005).

El principal factor limitante de la producción enzimática de manitol es la dependencia de la enzima MDH del cofactor NADH o NADPH, que es altamente costoso, haciendo que este proceso sea económicamente inviable.

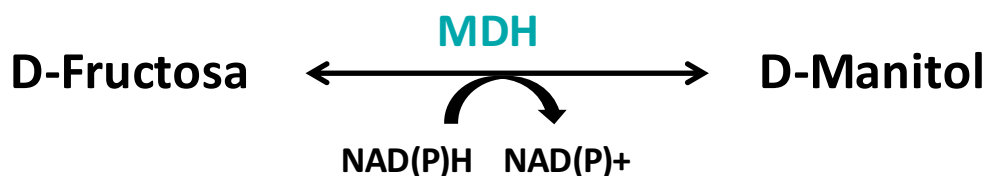


Figura 7. Reacción de conversión de la fructosa a manitol por la enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH).

Para contrarrestar este problema se llevan a cabo distintas estrategias para regenerar el cofactor. Una de ellas, descrita en la Fig. 8, es generar la conversión simultánea de fructosa y formiato usando MDH y formiato deshidrogenasa de una cepa de *Pseu. fluorescens* recombinante (Wichmann y col., 1981; Slatner y col., 1998).

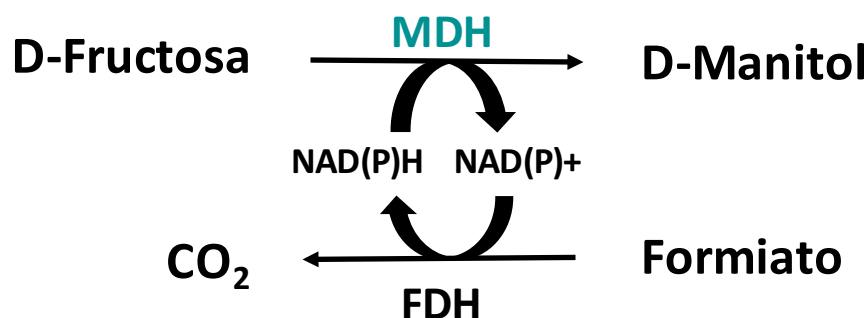


Figura 8. Regeneración del cofactor NAD(P)H usando manitol 2-deshidrogenasa (MDH) y formiato deshidrogenasa (FDH).

También se puede regenerar el cofactor utilizando una mezcla de glucosa/fructosa que se convierte en gluconato y manitol con las enzimas glucosa deshidrogenasa (GDH) y MDH como se muestra en la Fig. 9 (Howaldt y col., 1988). La GDH dependiente de NAD(P)⁺ convierte la glucosa en ácido glucónico y genera NAD(P)H mientras que la MDH utiliza NAD(P)H para reducir la fructosa a manitol y de esta forma se regenera NAD(P)⁺. El ácido glucónico tiene múltiples aplicaciones en la industria química, farmacéutica, textil, de alimentos y bebidas. También se utiliza en la industria de la construcción como un aditivo para aumentar la resistencia y la estabilidad del cemento (Kulbe y col., 1987).

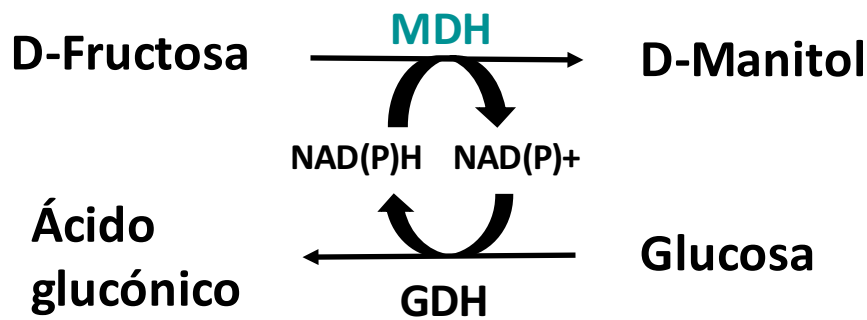


Figura 9. Regeneración del cofactor NAD(P)H usando manitol 2-deshidrogenasa (MDH) y glucosa deshidrogenasa (GDH).

Estas y otras estrategias se han utilizado para mejorar el rendimiento y bajar los costos de la producción enzimática de manitol. Sin embargo, aún quedan por resolver varios inconvenientes relacionados a estos procesos de hidrogenación enzimática, como la retención del cofactor en el reactor y la fuerte inhibición de la enzima por formación del producto (Soetaert W, 1999).

Producción microbiana

Como una alternativa interesante a la producción química y enzimática, el manitol puede ser sintetizado biotecnológicamente por fermentación microbiana. Se sabe que las levaduras, algunos hongos y algunas BL son capaces de producir manitol naturalmente (Song y Vieille, 2009; Saha y Racine, 2011).

Dentro de las BL, las homofermentativas y bajo ciertas condiciones de cultivo, pueden convertir la glucosa o fructosa en manitol utilizando varias enzimas, en cambio las BL heterofermentativas pueden convertir la fructosa a manitol en una sola reacción al utilizar la fructosa presente como aceptor de electrones externos (Wisselink y col., 2002; Monedero y col., 2010).

La ventaja de utilizar microorganismos para la producción de manitol reside en que pueden producir cofactores como resultado del catabolismo de los carbohidratos; es decir, tienen incorporada la maquinaria necesaria para el suministro de cofactores, por lo que no es necesario añadirlos al medio de reacción. Además, se han

desarrollado estrategias de ingeniería metabólica para mejorar la producción de manitol por estos microorganismos (Akinterinwa y col., 2008; Monedero y col., 2010; Ortiz y col., 2013).

PRODUCCIÓN DE MANITOL POR BACTERIAS LÁCTICAS

Producción biotecnológica de manitol por BL heterofermentativas

En la actualidad diversas BL se utilizan como "fábricas celulares" para la producción de ciertos metabolitos para ser utilizados como compuestos purificados o para ser producidos *in situ* en alimentos fermentados. El uso de BL como fábricas celulares se debe principalmente a que: i) son microorganismos de grado alimentario, ii) ejercen efectos beneficiosos en el tracto gastrointestinal, iii) sus metabolitos pueden aplicarse directamente en los productos alimenticios, iv) existe una gran disponibilidad de herramientas genéticas para el mejoramiento de cepas, y v) la posibilidad de utilizar sustratos económicos para su crecimiento (Wisselink y col., 2002; Fontes y col., 2009; Monedero y col., 2010; Carvalheiro y col., 2011; Ortiz y col., 2012; Ortiz y col., 2013; Ortiz, 2014). Además, como las BL se utilizan en procesos de fermentación de alimentos, la posibilidad de producir polioles *in situ* puede ser útil en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales (Monedero y col., 2010).

Las BL homofermentativas carecen de la enzima MDH y utilizan la vía glicolítica para la fermentación de azúcares (Fig. 1) por lo que son incapaces de producir manitol naturalmente (Song y Vieille, 2009). La producción de manitol por estas especies de BL se ha logrado a través de diferentes estrategias de ingeniería metabólica (Akinterinwa y col., 2008; Song y Vieille, 2009; Monedero y col., 2010; Mozzi y col., 2013; Mazzoli y col., 2014)

Ciertas BL heterofermentativas pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Fructobacillus* y *Lactobacillus* son eficientes productoras de manitol cuando se dispone de D-fructosa en el medio. La producción de manitol por un proceso fermentativo tiene varias ventajas en comparación con la síntesis química, como la conversión completa de D-fructosa en D-manitol sin co-formación de sorbitol,

condiciones de producción suaves y ningún requisito de sustratos altamente purificados (Soetaert y col., 1995; von Weymarn y col., 2002).

Algunas BL heterofermentativas son microorganismos ideales para la producción de manitol ya que muestran un metabolismo fermentativo asociado con una importante modulación redox y una limitada capacidad biosintética. La producción de manitol por BL heterofermentativas se basa en su capacidad para usar D-fructosa como aceptor de electrones alternativo y convertirlo exclusivamente en D-manitol en una reacción enzimática de una etapa catalizada por la enzima MDH (Fig. 2). Además de la producción de lactato y etanol, se pueden regenerar equivalentes reductores de NAD(P)H procedentes del metabolismo del azúcar durante esta conversión (Monedero y col., 2010) proporcionando una ventaja para el crecimiento microbiano. Parte del acetil-fosfato formado puede canalizarse hacia la producción de acetato, vía acetato-quinasa, en lugar de etanol, con la ganancia extra de ATP y un mayor crecimiento celular. Algunos microorganismos sintetizan también manitol como un metabolito protector ante diversas situaciones de estrés osmótico y/u oxidativo, o para ser acumulado como fuente de carbono y energía (Wisselink y col., 2002; Song y Vieille, 2009).

Manitol 2-deshidrogenasa

La enzima manitol 2-deshidrogenasa o MDH (EC 1.1.1.67) pertenece a las enzimas de la clase oxidoreductasas que actúan con el grupo CH-OH como molécula donante. La MDH cataliza la oxidación de manitol o reducción de fructosa por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno (deshidrogenación) empleando NAD(P)/NAD(P)H como coenzima aceptora o donadora de electrones y protones. Las oxidoreductasas son miembros de la superfamilia de Reductasas/deshidrogenasas de cadena media (MDR= *Medium-chain alcohol/polyol Dehydrogenase/Reductase*) y familia de las deshidrogenasas dependientes de zinc. Esta familia incluye a las polioles deshidrogenasas, alcoholes deshidrogenasas, treonina deshidrogenasas, entre otras, provenientes de bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Hahn y col., 2003).

La primera MDH descrita en BL (Martinez y col., 1963) fue en *L. brevis*; luego se describieron en *Leu. mesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides*, *L. reuteri*, *L. intermedius* y *L. sanfranciscensis* (Aarnikunnas y col., 2002; Hahn y col., 2003; Korakli y Vogel, 2003; Saha, 2004; Sasaki y col., 2005). La secuencia aminoacídica de MDH en BL solo fue descrita en cepas de *Leu. mesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides*, *L. reuteri* y *L. brevis* (Aarnikunnas y col., 2002; Hahn y col., 2003; Liu y col., 2005; Sasaki y col., 2005).

Ingeniería metabólica de BL para la producción de manitol

En la última década, se implementaron distintas estrategias de ingeniería metabólica para mejorar la producción de manitol tanto por BL homo- como heterofermentativas (Tabla 1). Como es más común que las BL homofermentativas consuman manitol a que lo produzcan, se realizaron distintas modificaciones genéticas para aumentar su producción. En estos microorganismos, el manitol se produce a partir de fructosa 6-P que se convierte en manitol 1-P (Mtl1P) en una reacción dependiente de NADH catalizada por manitol 1-P deshidrogenasa (M1-PDH); Mtl1P se defosforila luego a manitol por acción de la enzima manitol 1-fosfatasa (Fig. 1). Una de las estrategias utilizadas fue generar cepas de *Lac. lactis* deficientes en actividad lactato deshidrogenasa (LDH), generando mutantes simples o dobles (Neves y col., 2000; Gaspar y col., 2011). Además, para evitar el consumo del manitol producido por la BL, Gaspar y col. (2004) eliminó los genes responsables del ingreso del manitol (*mtIF* o *mtIA*) en una cepa de *Lac. lactis* deficiente en LDH.

Otra estrategia utilizada fue clonar los genes manitol 1-P deshidrogenasa (*mtID*) y el gen heterólogo del parásito *Eimeria tenella* bajo un promotor fuerte inducible con nisina y expresarlo en *Lac. lactis*. Esta estrategia aumentó el rendimiento de producción de manitol 3-4 veces con respecto a la cepa salvaje.

Tabla 1. Cepas de BL modificadas genéticamente para mejorar la producción de manitol

Cepa	Modificación Genética	Genotipo	Rendimiento	Referencias
<i>Lac. lactis</i>	deficiente en LDH	Δdh	50 % ^a	Neves y col. (2000)
	deficientes en LDH y en el transporte de manitol	$\Delta dh \Delta mtIF$	33 % ^a	Gaspar y col. (2004)
	deficientes en LDH y expresión de manitol 1-fosfato deshidrogenasa (<i>L. plantarum</i>) bajo promotor inducible de nisina	$\Delta dh + PnisA::mtID$	25 % ^a	Wisselink y col. (2004)
	deficientes en LDH y expresión de manitol 1P-deshidrogenasa (<i>L. plantarum</i>) y manitol 1-fosfatasa (<i>Eimeria tenella</i>) bajo promotor inducible de nisina	$\Delta dh + PnisA::mtID::MTLP$	50 % ^a	Wisselink y col. (2005)
<i>L. fermentum</i>	doble mutante LDH, sin transporte de manitol y expresión del gen manitol 1P-deshidrogenasa (<i>Lac. lactis</i>) + manitol 1-fosfatasa (<i>Eimeria tenella</i>) bajo promotor inducible de nisina	$\Delta dh \Delta mtIF \Delta dhB + PnisA::mtID::MTLP$	42 % ^a	Gaspar y col. (2011)
<i>L. plantarum</i>	doble mutante LDH	$\Delta dhD \Delta dhL$	88 % ^b	Aarnikunnas y col. (2003)
<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	doble mutante LDH y expresión manitol 2-deshidrogenasa (<i>L. brevis</i>)	$\Delta dhD \Delta dhL + mtK$	8 % ^a	Liu y col. (2005)
	alterada la expresión de la enzima fructoquinasa	mutante <i>fruK</i>	86 % ^b	Helanto y col. (2005)

^a rendimiento de manitol a partir de glucosa

^b rendimiento de manitol a partir de fructosa

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, Wisselink y col. (2004) sobre-expresaron el gen que codifica para la manitol 1-P deshidrogenasa (*mtlD*) de *L. plantarum* en tres cepas de *Lac. lactis*: la cepa parental NZ9000 (tipo salvaje), una cepa deficiente en LDH (NZ9010) y la cepa HWA217, con actividad reducida de fosfofructoquinasa (PFK). La cepa NZ9000 (con *mtlD* sobre-expresada) fue incapaz de producir manitol mientras que se observó manitol en el sobrenadante de las otras dos cepas, siendo mayor en la cepa deficiente en LDH (0,011 mmol/mmol de glucosa consumida). Finalmente, Liu y col. (2005) expresaron el gen *mdh* de *L. brevis* en una cepa de *L. plantarum* deficiente en LDH y logró producir manitol con esta cepa.

A pesar de haberse mejorado la producción de manitol por BL homofermentativas a través de la ingeniería metabólica, los valores siguen siendo notablemente más bajos que los obtenidos con cepas de BL heterofermentativas. Algunas modificaciones realizadas en BL heterofermentativas fueron la interrupción de los genes D- y L-lactato deshidrogenasa en *L. fermentum* que llevó a la formación de manitol y piruvato en vez de lactato (Aarnikunnas y col., 2003). Con el fin de conseguir una cepa que convirtiera 100 % de fructosa en manitol, Helanto y col. (2005) obtuvieron una mutante aleatoria de *Leu. pseudomesenteroides* con actividad fructoquinasa reducida (conversión de fructosa en fructosa 6-P en la vía fosfoacetolasa) en la que la conversión de fructosa a manitol se mejoró de 74 a 86 mol %.

A pesar del potencial uso de BL heterofermentativas como una alternativa prometedora a la actual producción industrial de manitol, se necesita aún realizar estudios de ingeniería metabólica adicionales para optimizar los mecanismos de biosíntesis y mejorar su producción.

Previamente en nuestro grupo de trabajo, Rodríguez y col. (2012) estudiaron la producción de manitol por las cepas *L. reuteri* CRL 1101 y *L. mucosae* CRL 573 que habían sido previamente seleccionadas por su elevada producción de manitol luego de un muestreo de 65 cepas de BL heterofermentativas realizado en nuestro laboratorio. Ortiz (2014) en su trabajo de Tesis realizó la optimización de la producción de manitol por la cepa CRL 1101 en un medio minimizado conteniendo melaza como fuente de carbono. Ruiz Rodríguez y col. (2017) evaluaron la producción de manitol de

INTRODUCCIÓN

Fructobacillus tropaeoli CRL 2034, seleccionada en nuestro laboratorio por su elevada producción de manitol, utilizando el diseño central compuesto en un medio FYP con distintas concentraciones de azúcares.

Destacando la producción de manitol por parte de estas tres cepas de BL heterofermentativas y en base a lo expuesto anteriormente, en este trabajo de Tesis se realizaron estudios genéticos, microbiológicos y bioquímicos de la biosíntesis de manitol empleando estas tres cepas seleccionadas en nuestro laboratorio como buenas productoras de manitol: *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. tropaeoli* CRL 2034.

Los objetivos de este trabajo de Tesis fueron:

OBJETIVO GENERAL

Realizar estudios genéticos, microbiológicos y bioquímicos de la biosíntesis de manitol en bacterias lácticas heterofermentativas para su producción como nutracéutico.

Objetivos específicos

1. Identificar y estudiar los genes implicados en la producción de manitol en BL heterofermentativas y determinar su organización genética. Realizar estudios *in silico* y de modificación génica.
 - i. Caracterizar los genes manitol deshidrogenasa (*mdh*) en cepas de BL seleccionadas.
 - ii. Estudiar el contexto genómico de los genes *mdh* identificados.
 - iii. Realizar estudios *in silico* y filogenéticos de las proteínas manitol deshidrogenasa (MDH) de las cepas en estudio.
 - iv. Modificar genéticamente las cepas usando como blanco genes relacionados a la biosíntesis de manitol y al balance redox.

2. Evaluar el comportamiento microbiológico y enzimático relacionado con la producción de manitol por las cepas diseñadas.
 - i. Realizar estudios cinéticos del crecimiento y productos de fermentación de las cepas parental y mutantes obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo.
 - ii. Evaluar la actividad de las enzimas manitol- y lactato-deshidrogenasa (MDH y LDH) de las cepas en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas en estudio

Origen de las bacterias usadas en esta Tesis

En este trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron las cepas *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. tropaeoli* CRL 2034, pertenecientes a la Colección de Cultivo del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), San Miguel de Tucumán, Argentina. Las cepas CRL 1101 y CRL 573 se seleccionaron por su excelente producción de manitol a partir de un muestreo realizado en nuestro laboratorio con 65 cepas de BL heterofermentativas. *F. tropaeoli* CRL 2034 se seleccionó por su elevada producción de manitol luego de un muestreo de BL aisladas de diferentes frutas tropicales.

Por su lado, la cepa *L. reuteri* CRL 1101 fue aislada de intestino humano; *L. mucosae* CRL 573 de muestras de heces de niños de Tucumán, y *F. tropaeoli* CRL 2034 de higo. La cepa CRL 573 se identificó originalmente como *L. fermentum* y se reclasificó como *L. mucosae* luego de la secuenciación de su gen 16S rRNA (número de acceso GenBank LX03_06360). Los genomas de las cepas CRL 573 y CRL 2034 (número de acceso GenBank de su secuencia 16S rDNA: KY859794) se secuenciaron en los años 2013 y 2015, respectivamente, aunque el análisis de los mismos no forma parte del presente estudio. Se utilizó además la cepa *Escherichia coli* DH10B [F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 endA1 recA1 deoR Δ (ara,leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ -] (Durfee y col., 2008; LPSN, 2017) para la construcción y amplificación de los distintos plásmidos recombinantes.

Conservación de células

Bacterias lácticas

Para preparar un stock de las cepas de BL que se estudiaron en esta Tesis, se inocularon 50 mL del medio correspondiente con 0,5 mL de células de un cultivo *overnight* y se incubaron aproximadamente 16 h hasta fase estacionaria. El cultivo se centrifugó a 10.000 $\times g$, 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 20 mL de medio crioprotector [Leche -Extracto de Levadura (LEL) + glicerol 10 %, v/v] en viales estériles (1 mL) que se conservaron a -20 o -80 °C hasta

su uso.

Escherichia coli

Se centrifugaron 3 mL de un cultivo *overnight* usando tubos Eppendorf o crioviales estériles de 1,5 mL durante 3 min a 800 *xg*. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1,5 mL de caldo LB con glicerol (15 %, v/v) estéril. Se homogeneizó bien y se guardó en freezer a -20 o -70 °C, hasta su uso.

Medios de Cultivo

Man, Rogosa y Sharpe – MRS

Se utilizó este medio para la activación y propagación de las cepas *L. reuteri* CRL 1101 y *L. mucosae* CRL 573:

Glucosa: 20 g/L

Peptona de carne: 10 g/L

Extracto de carne: 10 g/L

K₂HPO₄: 2 g/L

Acetato de sodio: 5 g/L

Citrato triamónico: 2 g/L

MgSO₄.7H₂O: 0,2 g/L

MnSO₄.4H₂O: 0,05 g/L

Tween 80: 1 g/L

MRS-Fru

Para la activación y propagación de *F. tropaeoli* CRL 2034 se le adiciona al medio MRS 20 g/L de Fructosa además de la glucosa que posee.

Luria Bertani - LB

Para propagación de *E. coli* DH10B

Triptona: 10 g/L

NaCl: 10 g/L

Extracto de levadura: 5 g/L

Medio Protector LEL-Glicerol

Leche: 10 g/L
Glucosa: 1 g/L
Extracto de Levadura: 0,5 g/L
Glicerol: 10 % (v/v)

Medio FYP

Para la producción de manitol por *F. tropaeoli* CRL 2034.

Fructosa: 40 g/L
Glucosa: 20 g/L
Extracto de levadura: 10 g/L
Peptona de carne: 5 g/L
Acetato de sodio: 2 g/L
MgSO₄.7H₂O: 0,2 g/L
MnSO₄.4H₂O: 0,01 g/L
FeSO₄: 0,01 g/L
NaCl: 0,01 g/L
Tween 80: 0,5 g/L

Medios agarizados: se agregó agarosa al 1,2 % (p/v) a los medios líquidos arriba mencionados.

Todos los medios se esterilizaron a 121 °C, 1 atmósfera, durante 20 min. El medio LEL-glicerol se esterilizó a 115 °C (0,6-0,7 atm de P) durante 20 min.

Cuando fue necesario, se utilizaron antibióticos en las siguientes concentraciones: para *E. coli*: ampicilina 100 µg/mL o eritromicina 250 µg/mL. Para *L. reuteri* CRL 1101: eritromicina 5 µg/mL, rifampicina 25 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, o cloranfenicol 5 µg/mL. Para *F. tropaeoli* CRL 2034: eritromicina 5 µg/mL.

Condiciones de cultivo

Las cepas de *L. reuteri* CRL 1101 y *L. mucosae* CRL 573 se activaron en caldo MRS a 37 °C; *F. tropaeoli* CRL 2034 se activó en MRS-Fru a 30 °C; luego se realizaron dos pases sucesivos y se incubaron a la misma temperatura de activación (sin agitación) durante 16-18 h. El medio utilizado en los pases sucesivos dependió del ensayo a realizar.

Las cepas de *E. coli* se activaron en medio LB (con antibiótico cuando fue necesario) a 37 °C con agitación a 180 r.p.m. Luego, se realizaron dos pases sucesivos y se incubaron a la misma temperatura durante 16-18 h.

Parámetros de crecimiento

Crecimiento celular

Se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) con un espectrofotómetro (Biotraza, modelo 722, China) y el recuento de células viables (unidades formadoras de colonias por mL: UFC/mL) se realizó mediante la siembra en MRS-Fru agar, o en el medio correspondiente usando diluciones seriadas en solución fisiológica (NaCl 0,85%, p/v) de las muestras. La velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max} , h^{-1}) se calculó mediante la aplicación de la siguiente ecuación durante la fase celular de crecimiento exponencial:

$$\mu_{max} = [\ln (UFC_{t2}/mL_{t2} / UFC_{t1}/mL_{t1})] / (t2 - t1)$$

Determinación del pH

Las determinaciones de pH se realizaron empleando un pHmetro con electrodo de penetración PT-10 (Sartorius, Gotinga, Alemania) y un pHmetro Adwa modelo AD1040 (Adwa Instruments, Inc., Szeged, Hungría). La velocidad máxima de acidificación se calculó como la pendiente de la curva donde el descenso de pH es lineal y máximo:

$pH/t = (pH_{t2}-pH_{t1})/(t2-t1)$ donde $t1$ =comienzo del descenso de pH lineal y máximo y $t2$ = cuando finaliza el descenso de pH lineal y máximo.

Microscopía electrónica de transmisión

Se realizó microscopía electrónica de transmisión de cultivos celulares de las cepas bajo estudio utilizando el servicio brindado por el Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME) – CONICET-CCT-Tucumán. Se usó un microscopio Zeiss (Jena, Alemania) modelo EM-109.

Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Plásmidos utilizados

Plásmidos	Características	Referencia
pBluelueScript II SK (+)	Vector pBS, AmpR	Stratagene
p3B1	Derivado de pBS con RepB de pRC18, AmpR, CmR	Halász (2009)
pJP042	Vector de expresión de RecT, EmR	Duwat y col. (2001)
pRV300	Derivado de pBS con <i>ermAM</i> , AmpR, EryR	Mayo y col. (2010)
p:: <i>ldhCRL1101</i>	pRV300 + fragmento interno de <i>ldh</i> de CRL 1101	Este trabajo
p:: <i>mdh</i>	pRV300 + fragmento interno de <i>mdh</i> de CRL 2034	Este trabajo
p:: <i>per</i>	pRV300 + fragmento interno de <i>per</i> de CRL 2034	Este trabajo
p:: <i>ldh1</i>	pRV300 + fragmento interno de <i>ldh1</i> de CRL 2034	Este trabajo
p:: <i>ldh2</i>	pRV300 + fragmento interno de <i>ldh2</i> de CRL 2034	Este trabajo
p:: <i>ldh3</i>	pRV300 + fragmento interno de <i>ldh3</i> de CRL 2034	Este trabajo

Técnicas generales de biología molecular

Extracción de ADN cromosómico de BL

Se utilizó la técnica descrita por Wisselink y col. (2002) modificada. Se aisló ADN cromosómico a partir de 3 mL de un cultivo en fase logarítmica. Las células se cosecharon por centrifugación (8.000 $\times g$ 10 min) y se resuspendieron en 400 μ L de buffer SET (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) conteniendo 15 mg/mL de lisozima y se incubó a 37 °C 90 min. Se agregó 40 μ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 % (p/v) y 5 μ L de proteinasa K (15 μ g/mL) y se incubó a 55 °C durante 2 h mezclando periódicamente por inversión. A continuación, se agregó 170 μ L de NaCl 5 M y 1 volumen (620 μ L) de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) manteniendo a temperatura ambiente durante 30 min y mezclando frecuentemente por inversión.

Se centrifugó la muestra (10.000 $\times g$ 10 min) y se recuperó el ADN mediante precipitación de la fase acuosa (fase superior) con 1 vol. de isopropanol (o 2,5 vol. de etanol absoluto) e invirtiendo suavemente hasta obtener el filamento de ADN. Este se centrifugó (10.000 $\times g$ 10 min) y el precipitado se lavó con etanol 70 % (v/v); se dejó evaporar y resuspendió en 50 μL de buffer TE o agua ultrapura Milli-Q esterilizada. Finalmente se agregó solución de RNasa (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para eliminar restos de ARN y se incubó durante a 37 °C durante 30 min.

Extracción de ADN plásmidico de *Escherichia coli*

Se utilizó la técnica descrita por Hammes y Vogel (1995) modificada para un volumen de 3 mL. Primero, se transfirió una colonia de *E. coli* a 3 mL de medio LB conteniendo el antibiótico apropiado. Se incubó el cultivo a 37 °C durante 16 h con agitación vigorosa y se centrifugó 2 min a 15.600 $\times g$ eliminando el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 μL de solución TEG (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, Glucosa 50 mM) y se les agregó 200 μL de la solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1 %, p/v). Se mezcló invirtiendo el tubo cinco veces. Se añadió 150 μL de acetato de potasio 3 M, pH 4,8, inmediatamente se mezcló y se incubó 3-5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 10 min a 15.600 $\times g$, se transfirió el sobrenadante (sin arrastrar restos celulares) a un nuevo tubo y se precipitó con 1 vol. de alcohol isopropílico a temperatura ambiente durante 20 min (o con 2,5 volúmenes de etanol absoluto 2 h a -20 °C). Luego, se centrifugó durante 10 min a 15.600 $\times g$ y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 500 μL de etanol 70 % (v/v), se centrifugó 3 min a 15.600 $\times g$ eliminando el sobrenadante. Se dejó evaporar todo el alcohol y finalmente se resuspendió el precipitado en 20-50 μL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) o en H₂O esteril. Cuando fue necesario, los plásmidos se trataron con 1 μL RNasa (stock 10 mg/mL) libre de DNasa, incubando a 37 °C por 30 min.

Extracción de ADN plasmídico de BL

Para extraer el plásmido de una BL se utilizó la técnica descrita por Zaunmüller y col. (2006) y Pessione (2012). Primero, se transfirió una colonia a 5 mL de medio MRS

MATERIALES Y MÉTODOS

conteniendo el antibiótico apropiado. Se incubó el cultivo durante 16 h a la temperatura correspondiente y se centrifugó 2 min a 15.600 xg . Las células se lavaron con 500 mL de buffer TES (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, Sacarosa 6,7 %, p/v), luego se centrifugaron 5 min a 15.600 xg , se eliminó el sobrenadante y resuspendió en 380 μ L del mismo buffer. Se agregó 97 μ L de una solución de lisozima 10 mg/mL en buffer Tris 25 mM pH 8 y se incubó a 37 °C durante 2 h. Luego se agregó 48 μ L de la solución 1 (EDTA 250 mM pH 8 – Tris-HCl 50 mM pH 8). Se centrifugó 2 min a 15.600 xg y se resuspendió el *pellet* en 20 μ L de TES y luego en 30 μ L de la solución de lisis (SDS 20 %, p/v, Tris-HCl 50 mM pH 8 – EDTA 20 mM pH 8). Se mezcló inmediatamente e incubó 5-10 min a 37 °C para completar la lisis. Se agregó 500 μ L de buffer TES (sin lisozima) y 30 μ L de NaOH 3 N y se incubó en hielo durante 15 min. Se agregó 50 μ L de buffer Tris-HCl 2 M pH 7, se mezcló por inversión durante 3 min. Se agregó 72 μ L de NaCl 5 M y luego 700 μ L de fenol saturado en 3 % (p/v) de NaCl. Se mezcló por inversión vigorosamente y luego se centrifugó 10 min a 16.500 xg . Se separó la fase superior y se le agregó 1 vol. de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se volvió a mezclar vigorosamente por inversión y se centrifugó 10 min a 16.500 xg . Se separó la fase superior y se precipitó el plásmido con un vol. de alcohol isopropílico manteniendo el tubo a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó 10 min a 15.600 xg , se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con etanol 70 % (v/v). Se centrifugó 10 min a 15.600 xg , se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol. Finalmente, se resuspendió el plásmido en 20 μ L de H₂O esteril. Cuando fue necesario se trató con RNAsa (50 μ g/mL concentración final) incubando a 37 °C durante 30 min.

PCR convencional

Las reacciones de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) se llevaron a cabo en un termocilador MyCyclerTM *Thermal Cycler System with Gradient Option* (Bio-Rad Laboratories Inc., EE.UU.). Cada reacción contenía: 2,5 μ L de buffer 5X; 0,75 μ L de MgCl₂ 25 mM; 1,25 μ L de cada cebador o *primer* 10 μ M; 0,25 μ L de desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) 5 mM; 0,1 μ L de ADN polimerasa GoTaq (5 U/ μ L) (Promega Co.,

EE.UU.); 0,5 µL de muestra (con alrededor de 0,5 pg de ADN, ARN o ADNc) y 5,9 µL de agua ultrapura Milli-Q para obtener un vol. final de 12,5 µL. Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes: 5 min a 94 °C; 25 ciclos de: 1 min a 94 °C, 1 min a la temperatura de *annealing* de los cebadores y tiempo variable para la extensión (30 segundos para fragmentos menores a 500 pb; 1 min para fragmentos menores a 1 kb y > 500 pb) a 72 °C; seguido de una extensión final de 5 min a 72 °C.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos amplificados y los plásmidos utilizados se visualizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (90 V, 30-40 min). Junto con las muestras se sembró en cada gel un marcador de peso molecular de 1 Kb o 100 pb (InvitrogenTM, Life Technologies Co.) para geles con 0,8 o al 1,0 % (p/v) de agarosa, respectivamente, según el tamaño esperado de los fragmentos a separar utilizándose mayor concentración para separar fragmentos más pequeños. Para la tinción de las bandas se utilizó el colorante fluorescente GelRedTM (Biotium Inc.; Hayward, CA, EE.UU) (dilución 1/10.000).

Purificación de productos de PCR por precipitación con polietilenglicol (PEG)

Los amplicones se purificaron mediante precipitación con polietilenglicol (PM 3000) (protocolo disponible en <http://labs.mcdb.lsa.umich.edu/labs/olsen/files/PCR.pdf>). Brevemente, partiendo de reacciones de PCR de 50 µL, se sembró 5 µL en un gel de agarosa 0,8 o al 1,0 % (p/v) para verificar la amplificación. Al resto de la reacción de PCR se agregó 50 µL de una solución de 20 % PEG–NaCl 2,5 M, teniendo la precaución de mezclar bien y se incubó a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente descartándose el sobrenadante con una pipeta. Se agregaron 125 µL de etanol 70 % (v/v), se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante, eliminando la mayor cantidad posible del etanol. Se secó el *pellet* durante 10-15 min a 37 °C, y finalmente se resuspendió completamente en 20 µL de agua miliQ.

Secuenciación de los amplicones de ADN

Los amplicones de los genes ARN 16S y de las secuencias necesarias para comprobar las mutaciones fueron secuenciadas en las instalaciones de CERELA-CONICET usando el Servicio de Secuenciación disponible con un secuenciador de ADN ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster, CA, EE.UU.).

Cebadores utilizados

Los cebadores o *primers* utilizados en este trabajo de Tesis están descriptos en la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados en este trabajo de Tesis

Secuencia a amplificar	Nombre	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Enzima *	Tamaño (pb)
<i>L. reuteri</i> CRL 1101					
<i>mdh-reg</i>	Jf	CTCAGTTCCCGCCAAACTGGTAA	69,9		3346
	Jr	AGCAGCTCCGATAACTTCAGCGAT	69,8		
<i>mdh</i>	Jb-mdh-F	GGCGATTCCCGCTTGCTTTACAAT	72,8		2398
	Jf	CTCAGTTCCCGCCAAACTGGTAA	69,9		
Para la técnica de <i>recombineering</i>					
oJP577		TCAAACCACCAGGACCAAGCGCTGAAAGACGACGCTTTCTGCTTAATTCACCTAATGGGTTGGTTTGACCATGAACTGG			
oMDH		TCTGAACCACTTTTGTAACCTACACCTGAGTTTTCGTGTTACTAAACAATAGGAGGAACAGCTGATGCAGATCCAGGAAGA			
<i>mdh</i> mutada	MDHm-f'	AACTACACCTGAGTTTTCGTGTTACTA	62		1191
	Jb-mdh-F	CTA			
Mutantes Simple Recombinación					
<i>Ldh</i>	Ldh1	AGATAAGCTTTTAAATTGGTGATGAGTTGTGG	77,5	<i>HindIII</i>	426
	Ldh2	ATCTGGAATTCCTCCGATAACTTTATGTGCTGGAAAG	67,6	<i>EcoRI</i>	
<i>F. trofaeoli</i> CRL 2034					
<i>mdh_per</i>	Mdh4	TCCCCCGGGAAACGTTTTCTTTGC	76	<i>SmaI</i>	2010
	Mdh2	CCGGAATTC AAGTCGGTTGTT	69,8	<i>EcoRI</i>	
<i>Mdh</i>	Mdh1	TGGGATATCTTTCTTTTGCTCA	62,4	<i>EcoRV</i>	1229
	Mdh 3	CCGGAATTCGTC AAGAAATTG	68,2	<i>EcoRI</i>	
	JB SmaI	GCGA CCGGGTGGGAAACGTTTTCTTTGCTCA	67	<i>SmaI</i>	
	JB EcoRI	GCACGAATTC TGGGAAACGTTTTCTTTGCTCA	61,8	<i>EcoRI</i>	

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuencia a amplificar	Nombre	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Enzima *	Tamaño (pb)
Mutantes Simple Recombinación					
<i>Mdh</i>	Frumdh f	AGATAAGCTTACATTGAAGCCTGACGAAGT	69	<i>HindIII</i>	456
	Frumdh r	ATCTGGAATTCCTCCGTCACCGATAACCAAAG	74,7	<i>EcoRI</i>	
<i>Per</i>	dPer 1	AGATAAGCTTACTCAATGGGTAACGTGCTAA	68,4	<i>HindIII</i>	430
	dPer 2	ATCTGGAATTCATCAGCAGGGTGCAAA	75,5	<i>EcoRI</i>	
<i>ldh1</i>	Ldh-1-Ft	AGATAAGCTTCCAGCTTTGGAAGATTGGGA	73,3	<i>HindIII</i>	464
	Ldh-2-Ft	ATCTGGAATTCGATTGCCTTACGACCGATGTTA	76,3	<i>EcoRI</i>	
<i>ldh2</i>	Ldh-3-Ft	AGATAAGCTTGTATGACGAAGTACCAGCTTTGA	71,7	<i>HindIII</i>	466
	Ldh-2-Ft	ATCTGGAATTCGATTGCCTTACGACCGATGTTA	76,3	<i>EcoRI</i>	
<i>ldh3</i>	Ldh-4-Ft	AGATAAGCTTCGACCGACAATAGCAGGATAAG	71,7	<i>HindIII</i>	448
	Ldh-5-Ft	ATCTGGAATTCCTGTCTATCAGGCAGAAACTGG	74,8	<i>EcoRI</i>	
Para comprobar mutantes					
<i>Mdh</i>	Mdh1	TGGGATATCTTTTCTTTGCTCA	62,4	<i>EcoRV</i>	774
	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	56,7		
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	50,9		
	Mdh 3	CCGGAATTCGTCGAAGAAATTG	68,2	<i>EcoRI</i>	
<i>Per</i>	Mdh2	CCGGAATTCGAAGTCGGTTGTT	69,8	<i>EcoRI</i>	809
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	50,9		
	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	56,7		
	Per F	GTGGTGAAGAGGCCTAAAT	58,2		
<i>ldh1 y 2</i>	Ldh10	GTTGCCAGCTACTCTTCTT	60,1		3042
	Ldh11	TTTCTCCGCTTCACATCTT	63,6		
Em pRV300	Em-f	ACTTTGGCGTGTTCATTGC	64,9		623
	Em-r	ACGAGTGAAAAAGTACTCAACCA	61,5		

* Enzima de restricción incorporada al cebador

Resaltado en amarillo: secuencia modificada

Subrayado: sitios de corte.

Digestión con Enzimas de Restricción

Los cortes con las enzimas de restricción se realizaron utilizando la mezcla de trabajo descrita en la Tabla 4.

Tabla 4. Esquema de digestión con enzimas de restricción

Componente	Cantidad	Concentración final
Agua destilada	c.s.p. 20 μ L	
Buffer de la enzima (10 X)	2 mL	1X
ADN	c.s.p. 2 mg	0.2 mg/ μ L
Albúmina sérica bovina (BSA)*	2 μ L	1X
Enzima de restricción (10 U**/ μ l)	0,5-1 μ L	0,5-1 U**/ μ L

*cuando sea necesario

Vf= 20 μ L

**U (unidad): se define como la cantidad de enzima requerida para digerir 1 μ g de ADN en 1 h a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 μ L

Se incubó la mezcla de reacción a la temperatura correspondiente a la enzima durante aproximadamente 2 h.

Reacción de Ligado

En la Tabla 5 se describe la mezcla de trabajo utilizada en la reacción de ligado.

Tabla 5. Esquema de trabajo para la reacción de ligado

Componente	Cantidad	Concentración final
Agua destilada	c.s.p. 20 μ l	
Buffer 10 X	2 μ L	1 X
Vector		200 ng
Inserto		40 ng
T4 DNA ligasa		0,2-2 U

Vf: 20 μ L

La mezcla de reacción de ligado se incubó durante 16 h a 15 °C.

Análisis Bioinformáticos

Se utilizó el programa BLAST provisto por el servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para comparar las secuencias con la base de datos disponibles del *GenBank*. Se realizó la comparación de los contextos genómicos de las *mdh* descritas utilizando el programa *SEED Viewer* versión 2.0 (Overbeek y col., 2005). Para la búsqueda de marcos de lectura abiertos se utilizó la herramienta del NCBI ***Open Reading Frame Finder (ORF finder)*** y para su anotación la herramienta RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz

MATERIALES Y MÉTODOS

y col., 2008). La búsqueda de promotores se realizó con el programa *Promoter Prediction by Neutral Network* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). La búsqueda de terminadores se realizó con la herramienta RibEx (Zaunmüller y col., 2006; Årsköld y col., 2008) y el programa DNAMAN. Para el alineamiento de secuencias se utilizó la herramienta CLUSTAL Omega de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). La búsqueda de dominios conservados se realizó utilizando la herramienta *Search Sequences for SCOP domains* del servidor *Superfamily 1.75* (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/hmm.html>). Se utilizó la herramienta InterPro de EMBL-EBI para realizar un análisis funcional de las proteínas (clasificación en familias y predicción de dominios). Se utilizó la herramienta PSIPRED de *UCL-CS Bioinformatics* (von Weymarn, 2002) para predecir las estructuras secundarias y la herramienta TMHMM Server v. 2.0 para predecir helices transmembranas. Para la búsqueda de sitios de corte se utilizó el programa NEBcutter (Leroy y De Vuyst, 2004; Hugenholtz, 2008; Gaspar y col., 2013) y para graficar los plásmidos se utilizó el programa Unipro UGENE v1.22.0.

El árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas de las proteínas MDH de las cepas CRL 1101, CRL 573 y CRL 2034 se realizó con las secuencias MDH de referencia en la bibliografía y las deducidas de la bibliografía y con aquellas cuyo BlastP resultó en un alineamiento mayor a 80 % y una cobertura mayor igual al 90 %. La alineación se realizó con el programa Clustal W (Larkin et al. 2007); luego el árbol, se construyó utilizando el método de vecinos más cercanos en MEGA7 (Kumar y col., 2016). Todas las secuencias utilizadas se describen en la Tabla 11 del Anexo.

Células competentes de *Escherichia coli* DH10B

Para generar células competentes de *E. coli* DH10B se utilizó el método descrito por Sambrook y col. (1989) modificado. Se inoculó la cepa en fase estacionaria al 1 % (v/v) en 40 mL de caldo LB. Se incubó en agitación a 37 °C hasta llegar a una DO_{600nm} de 0,1 – 0,2 (a partir de esta etapa, se trabajó en hielo y con soluciones frías; 4 °C). Se cosechó el cultivo en mamaderas estériles frías centrifugando 10 min a 2.500 xg a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se el *pellet* resuspendió en 5 mL de $CaCl_2$ 0,1 M y se dejó

MATERIALES Y MÉTODOS

en hielo durante 20 min. Luego, se centrifugó a 2.500 xg , a 4 °C por 10 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0,5 mL de una solución de CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, glicerol 15 % (v/v) y se alicuotó en 50 µL en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Las células se transformaron inmediatamente o se conservaron en un freezer - 70 °C para su posterior uso.

Transformación

Se agregó ADN (1-2 µg usando vol de 1 a 5 µL) a 50 µL de células competentes mantenidas en hielo y se incubó en hielo entre 15-30 min. Luego se realizó un *shock* térmico incubando a 37 °C durante 5 min ó a 42 °C 2 min. Se volvió a incubar 5 min en hielo. Las células se resuspendieron en 0,8 mL de caldo LB y se incubaron a 37 °C en agitación durante 45 min. Luego, se sembraron en placas de LB agar conteniendo el antibiótico adecuado y de forma directa, usando dilución 10⁻¹ y “concentrada” (células centrifugadas y recuperadas en un volumen de 100-200 uL de medio). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Células electro-competentes de *L. reuteri* CRL 1101 y *F. tropaeoli* CRL 2034

Para la optimización del protocolo de transformación se utilizaron los protocolos descritos Wei y col. (1995), Ausbel F (1999), Turner y col. (1999), Mason y col. (2005), y el de Stephenson y col. (2011) para generar células electro-competentes. Finalmente, el protocolo utilizado fue el descrito por Wei y col. (1995) modificado de la siguiente manera: 50 mL de caldo MRS (adicionado con fructosa 2 % para la cepa CRL 2034) se inocularon con 0,5 mL de células de un cultivo *overnight* (DO_{600nm} 2,5-3) a 37 °C para la cepa CRL 1101 o 30 °C para CRL 2034. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,2-0,3, se agregó penicilina (concentración final= 0,7 µg/mL para CRL 1101 y 2,4 µg/mL para CRL 2034) y se continuó la incubación hasta una DO_{600nm} = 0,4-0,5. Los cultivos se cosecharon en mamaderas estériles frías (a partir de este punto, se trabajó manteniendo siempre temperaturas bajas) centrifugando a 2.400 xg , 4 °C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con solución estéril de sacarosa 0,5 M y glicerol 10 % (v/v). Finalmente, se descartó el

sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 μ L de solución sacarosa 0,5 M/glicerol 10 % (v/v) y se fraccionaron en 50 μ L en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Las células se electroporaron inmediatamente o bien se conservaron a -70 °C para su posterior uso.

Electroporación

Se agregó 1-2 μ g de ADN (1 a 5 μ L) a 50 μ L de células electro-competentes mantenidas en hielo y se incubó la mezcla durante 5-10 min. La mezcla de células electro-competentes con el ADN se transfirió a una cubeta de electroporación previamente enfriada. Las condiciones optimizadas de electroporación fueron: 1.8 kV; 600 Ω y 25 μ F para la cepa *L. reuteri* CRL 1101 y 1,7 kV; 200 Ω y 25 μ F para *F. tropaeoli* CRL 2034 con el electroporador Bio-Rad Gene Pulser & Pulse Control (California, EE.UU.). Una vez que las células fueron electroporadas, se agregó inmediatamente 700 μ L de MRS (con fructosa 2 % y $MgCl_2$ 80 mM para *F. tropaeoli* CRL 2034) y se incubaron a 37 (CRL 1101) o 30 °C (CRL 2034) sin agitación durante 2 h. Las células se sembraron en placas de MRS o MRS–Fru agar conteniendo el antibiótico adecuado de forma directa (células sin diluir), dilución 10^{-1} y “concentrado” (células centrifugadas y recuperadas en un vol. de 100-200 μ L de medio). Las placas se incubaron a 37 (CRL 1101) o 30 °C (CRL 2034) durante 48 h.

Construcción de vectores

Para la construcción de los vectores utilizados para generar mutaciones por simple recombinación se usó el vector no replicativo en Gram positivas pRV300 de la siguiente manera. Se amplificó un fragmento interno del gen a mutar (400-500 pb), se purificó y cortó con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (los *primers* utilizados se detallan en la Tabla 3). Se cortó el plásmido pRV300 con las mismas enzimas y se purificó. Se realizó la reacción de ligado con una relación 1:3 (plásmido:inserto) incubándose a 15 °C durante 16 h. Se utilizó 5 μ L de la reacción de ligado para transformar células de *E. coli* DH10B y recuperar el vector. Se comprobó la presencia de plásmido

recombinates mediante reacciones de PCR o con cortes con enzimas de restricción correspondientes.

Actividades enzimáticas de Manitol 2-deshidrogenasa (MDH) y Lactato deshidrogenasa (LDH)

Obtención de extractos proteicos intracelulares

Se prepararon extractos proteicos intracelulares a partir de 5 mL de cultivos activos de la BL bajo estudio con diferentes tiempos de incubación de acuerdo a los requerimientos del ensayo. Las células se cosecharon por centrifugación (8.000 xg 4 °C 10 min) y se lavaron tres veces con buffer fosfato de potasio 50 mM frío pH 5,5. Los *pellets* húmedos se mezclaron con perlas de vidrio (150-212 μm diámetro, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.) y se resuspendieron en el mismo buffer en una relación 1:2:1 (células:buffer:perlas; p/v/p). Luego, las células se rompieron usando un disruptor celular Mini-BeadBeater-8 (Biospec Products Inc.; Bartlesville, OK, EE.UU.) a velocidad máxima con 5 ciclos de 2 min cada uno, con intervalos en hielo de 2 min. Para eliminar los restos celulares y las perlas de vidrio, las muestras se centrifugaron (14.500 xg 4 °C 5 min) y los extractos proteicos intracelulares (sobrenadantes) obtenidos se utilizaron inmediatamente para los ensayos enzimáticos.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos intracelulares se midió utilizando el reactivo de Bradford concentrado comercial (Bio-Rad Laboratories Inc., EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina sérica bovina como estándar (0,05-0,50 mg/mL). Los extractos se diluyeron para obtener una concentración de proteínas de 0,25 mg prot/mL.

Determinación de la actividad específica de la enzima MDH

La actividad MDH se determinó de acuerdo al método de Sasaki y col. (2005) modificado por Ortiz y col. (2012), según se detalla a continuación. La actividad MDH

se midió espectrofotométricamente en un lector de microplacas Synergy™ HT (BioTek® Instruments, Inc. Vermont, EE.UU.). La desaparición de NADPH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.) se siguió midiendo la absorbancia a 340 nm (ϵ_{340} : 6220/M cm) cada 30 s durante 5 min. Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en un volumen final de 200 μ L, conteniendo 50 μ L de buffer fosfato de potasio 200 mM (pH 5,5), 50 μ L de NADPH 2 mM, 50 μ L de agua ultrapura Milli-Q y 10 μ L del extracto intracelular diluido. Las reacciones se iniciaron con el agregado de 40 μ L de fructosa 1 M (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.) incubándose a 37 °C (cepa CRL 1101) o 30 °C (cepa CRL 2034) durante 2 min. Como controles negativos se utilizaron blancos de sustrato y de enzima, donde se agregó agua ultrapura Milli-Q en lugar de sustrato o extracto proteico intracelular, respectivamente. Se definió como una unidad (U) de actividad MDH a la cantidad de enzima requerida para catalizar la desaparición de 1 μ mol de NADPH por min (reacción en sentido de reducción de fructosa) bajo las condiciones experimentales utilizadas. En todos los casos se informó actividad MDH específica, que se expresó como unidades por miligramos de proteínas (U/mg prot). Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por duplicado a partir de al menos dos experimentos independientes.

Determinación de la actividad específica de la enzima LDH

La actividad LDH se midió utilizando el kit LDH-P UV unitest (Wiener lab., Rosario, Argentina) con modificaciones para realizar determinaciones usando un menor volumen (microplaca). Se utilizaron 200 μ L del reactivo A reconstituido (provisto por el kit) más 10 μ L del extracto proteico intracelular de la cepa en estudio con una concentración de proteína de 0,25 mg/mL. La actividad LDH se midió espectrofotométricamente en el lector de microplacas Synergy™ HT (BioTek® Instruments, Inc. Vermont, EE.UU.). La desaparición de NADPH (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.) se siguió midiendo la absorbancia a 340 nm (ϵ_{340} : 6220/M cm) cada 30 segundos durante 3 min a 30 °C. Se realizaron los mismos controles negativos que para la determinación de actividad MDH. Para el cálculo de actividad LDH se tuvo en cuenta los mg de proteína utilizados y el factor de cálculo determinado por el kit. En todos los

casos se informó actividad LDH específica que se expresó como unidades por miligramos de proteínas (U/mg prot). Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por duplicado a partir de al menos dos experimentos independientes.

Determinación de azúcares y manitol por HPLC

Desproteización de muestras para determinación de azúcares

Los sobrenadantes de cultivos fermentados se centrifugaron (8.000 $\times g$ 4 °C 10 min) y se desproteizaron utilizando la técnica modificada de Leloup y col. (1997) de la siguiente manera: a 600 μL de sobrenadante libre de células se añadieron 50 μL de Reactivo de Carrez A ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ 3,6%, p/v), 50 μL de Reactivo de Carrez B ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 7,2%), 100 μL de NaOH 0,1 M y 200 μL de agua ultrapura Milli-Q (1 mL vol. final) y se mezcló en agitador Vórtex a temperatura ambiente durante 1 min. Luego, las muestras se centrifugaron (a 14.500 $\times g$ 4 °C 5 min) y se reservaron los sobrenadantes a los que se les agregó 50 mg de resina básica (Amberlite IR 120, Laboratory Reagents) y 50 mg de resina ácida (Amberlite IR 45, Laboratory Reagents) mezclando con agitador Vórtex. Las muestras se centrifugaron (14.500 $\times g$ 4 °C 5 min) y se diluyeron los sobrenadantes hasta tener una concentración de azúcares totales menor a 10 g/L (límite de detección de la columna) y se mantuvieron a -20 °C hasta el momento del análisis.

Determinación de azúcares residuales, manitol, ácidos orgánicos y etanol

Las concentraciones de manitol, azúcares residuales (glucosa, fructosa y sacarosa), ácidos orgánicos y etanol se determinaron por HPLC utilizando un equipo Smartline Pump 100 (Knauer GmbH; Berlín, Alemania) con detector de índice de refracción WellChrom K-2301, acoplado a un inyector automático Smartline 3800 Plus y un calefactor para columnas ZC90 (Zeltec, Buenos Aires, Argentina). Las muestras se filtraron (filtros de 0,2 μm de poro y 28 mm de diámetro, Sartorius AG, Alemania) y se inyectaron (20 μL) en el equipo. Los azúcares y el manitol se analizaron en una columna SUGAR-PAK I COLUMN (Waters, Waters Corporation; Milford, EE.UU.) a 85 °C

utilizando agua ultrapura Milli-Q como fase móvil (flujo: 0,6 mL/min). Los ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético) y el etanol se determinaron en una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., EE.UU.) a 41 °C usando H₂SO₄ 5 mM como fase móvil (flujo: 0,6 mL/min). Los datos se analizaron con el software Eurochrom Basic Edition para Windows.

Determinación de D- y L- láctico

Las muestras se desproteinizaron como se detalló para azúcares anteriormente. Se realizó la determinación de la concentración de ácido D- y L- láctico de las muestras usando el Kit Ácido D-Láctico/L-Láctico (Cat. Nº 11112821035) de Boehringer Mannheim/R-Biopharm con las siguientes modificaciones para realizar las determinaciones en un volumen menor (microplaca). Se utilizaron 100 µL de la solución 1, 20 µL de la solución 2, 2 µL de la solución 3, 10 µL de la muestra y 90 µL de H₂O bidestilada (100 µL en el caso del blanco). La mezcla de reacción se mezcló y luego de 5 min se leyó la absorbancia a 340 nm (A1). Se agregó 2 µL de la solución 4, se incubó a 25 °C durante 30-60 min y se leyó la absorbancia a 340 nm (A2). Finalmente, se agregó 2 µL de la solución 5, se incubó a 25 °C 30 min y se leyó la absorbancia a 340 nm (A3). La concentración de ácidos D- y L- láctico se midió espectrofotométricamente en el lector de microplacas SynergyTM HT (BioTek® Instruments, Inc. Vermont, EE.UU.) midiendo la aparición del NADH. La concentración se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$c = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \left(\frac{g}{L} \right)$$

c= concentración

$\Delta AD = A2 - A1$

$\Delta AL = A3 - A2$

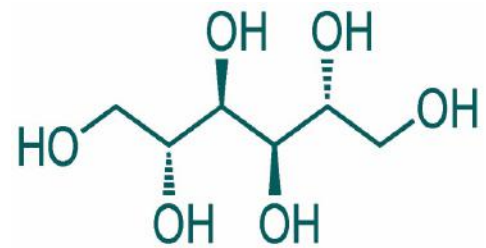
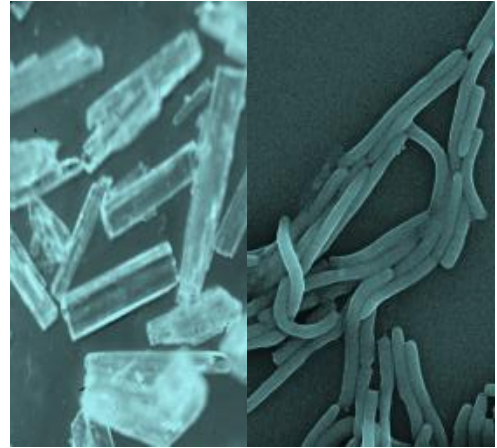
V= volumen final (mL)

v= volumen de la muestra (mL)

PM= peso molecular (D- y L- 90,1 g/L)

d= paso de la luz (0,3 cm microplaca)

ϵ = coeficiente de extinción del NADH a 340 nm (6,3 L x mmol⁻¹ x cm⁻¹)



CAPÍTULO 1:

Identificación y análisis *in silico* de los genes *mdh* en *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. trofaeoli* CRL 2034. Aislamiento de mutantes de CRL 2034 en genes relacionados a la biosíntesis de manitol

CAPÍTULO 1: Identificación y análisis *in silico* de los genes *mdh* en *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. tropaeoli* CRL 2034. Aislamiento de mutantes en genes relacionados a la biosíntesis de manitol

Introducción

La enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH) es la enzima responsable de convertir la fructosa en manitol en una reacción dependiente de NAD(P)H. Al inicio de este trabajo de Tesis, los únicos genes *mdh* secuenciados y caracterizados en BL eran los de *L. reuteri* ATCC 53608 [Sasaki y col. (2005); número de acceso en GenBank AAS55855.1], *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 9135 [Aarnikunnas y col. (2002); AAM09029.1] y *Leu. pseudomesenteroides* KCTC 3652 [Hahn y col. (2003); CAD31644.1]. Las enzimas MDH correspondientes fueron descritas como las responsables de la producción de manitol en cada una de las cepas estudiadas.

En este capítulo se detallan los estudios realizados para la identificación y caracterización *in silico* de los genes *mdh* y sus proteínas MDHs en *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. tropaeoli* CRL 2034. Estas cepas pertenecen a la colección de cultivos del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA). La cepa *L. reuteri* CRL 1101, aislada de intestino humano, y *L. mucosae* CRL 573, aislada de muestras de heces de niño, fueron previamente seleccionadas en nuestro laboratorio por su elevada producción de manitol en un muestreo realizado con 65 cepas de BL heterofermentativas que incluyó las especies *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, y *Weissella confusa* (datos no publicados). La producción de manitol se evaluó en fermentaciones a pH libre y controlado. La mayor producción de manitol para ambas cepas se encontró a pH 5,0 obteniéndose 122 ± 6 mM de manitol (YMtl= 75,5 mol%) con la cepa CRL 1101 y 312 ± 13 mM (YMtl of 93,5 mol%) con la cepa CRL 573. Se determinó que *L. reuteri* CRL 1101 utiliza la fructosa como aceptor de electrones y fuente de carbono a pH libre o a pH controlado de 6,0; a pH 5,0 usa este carbohidrato preferiblemente como aceptor de electrones externo. La cepa *L. mucosae* CRL 573 utiliza la fructosa simultáneamente como sustrato de

fermentación y aceptor de electrones externo en todas las condiciones estudiadas, lo que afecta la producción de manitol por esta cepa (Rodríguez y col., 2012). Se seleccionó la cepa *F. trophaeoli* CRL 2034, BL fructofílica aislada en 2014 a partir de higos, por ser la cepa con máxima producción de manitol (9,46 g/L a partir de 10 g/L de fructosa) entre 317 cepas de BL estudiadas.

En este capítulo se detallan también las diferentes estrategias de manipulación genética realizadas con las cepas CRL 1101 y CRL 2034. Los primeros estudios genéticos, que fueron muy diversos e intensos, se realizaron con *L. reuteri* CRL 1101; sin embargo, a pesar de optimizar su frecuencia de electroporación, no fue posible aislar la mutante *mdh*⁻. Las mayores frecuencias de electrotransformación obtenidas con *F. trophaeoli* CRL 2034 permitieron generar las modificaciones genéticas buscadas en los genes *mdh*, *per*, y *ldhs*.

Resultados

Identificación y caracterización *in silico* de los genes *mdh* de las cepas en estudio

***L. reuteri* CRL 1101**

Determinamos que el gen responsable de la actividad manitol 2-deshidrogenasa de la especie *L. reuteri*, descrito por Sasaki y col. (2005) en la cepa ATCC 53608 (GenBank: AY485531.1), se encuentra también presente en *L. reuteri* JCM 1112 (NC_010609.1), *L. reuteri* ATCC 55730 (DQ466588.1), y *L. reuteri* DSM 20016 (YP_001842738.1; cepa neotipo). En base a la secuencia de nucleótidos de estos genes, se diseñaron los cebadores Jb-mdh-F y Jr (Materiales y Métodos) para realizar la búsqueda del gene *mdh* en *L. reuteri* CRL 1101. Mediante una reacción de PCR, y utilizando como molde el ADN cromosómico de CRL 1101, se amplificó y secuenció con éxito una secuencia de 2398 pb que contenía el gen *mdh*. Posteriormente, se diseñaron los cebadores Jf y Jr, los que permitieron amplificar y secuenciar un fragmento de 3346 pb que contenía el gen *mdh* y los genes localizados a ambos lados (“corriente arriba” y “corriente abajo”) del mismo (Fig. 10). La secuencia de nucleótidos de este fragmento mostró un

95 % de identidad con la región *mdh* descrita en *L. reuteri* ATCC 53608 y DSM 2001 (nt 1918640 – 1917630 de la secuencia YP_001842738.1). Mediante el programa ORFinder del NCBI se identificaron tres genes, denominados *Mn trans*, *mdh* y *reg*; cuyas potenciales funciones fueron anticipadas haciendo uso de la herramienta BlastP y la base de datos GenBank.

El gen *mdh* de CRL 1101 consiste en un operón monocistrónico de 1011 pares de bases y codifica para una proteína (denominada MDH) de 336 aminoácidos (aa). Los programas *Promoter Prediction by Neutral Network*, RibEx (Abreu-Goodger y Merino, 2005) y DNAMAN permitieron localizar los posibles promotores y terminadores de *mdh* (Fig. 10). Corriente arriba, y con un sentido de expresión transcripcional contrario a *mdh*, se localizó el gen *Mn trans* (1593 pb y 530 aa) comprometido con el transporte de manganeso y corriente abajo, y en el mismo sentido que *mdh*, el gen *reg* (513 pb y 170 aa) que codifica para un regulador transcripcional de la familia TetR; los miembros de esta familia de reguladores participan en el control de genes cuyos productos están implicados, entre otros, en el estrés osmótico. Como se detalló en la Introducción, el manitol puede ser sintetizado bajo condiciones de estrés por lo que la proteína Reg podría estar relacionada a la producción de manitol. Corriente arriba al gen *reg* se localizó una proteína de función desconocida (datos no mostrados).

***L. mucosae* CRL 573**

El genoma de *L. mucosae* CRL 573 fue secuenciado en 2013, utilizando la estrategia *Whole-Genome Shotgun* (WGS) y un equipo Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies) (MR DNA; 503 Clovis Rd, Shallowater, TX 79363, Texas, Estados Unidos). Las secuencias nucleotídicas se ensamblaron en 38 *contigs* utilizando NGen (DNASTar). La anotación funcional se llevó a cabo con la herramienta NCBI *Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline* (PGAAP) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/). El genoma se depositó en DDBJ/EMBL/GenBank con el número de acceso JROC00000000 (Bleckwedel y col., 2014). El genoma de *L. mucosae* CRL 573 consiste en 2.257.701 pb, con un porcentaje

de GC de 46,6 %. Se predijeron 2.355 marcos de lectura abiertos, 23 rRNAs y 134 tRNAs.

En el genoma de CRL 573 se encontró un gen homólogo a *mdh* de CRL 1101 (LX03_09970, *contig* 37); sin embargo, este gen está interrumpido por un codón “*stop*”. Para descartar que la presencia del codón *stop* se deba a un error en la secuenciación del genoma, se procedió a amplificar y secuenciar un fragmento interno de dicho gen. La secuencia nucleotídica obtenida confirmó la presencia del codón *stop* (datos no mostrados). El programa ORFinder del NCBI identifica dos marcos de lectura abierta de 465 pb y 558 pb (denominados *mdh1* y *mdh2*, respectivamente) que codifican para dos proteínas de 154 y 185 aa, respectivamente (Fig. 10). Respecto al gen *mdh* de CRL 1101, el gen *mdh1* tiene un 78 % de identidad con su extremo 5', y el gen *mdh2* un 78 % de identidad con su extremo 3'. La producción de manitol demostrada en esta cepa por Rodríguez y col. (2012) indicaría que esta mutación no afectaría la funcionalidad de esta enzima o existe otra enzima que cumple esta función; en el genoma se encontraron dos genes cuyas proteínas (LX03_02465 y LX03_11755) que presentan el mismo motivo de la familia MDR al que pertenecen las enzimas MDH (detallado más adelante), pero que poseen indentidades inferiores a 30 % con las *mdh* de referencia.

Se determinó que los contextos genómicos de los genes *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 y *L. mucosae* CRL 573 son similares. Al igual que en CRL 1101, en CRL 573 se encontraron, corriente arriba y corriente abajo de los genes *mdh*, los genes *Mn trans* y *reg*, respectivamente, los que codifican para un transportador de manganeso (1617 pb y 538 aa) y para un regulador transcripcional (426 pb y 141 aa) de la familia TetR (Fig. 10). Las regiones que contienen los genes *Mn trans*, *mdh* y *reg* (4110 pb) de las cepas CRL 1101 y CRL 573 presentaron un 67 % de identidad a nivel de secuencia nucleotídica.

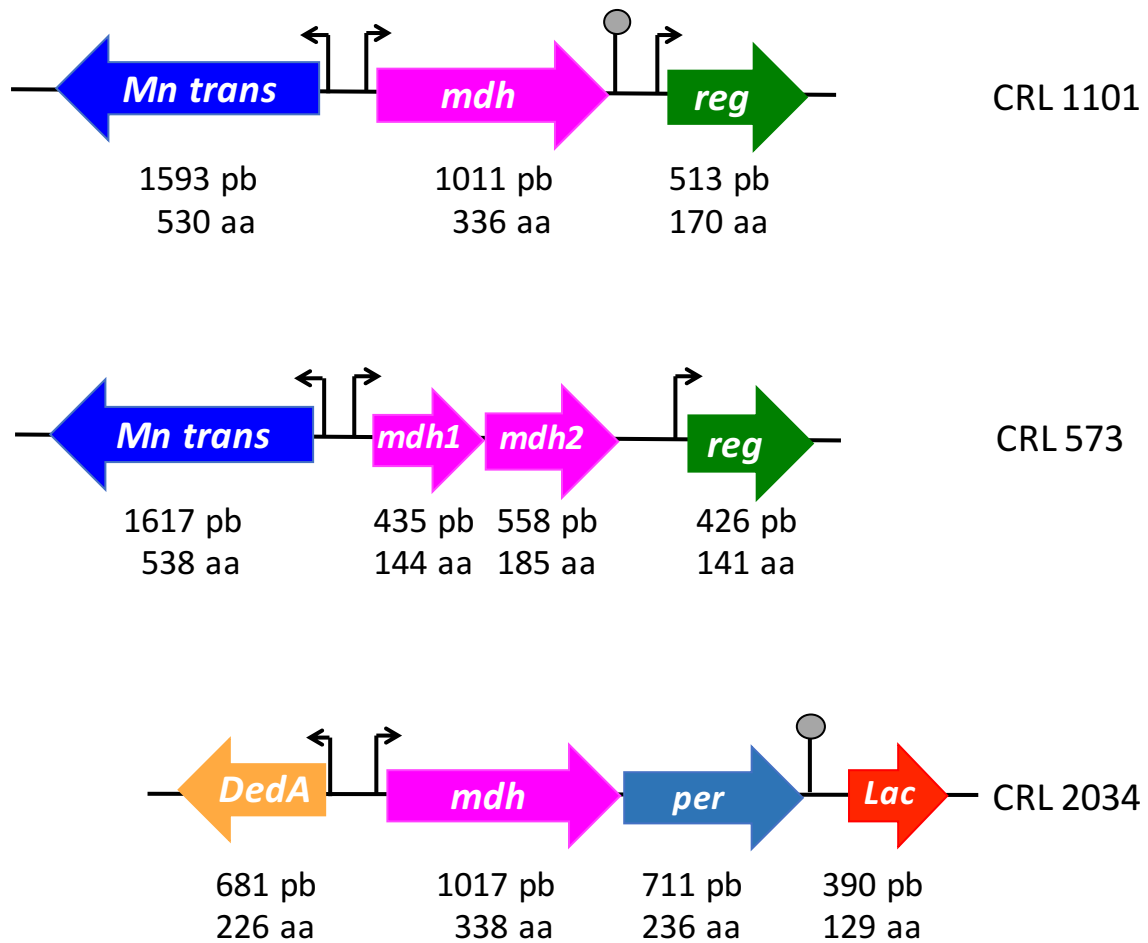


Figura 10. Estructura y contexto de los genes *mdh* de las tres cepas en estudio.

Mn trans: transporte de manganeso; *reg*: regulador transcripcional; *DedA*: proteína de membrana; *per*: putativa fructosa permeasa; *Lac*: lactoglutación liasa.

↗ Promotor ● Terminador

***F. trophaeoli* CRL 2034**

El genoma de *F. trophaeoli* CRL 2034 se secuenció también en MR DNA (503 Clovis Rd, Shallowater, TX 79363, Texas, Estados Unidos) en el año 2015, utilizando la misma estrategia de *Whole-Genome Shotgun* (WGS) y un Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies). Las lecturas se ensamblaron en 32 *contigs* utilizando NGen (DNASTar). En este caso la anotación funcional se llevó a cabo por la herramienta RAST server (Aziz y col., 2008) y NCBI *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP). Los tARNs y rARNs se identificaron utilizando ARAGORN (Laslett y Canback, 2004) y RNAmmer (Lagesen y col., 2007), respectivamente. El genoma consiste en 1.661.960

pb, con un contenido de GC de 44,6 %, en el que se predijeron 1.465 marcos de lectura abiertos, 5 rARNs y 49 de tARNs.

En el genoma de CRL 2034 se encontró un gen homólogo al gen *mdh* de CRL 1101 (73 % de identidad), localizado en el *contig* 20, que está compuesto por 1017 pb y codifica para una proteína de 338 aa. El gen *mdh* en CRL 2034 forma parte de un operón bicistrónico; corriente abajo del mismo se localizó un gen de 711 pb, denominado *per*, que codifica para una putativa fructosa permeasa de 236 aa. El programa *Promoter Prediction by Neutral Network* identificó una region promotora (cajas -10: TATTATTAT y -35: TTGACA, localizadas respectivamente a 48 bp y 71 bp del codón de inicio de la proteína MDH). La proteína fructosa permeasa podría ser responsable de incorporar la fructosa al interior celular, que luego será reducida a manitol por la enzima MDH.

El contexto genómico de *mdh* en CRL 2034 fue también distinto al descrito en CRL 1101 y CRL 573 (Fig. 10). Corriente abajo de este operón se encontró un gen relacionado a una proteína con actividad lactoglutation liasa (EC 4.4.1.5) o glioxilasa I, enzima responsable de la desintoxicación de metilglioxal, compuesto citostático en bajas concentraciones o citotóxico en concentraciones elevadas y que se forma espontáneamente a partir de dihidroxiacetona fosfato o enzimáticamente por la acción de la trifosfato isomerasa, de la metilglioxal sintasa o en el metabolismo de treonina. Corriente arriba y en sentido contrario a *mdh* se encontró el gen *DedA* (Fig. 10) (del inglés: *downstream (of hisT) Escherichia coli DNA gen A*; (Nonet y col., 1987), que codifica para una proteína de membrana cuya principal función es la de mantener la homeostasis de la membrana celular; en las bacterias en las que se mutó este gen se observaron problemas en la división celular, sensibilidad a altas temperaturas, composición lipídica alterada, entre otros (Doerrler y col., 2013). Además, la proteína *DedA* está asociada con la reducción de selenito a selenito elemental, siendo este último menos tóxico (Ledgham y col., 2005).

Se realizó la comparación de los contextos genómicos de los sistemas *mdh* descritos utilizando el programa SEED Viewer versión 2.0 (Overbeek y col., 2005). El SEED es un marco para apoyar análisis comparativos y la anotación de genomas curados. En la Fig. 11 se muestra el contexto genómico de *mdh* de las cepas CRL 2034 y CRL 573, con los

genomas de otras BL; el de *L. reuteri* CRL 1101 no se pudo incluir por no poseer el genoma secuenciado. En general, se observan dos contextos genómicos distintos, uno similar a CRL 2034 y el otro a CRL 573. Los genes de la putativa fructosa permeasa (3 en Fig. 11) y de la proteína relacionada a lactoglutación liasa (4) que se encuentran corriente abajo de *mdh* (1) en CRL 2034 se encuentran conservados en *Leu. mesenteroides* ATCC 8293, *L. brevis* ATCC 367 y en *Oenococcus oeni* PSU-1; sin embargo, corriente arriba de *mdh* se pueden observar algunas diferencias. En *Leu. mesenteroides* ATCC 8293 se encuentra un gen que codifica para el represor del operón de sacarosa ScrR de la familia LacI (23) y, corriente arriba del represor, los genes de la proteína DedA (12) y de una fosfoglucomutasa (14), conservados también en CRL 2034. Por otro lado, en las cepas *L. brevis* ATCC 367 y *O. oeni* PSU-1 se ubica el gen de una fructoquinasa (11) y no se encuentra el de la proteína *DedA*.

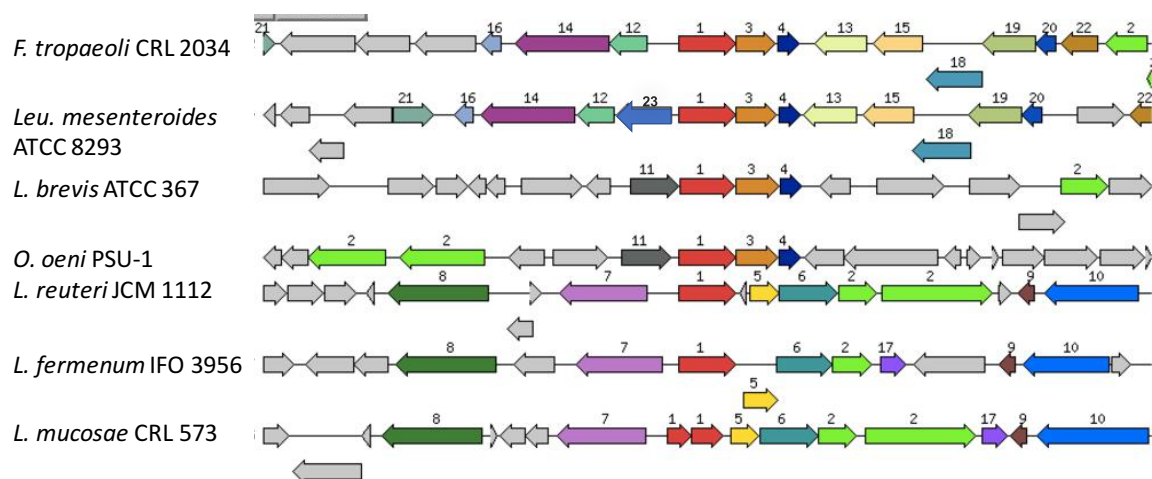


Figura 11. Comparación del contexto genómico de *mdh* en CRL 2034, CRL 573 y otras BL utilizando el programa SEED.

Los genomas comparados por el programa SEED son: *F. tropaeoli* CRL 2034; *Leu. mesenteroides* sub. *mesenteroides* ATCC 8293; *L. brevis* ATCC 367; *Oenococcus oeni* PSU-1; *L. reuteri* JCM 1112; *L. fermentum* IFO 3956; *L. mucosae* CRL 573. 1: *mdh*; 2: proteína de transporte ABC; 3: putativa fructosa permeasa; 4: lactoglutación liasa; 5: regulador transcripcional de la familia TetR; 6: proteína de unión a ATP componente de transporte ABC; 7: transporte de Mn; 8: treonil tRNA sintasa; 9: regulador transcripcional de la familia ArsR; 10: putativa muramidasa; 11: fructoquinasa; 12: *DedA*; 13: tioredoxin reductasa; 14: fosfoglucomutasa; 15: UTP-glucosa-1P-uridiltransferasa; 16: proteína ribosomal LSU; 17: represor de arginina; 18: glicerol-3-P-deshidrogenasa; 19: HPr quinasa; 20: proteína hipotética; 21: proteína hipotética; 22: proteína reguladora del sistema de transporte de fosfato PhoU; 23: represor del operón de sacarosa ScrR de la familia LacI

El contexto genético de *mdh* observado en CRL 573 fue similar al de las cepas *L. reuteri* JCM 1112 y *L. fermentum* IFO 3956 (sería también similar a CRL 1101), y se caracteriza por la presencia, corriente abajo del gen *mdh* (1), de los genes para un regulador transcripcional de la familia TetR (5), y de proteínas de unión a ATP, componentes de un sistema de transporte ABC (6 y 2), y, corriente arriba del gen *mdh*, del gen de transporte de manganeso (7).

Caracterización de las proteínas MDH de *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. tropaeoli* CRL 2034

Las secuencias de las proteínas MDH de las cepas en estudio fueron anotadas con el programa *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (Aziz y col., 2008) y confirmadas con la herramienta ORFinder del NCBI a partir de los genes *mdh*. En Tabla 7 se muestra los porcentajes de identidad entre las MDH de las cepas estudiadas (CRL 1101, CRL 573 y CRL 2034), y de las cepas de referencia usadas (*L. reuteri* ATCC 53608; *Leu. pseudomesenteroides* KCTC 3652 y *Leu. mesenteroides* ATCC 9135). Se observa que las secuencias de aminoácidos de las MDHs de *L. reuteri* y *L. mucosae* poseen entre ellas una identidad mayor al 88 %; mientras la identidad entre las MDHs de *F. tropaeoli* CRL 2034, *Leu. mesenteroides* ATCC 9135 y *Leu. pseudomesenteroides* KCTC 3652 es mayor al 84 % (estas especies están muy relacionadas filogenéticamente; el género *Fructobacillus* se reclasificó recientemente a partir del género *Leuconostoc*). Finalmente, las identidades observadas entre las MDH de esos dos grupos (i.e., *L. reuteri* versus *F. tropaeoli*) se encuentra en el rango de 69 a 75 % (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de identidad de las proteínas MDH en estudio

Cepas	CRL573	CRL1101	ATCC53608	CRL2034	KCTC3652	ATCC9135
CRL573	100.00	87.84	87.23	69.30	72.04	71.73
CRL1101	87.84	100.00	98.81	72.62	74.40	73.51
ATCC53608	87.23	98.81	100.00	72.92	74.70	73.81
CRL2034	69.30	72.62	72.92	100.00	84.32	86.39
KCTC3652	72.04	74.40	74.70	84.32	100.00	93.79
ATCC9135	71.73	73.51	73.81	86.39	93.79	100.00

Nota: el porcentaje de identidad en la cepa CRL 573 corresponde a las proteínas MDH1+MDH2 juntas.

En la Fig. 12 se muestran los dominios presentes en las proteínas MDH en estudio, los que fueron detectados al utilizar la herramienta BlastP del NCBI. Los dominios detectados en las MDH de CRL 1101, CRL 573 y CRL 2034 mediante el programa InterPro (EMBL-EBI) fueron: IPRO11032 GroES-like (relacionado con alcoholes deshidrogenasas que contienen un dominio de unión a Zn); IPRO13154: *alcohol dehydrogenase, N-terminal*; IPRO16040: *NAD(P)-binding domain*; IPRO13149: *alcohol dehydrogenase, C-terminal*; e IPRO02328: *alcohol dehydrogenase, zinc-type, conserved site*. Así, estas enzimas poseen los dominios característicos de la superfamilia MDR (Reductasas/deshidrogenasas de cadena media (MDR)/familia de las deshidrogenasas dependientes de zinc). Estas proteínas forman parte de la superfamilia de las alcohol deshidrogenasas dependientes de zinc (ADH-Zn) y proteínas relacionadas, que catalizan la interconversión dependiente de NAD(P)(H) de alcoholes a aldehídos o cetonas, y se caracterizan por tener dos dominios: un dominio C-terminal con un sitio de unión Rossmann, con una forma de plegamiento beta-alfa (motivo estructural de proteínas de unión a nucleótidos, particularmente el cofactor NAD) y un dominio N-terminal catalítico del tipo GroEs. Pueden formar dímeros o tetrámeros, los que en general están unidos a dos átomos de zinc por subunidad, un Zn catalítico en el sitio activo y uno estructural. El Zn catalítico está coordinado por una histidina, dos cisteínas y una molécula de agua. El otro Zn cumpliría un rol estructural afectando las interacciones de las subunidades y está típicamente coordinado por cuatro cisteínas. Algunos miembros de la superfamilia MDR pueden tener un solo Zn o carecer de ellos.

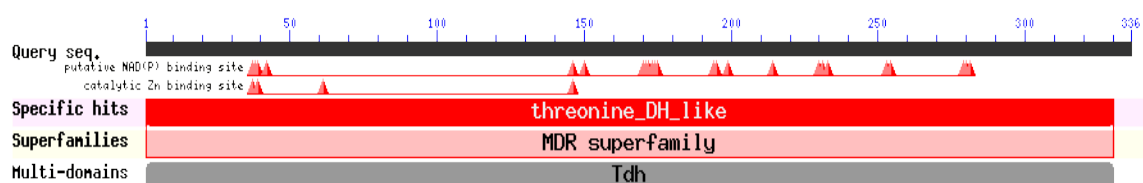


Figura 12. Dominios presentes en las proteínas MDH descrito por NCBI.

En la Fig. 13, que muestra el alineamiento múltiple de las MDHs de las cepas CRL 1101, CRL 573, CRL 2034, ATCC53608, KCTC3652 y ATCC9135, generado con el programa Clustal Omega, se observan los putativos sitios de unión a NAD(P) (en amarillo) y dos sitios de unión al catión Zn: un sitio de unión al Zn catalítico, coordinado por los aminoácidos C37, G38, T39, F61, E62 y E146 (este último ausente en las proteínas MDH de CRL 573), y un sitio de unión al Zn estructural, coordinado por los residuos C91, C94, C97 y C105. Finalmente, en la Fig. 14 (A-C) se representan las estructuras secundarias de las MDH de CRL 1101, CRL 573 y CRL 2034 realizadas con la herramienta PSIPRED de UCL-CS Bioinformatics (Jones, 1999; Buchan y col., 2013). Se puede observar que las estructuras secundarias de las tres MDH son similares y presentan un plegamiento típico, hojas betas flanqueadas por hélices alfa, un motivo clásico de plegado de Rossmann para la unión de dinucleótidos.

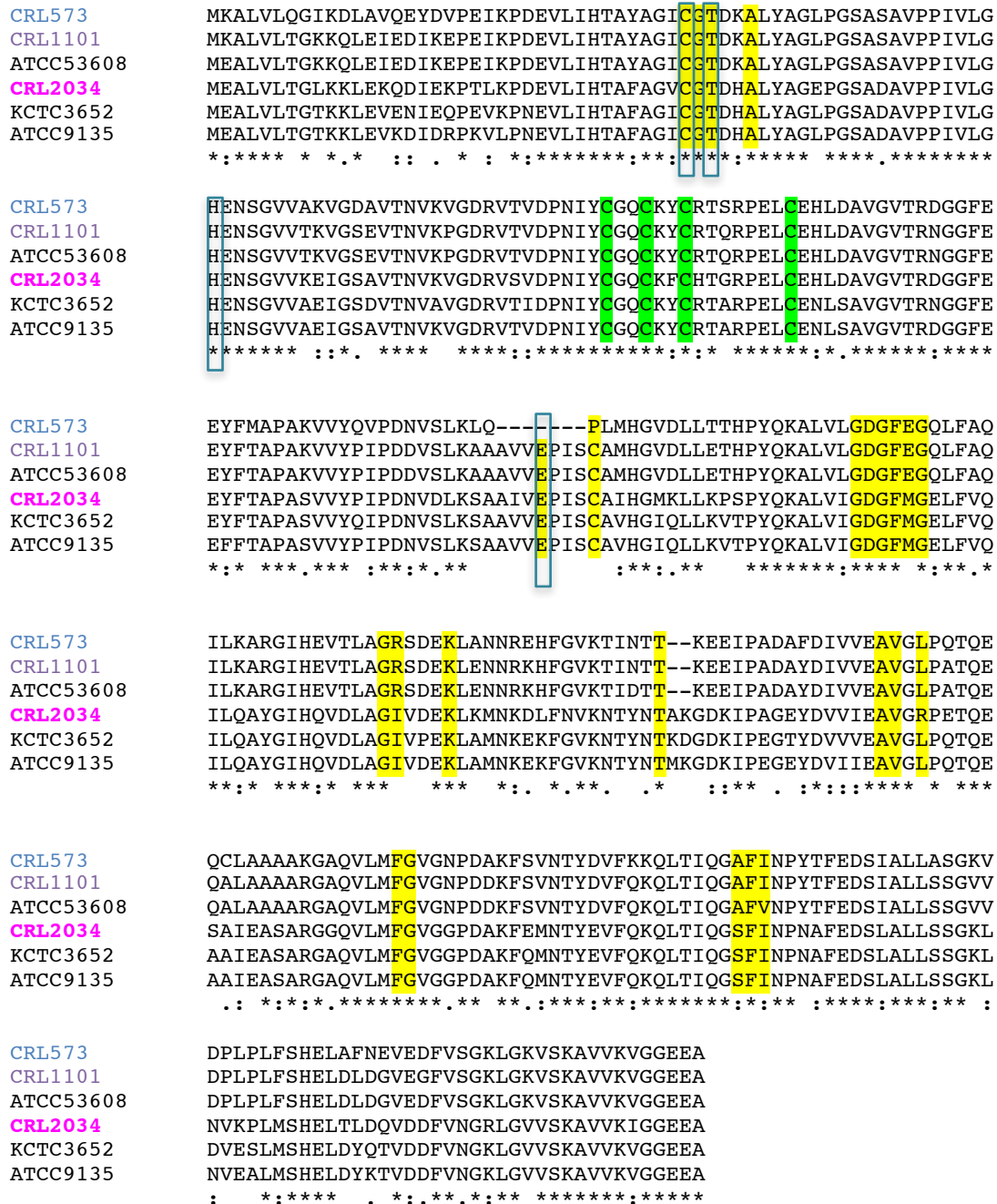
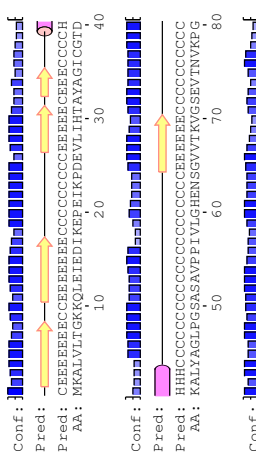


Figura 13. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las MDH de *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573, *F. tropaeoli* CRL 2034, *L. reuteri* ATCC53608, *Leu. pseudomesenteroides* KCTC3652 y *Leu. mesenteroides* ATCC9135.

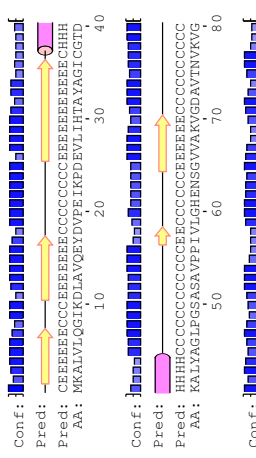
En amarillo se indican los putativos sitios de unión a NAD(P); encuadrado el sitio catalítico de unión a Zn. En verde se indican los putativos sitios de unión al Zn estructural.

- * indica las posiciones en donde los aminoácidos están totalmente conservados
- : indica aminoácidos conservados entre grupos con propiedades fuertemente similares (puntuación > 0,5 en la matriz Gonnet PAM 250)
- . indica aminoácidos conservados entre grupos con propiedades débilmente similares (puntuación > 0,5 en la matriz Gonnet PAM 250).

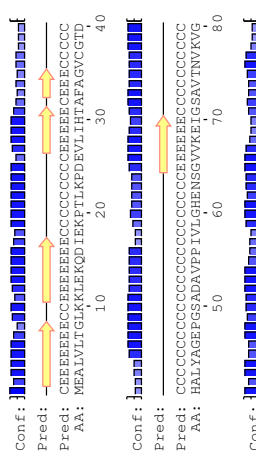
A CRL 1101



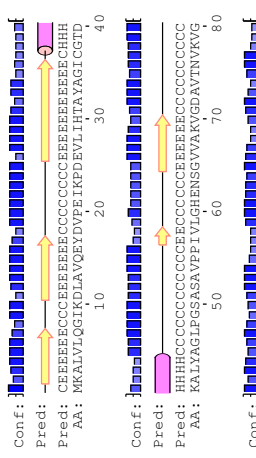
B CRL 573 (MDH1)



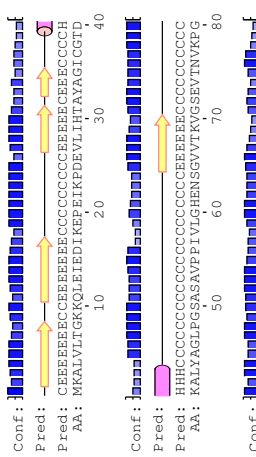
C CRL 2034



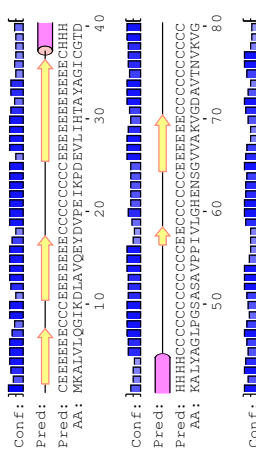
(MDH2)



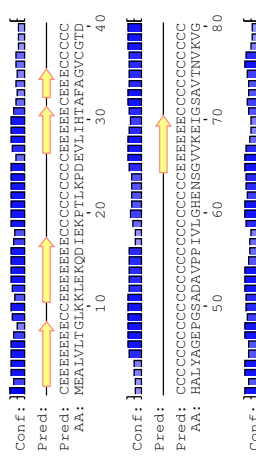
A CRL 1101



B CRL 573 (MDH1)



C CRL 2034



hélice alfa
 hoja beta
 enrollamiento al azar
 Conf: `|||||` confianza de la predicción
 Pred: `|||||` estructura secundaria predicha
 AA: secuencia blanco

Figura 14. Estructura secundaria de las MDH de *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. trofaeoli* CRL 2034.

Estudio filogenético de las enzimas manitol 2-deshidrogenasas

En la Fig. 16 se presenta un árbol filogenético de las enzimas MDH y las enzimas manitol 1-P-deshidrogenasas (M1-PDH) descritas en los genomas de BL homo- y hetero-fermentativas. Para elaborar el árbol, se seleccionaron las secuencias de aminoácidos que mostraron una identidad mayor al 80 % en el análisis con el programa BLASTP.

En el árbol filogenético se observan dos ramas bien diferenciadas entre las M1-PDH (rama A) y MDH (rama B), lo que sugiere una evolución diferente entre las mismas. En la rama A se encuentran las enzimas de algunas especies que son heterofermentativas, como por ejemplo dos cepas de *O. oeni* que presentan la enzima M1-PDH.

A su vez, se observa que las distintas MDHs se asocian, en general, de manera específica con el género y la especie de las que provienen. Así, la relación entre la MDH de *F. trofaeoli* CRL 2034 es más estrecha con las MDH de otras especies de *Fructobacillus*, luego con las MDH del género *Leuconostoc* (Clado 1), y finalmente con las MDH de lactobacilos heterofermentativos. Llama la atención la ubicación de la MDH CRL 573, que para este estudio se utilizaron las dos enzimas MDH juntas, que no está ubicada en la rama en donde se encuentran las otras enzimas de *L. mucosae*.

Esto sugiere posiblemente la ausencia de transferencia horizontal de estos genes y que la diversificación de los mismos ocurrió luego de la especiación de estas BL. Es importante destacar que muchos de estos genes han sido anotados con diversos nombres; entre ellos, sorbitol deshidrogenasa, proteínas GroEs-like y, la mayoría, alcohol deshidrogenasas. Por ejemplo la enzima MDH de CRL 2034 estaba anotada como sorbitol deshidrogenasa por la herramienta RAST server con la cual se llevó a cabo la anotación funcional. Esto indica la necesidad de mejorar los sistemas de anotación de genomas que se utilizan actualmente.

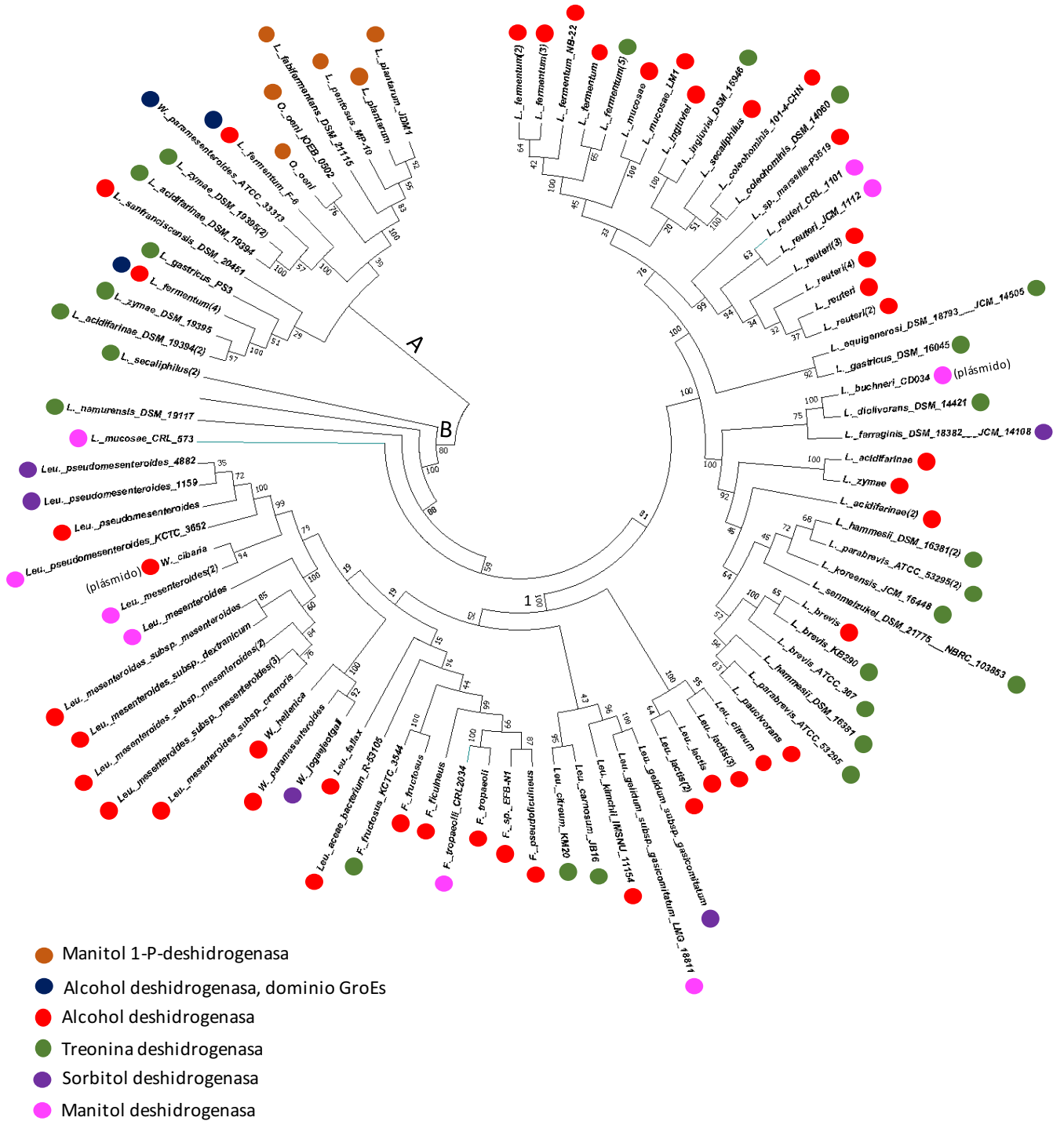


Figura 16. Árbol filogenético de las enzimas MDH y las enzimas manitol 1-P-deshidrogenasas (M1-PDH) descritas en los genomas de BL homo- y hetero-fermentativas.

Estudios genéticos en *L. reuteri* CRL 1101 y *F. tropaeoli* CRL 2034

Para confirmar los estudios realizados *in silico*, se buscó generar mutantes en los genes *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 y *F. tropaeoli* CRL 2034. Los primeros estudios se realizaron con la cepa CRL 1101 (cuando se iniciaron estos estudios la cepa CRL 2034 aún no había sido aislada), elegida por poseer un solo gen *mdh* y por utilizar fructosa más eficientemente que CRL 573 (CRL 1101 utiliza la fructosa principalmente como aceptor de electrones externos, convirtiéndola a manitol; en cambio, CRL 573 utiliza parte de la fructosa como fuente de energía y carbono y otra parte la transforma en manitol).

Uno de los principales problemas encontrados en los estudios genéticos de BL es la dificultad para transformar las cepas seleccionadas. El método de elección más común para introducir ADN exógeno es la electroporación. Aunque se han descrito protocolos para una eficiente electroporación para algunas cepas de las especies *Lactococcus lactis*, *L. plantarum* y *Streptococcus thermophilus*, para otras especies las frecuencias son bajas e incluso nulas (i.e., *L. delbrueckii*). Con el objetivo de definir y optimizar la eficiencia de transformación de *L. reuteri* CRL 1101, se utilizaron distintos plásmidos y se evaluaron diferentes protocolos para generar células electrocompetentes. Se ensayaron protocolos que utilizan NaCl, penicilina y glicina (en distintas concentraciones) para debilitar la pared celular de este microorganismo Gram positivo (Luchansky y col., 1989; Ausbel F, 1999; Turner y col., 1999; Mason y col., 2005; Lo y col., 2009; Stephenson y col., 2011), a veces modificando y combinando algunos de estos métodos. También se probaron distintas condiciones de electroporación: 600 Ω 25 μ F 1,8 kV o 2,5 kV y 200 Ω 25 μ F 1,8 kV o 2,5 kV. Como resultado de estos estudios se optimizó un protocolo en el que se utiliza penicilina 0,7 μ g/mL y como condiciones de electroporación 600 Ω 25 μ F 1,8 kV, obteniendo una eficiencia de transformantes de $7,4 \times 10^2$ UFC/mL μ g ADN con el plásmido p29cat232Small y de $6,4 \times 10^4$ UFC/mL μ g ADN con el plásmido pJP042 (van Pijkeren y Britton, 2012). Sin embargo, no se logró transformar la cepa CRL 1101 con los plásmidos pGhost (Biswas y col., 1993; Maguin y col., 1996), pRV85 (Gory y col., 2001), p3B1 (Cuozzo, 2002), y pTVC_lac (Poyart y Trieu-Cuot, 1997), que son los plásmidos

que facilitan la incorporación insercional de los genes blanco, necesarios para estudios de expresión u otros estudios.

El uso de plásmidos no replicativos, de inserción por simple recombinación, no fue tampoco satisfactorio. En este caso, utilizamos el vector pRV300 (Leloup y col., 1997) para clonar una región interna al gen *ldh* de *L. reuteri* CRL 1101 y obtener el plásmido recombinante denominado p::ldhCRL1101 (Fig. 37 del anexo). Se obtuvieron resultados negativos con múltiples experimentos de electroporación de células electro-competentes de CRL 1101 con p::ldhCRL1101 a pesar de haber utilizado distintas concentraciones de eritromicina. De todas formas, y habiendo transformado CRL 1101 con el plásmido pJP042, se buscó generar mutaciones puntuales en el gen *mdh* mediante la técnica de *Recombineering* (van Pijkeren y Britton, 2012). Como control del sistema, las células de CRL 1101 transformadas con el plásmido pJP042, que expresa la función RecT necesaria para la recombinación, fueron electroporadas con el oligonucleótido oJP577 (Materiales y Métodos) que modifica a la RNA polimerasa haciéndola resistente a rifampicina. Los resultados mostraron que el mecanismo de *Recombineering* era activo en la cepa CRL 1101, ya que se obtuvieron $1,68 \times 10^3$ UFC/mL electrotransformantes resistentes a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico. Por lo tanto, diseñamos los oligonucleótidos necesarios para generar la mutante *mdh* deseada, incorporando en los cebadores dos codones *stop* sucesivos necesarios para producir una proteína trunca y sin función. Luego, se transformó la cepa CRL 1101 conteniendo el plásmido pJP042 con el oligonucleótido oMDH y las potenciales células recombinantes se seleccionaron a través de la reacción MAMA PCR (*PCR Mismatch Amplification Mutation Assay*) (Qiang y col., 2002). Sin embargo, las actividades MDH de las potenciales cepas recombinantes fueron similares a los valores de MDH de la cepa control. Estos resultados sugieren que la mutación diseñada podría no estar afectando la actividad de la enzima MDH de cepa CRL 1101 o que posee más de una enzima con función MDH, aunque no pudo identificarse una segunda enzima MDH en los análisis de regiones homólogas al gen *mdh*.

Ante los inconvenientes expuestos y luego de intenso trabajo, concentramos los estudios en *F. tropaeoli* CRL 2034, cepa aislada en el año 2015 y seleccionada por su

alta producción de manitol a partir de fructosa. Además, con este microorganismo se obtuvo una muy buena eficiencia de transformación (10^5 transformantes/mL μg ADN).

Aislamiento de mutantes *mdh*⁻ de *F. trofaeoli* CRL 2034

Con el objetivo de confirmar los estudios realizados *in silico* en la cepa CRL 2034, se buscó generar una cepa carente de actividad MDH mediante el uso de un plásmido insercional no replicativo. Para ello, se diseñó y generó el vector de inserción p::*mdh* (Fig. 17): se amplificó un fragmento de 450 pb, interno al gen *mdh* de CRL 2034, utilizando los *primers* Frumdh f y Frumdh r (Materiales y Métodos); el amplicón obtenido fue luego tratado con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y clonado en el plásmido pRV300 (tratado con las mismas enzimas de restricción). El plásmido recombinante p::*mdh* fue recuperado en células de *E. coli* y luego electroporado en células electrocompetentes de CRL 2034. Las posibles mutantes *mdh*⁻, seleccionadas en placas de MRS-Fru agar con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de eritromicina, se evaluaron mediante reacciones de PCR utilizando los cebadores Em-f+Em-r, T3+ Mdh1 y T7+Mdh3. En la Fig. 18A se representa la inserción del plásmido p::*mdh* en el cromosoma de CRL 2034 generando la interrupción del gen *mdh*; mientras que en la Fig. 18B se muestra una foto de electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con los mencionados cebadores, que confirman la inserción del plásmido p::*mdh* en las mutantes CRL 2034::*mdh*.

En la Fig. 18C se muestran resultados idénticos de la reacción rep-PCR, realizados con el cebador (GTG)₅, para las células CRL 2034 y CRL 2034::*mdh*. Estos datos y la idéntica secuenciación del gen 16S rRNA en ambas cepas confirmaron que la mutante provenía de la cepa parental. Además, en la Fig. 18B se observa solo en la mutante CRL 2034::*mdh*, y no en la célula original CRL 2034, una amplificación positiva y de tamaños esperados de: un fragmento del gen de Em (623 pb) y de dos fragmentos de 774 pb y de 1028 pb obtenidos, respectivamente, con la combinación de cebadores T3+Mdh1 y T7+Mdh3. Además, mediante la secuenciación de estos dos amplicones se confirmó la correcta inserción del plásmido p::*mdh*.

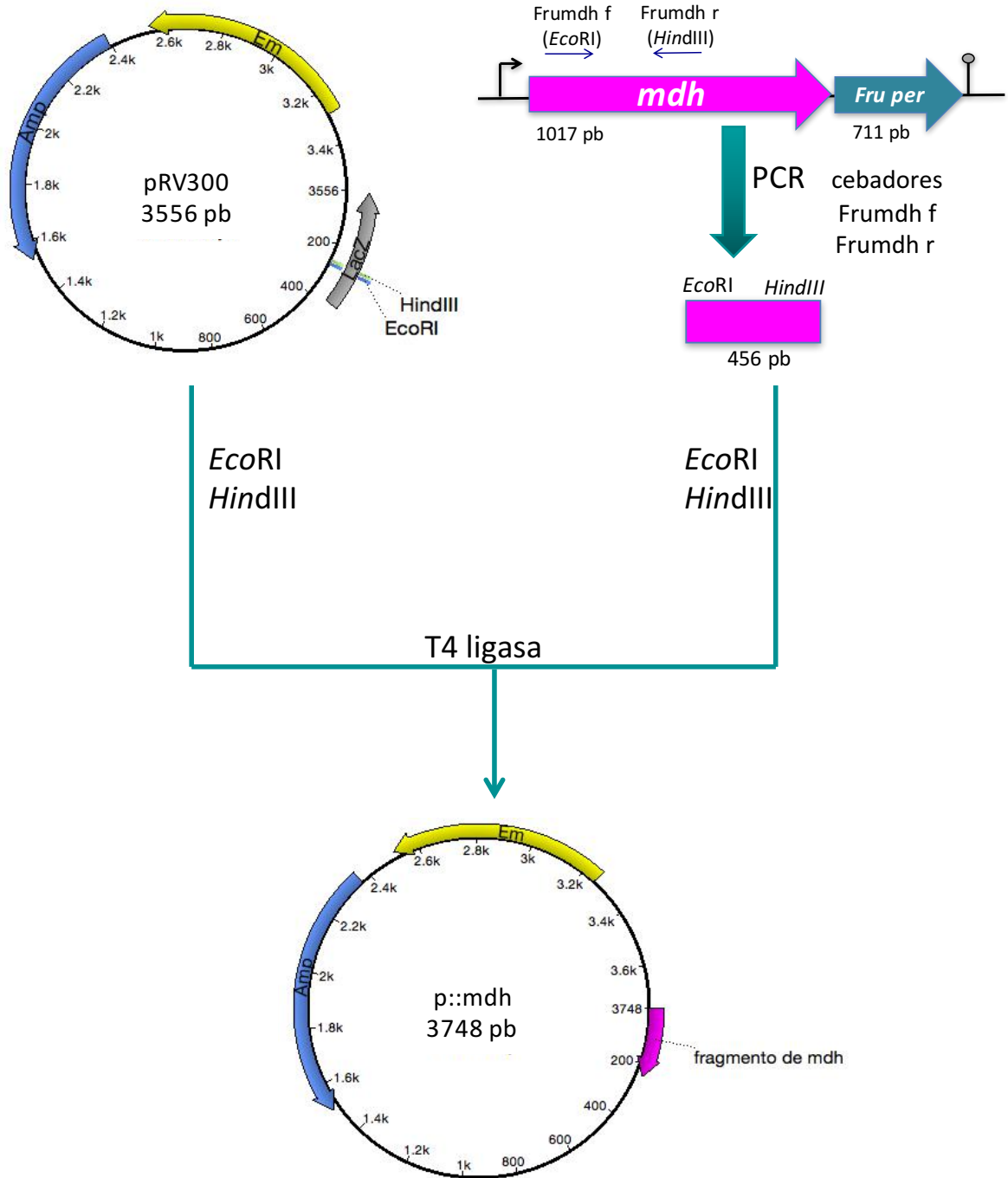


Figura 17. Construcción del plásmido p::mdh.

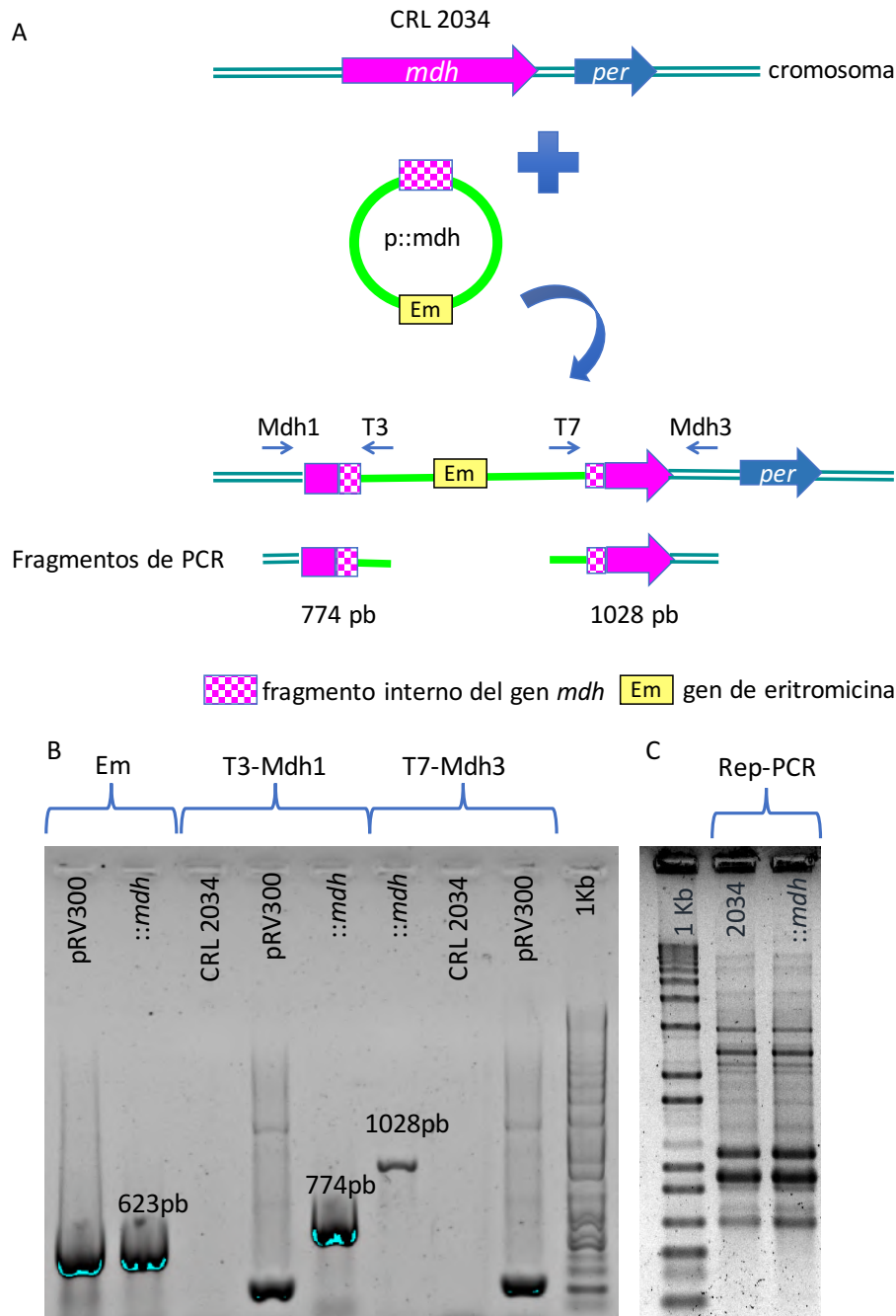


Figura 18. A) Esquema de inserción del plásmido p::*mdh* y posición de los cebadores utilizados; B) Gel de agarosa con los productos amplificados. En calles 1 y 2 se observa la amplificación de parte del gen Em; calles 3, 4 y 5: productos amplificados con los oligos T3-Mdh1, observándose positiva para ::*mdh* (774 pb); calles 6, 7 y 8: productos de PCR con los cebadores T7-Mdh3 observándose positiva para ::*mdh* (1028 pb). Se utilizaron como controles el plásmido pRV300 (positivo para Em y negativo para el resto de los oligos) y ADN cromosómico de CRL 2034 (control negativo de la combinación de oligos); C) perfiles de rep-PCR de la cepa CRL 2034 y CRL 2034::*mdh* y marcador de peso molecular (calle 1).

Se realizaron luego ensayos de actividad MDH y de producción de manitol. Para los ensayos de actividad se hicieron crecer las cepas WT y mutante durante 8 h a 30 °C en medio líquido MRS-Fru 2 % con agitación. Se utilizó un extracto libre de célula para realizar el ensayo de actividad. En la Fig. 19 se muestran los valores de actividad específica obtenidos para ambas cepas; se observa que la cepa CRL 2034::*mdh* no posee actividad MDH. De igual forma, no se detectó manitol en el sobrenadante de las mismas, luego de 24 h de incubación. Estos ensayos demuestran la inserción del plásmido *p>::mdh*, generando la interrupción del gen *mdh*, y sugieren que el gen *mdh* es el único gen involucrado en la conversión de fructosa a manitol en la cepa CRL 2034.

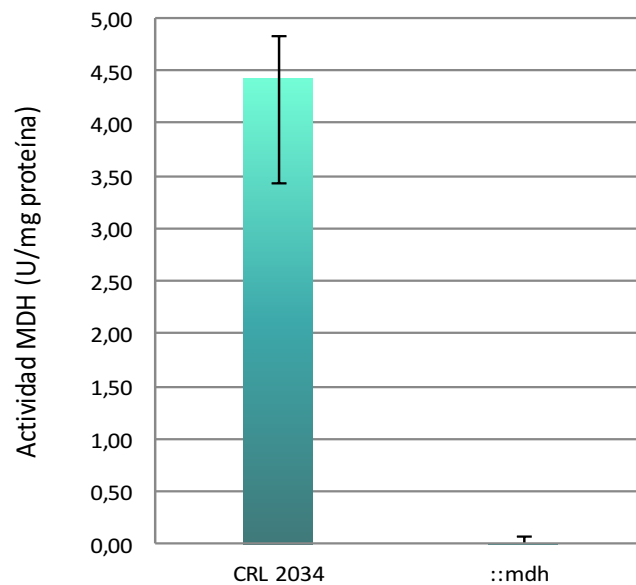


Figura 19. Actividad específica MDH en *F. trophaeoli* CRL 2034 y la mutante CRL 2034::*mdh*.

Ensayos de clonado del gen *mdh* y *mdh-per*

Con el objetivo de complementar la mutación *mdh* se buscó clonar y expresar el gen *mdh* y los genes *mdh-per* de *F. trophaeoli* CRL 2034 en esta misma cepa, en las cepas mutantes generadas más adelante y en otras cepas de BL no productoras de manitol. Para ello, utilizando una variedad de cebadores específicos (ver Materiales y Métodos), se amplificaron los genes *mdh-per* en un fragmento de 2010 pb y el gen *mdh* en un fragmento de 1229 pb. Los vectores de clonado usados fueron los plásmidos p3B1 (CmR), pRV300 (EmR) y pBlueScript SKII+ (AmpR). Se usó este último plásmido para clonar los genes *mdh* y *mdh-per* y además los genes que confieren resistencia a

cloranfenicol y la proteína iniciadora de la replicación RepB del plásmido p3B1 para poder ser expresados en BL. A pesar de los múltiples intentos de clonado (datos no mostrados), no se consiguió aislar ningún vector recombinante que posea estos genes. Los plásmidos recombinantes recuperados poseían como inserto solo una parte de la permeasa, lo que sugiere que la expresión de estos genes podrían estar ejerciendo algún efecto tóxico en *E. coli*.

Aislamiento de mutantes en genes relacionados a la biosíntesis de manitol y al balance redox en *F. tropaeoli* CRL 2034

La enzima MDH requiere del cofactor NAD(P)H para convertir fructosa en manitol. En las BL heterofermentativas, el NAD(P)H es producido durante las primeras etapas de fermentación de azúcares y es regenerado a NAD(P)⁺ por las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), en la reducción de piruvato a lactato, y alcohol/aldéido deshidrogenasa, en la conversión de acetilfosfato a etanol, manteniendo así el balance redox de las células. Como se indicó en la Introducción, aunque *F. tropaeoli* es una BL heterofermentativa, carece o es muy baja la actividad de la enzima acetaldehído/alcohol deshidrogenasa (ADH) (Maicas y col., 2002; Endo y col., 2014); por ello su necesidad de utilizar aceptores externos de electrones para oxidar el NAD(P)H a NAD(P)⁺ (Fig. 20).

Para la producción de manitol o sorbitol es necesario modificar las condiciones metabólicas de la célula de manera tal que haya abundancia de NAD(P)H para una eficiente reducción de los azúcares a polioles y mantener así el balance redox NAD(P)H/NAD(P)⁺. Por ello, una estrategia utilizada frecuentemente es bloquear la formación natural de protones como la formación de lactato o etanol en las últimas etapas de la glicólisis (Neves y col., 2002; Viana y col., 2005).

Así, para desviar la vía metabólica del NAD(P)H utilizado en la producción de lactato hacia la producción de manitol, se buscó mutar el/los gen/es lactato deshidrogenasa (*ldh*) presentes en el genoma de CRL 2034. Otro gen que se estableció como blanco a mutar, a fin de determinar su contribución en la biosíntesis de manitol, fue el gen *per*

(fructosa permeasa) que se encuentra formando un operón junto a *mdh* como se mencionó anteriormente.

En la secuencia del genoma de CRL 2034 determinamos la presencia de tres genes que codifican para enzimas con actividad lactato deshidrogenasa (genes *ldh*) y confirmamos la ausencia de un gen con actividad alcohol deshidrogenasa (*adh*). En cuanto a los genes *ldh* encontramos dos genes D-*ldh* (que denominamos *ldh1* y *ldh2*) y uno L-*ldh* (*ldh3*) (Fig. 21), lo que se corresponde con los datos publicados que describen que bacterias de esta la especie producen los isómeros D- y L- del ácido láctico en una relación (9:1) (Endo y col., 2011). Los dos genes D-*ldh* se encuentran en el *contig* 6 del genoma de CRL 2034; son genes homólogos (79 % de identidad) y están organizados en un operón bicistrónico (*ldh1ldh2*). Cada gen D-*ldh* codifica para una proteína de 331 aa, con una identidad entre ellas del 74 % (87 % positivos). A su vez, *ldh3* es un gen monocistrónico que se encuentra en el *contig* 12; su identidad con los genes *ldh1* y *ldh2* es de 27 y 31 %, respectivamente, y codifica para una proteína de 308 aa.

Para generar las mutantes en los genes *ldh* y *per*, se utilizó la misma técnica de simple recombinación usada para el aislamiento de la mutante CRL 2034::*mdh*. Para mutar el gen *per*, se amplificó un fragmento interno del gen (430 pb) utilizando los oligos dPer1 y dPer2; para mutar de los genes *ldh1*, *ldh2* y *ldh3* las regiones internas amplificadas de cada gen fueron, respectivamente, de 464 pb (cebadores Ldh-1-Ft+ Ldh2-Ft), 466 pb (Ldh-3-Ft+ Ldh-2-Ft), y 448 pb (Ldh-4-Ft+ Ldh-5-Ft (ver Tabla de cebadores en Materiales y Métodos). Los fragmentos amplificados se clonaron en el plásmido de inserción pRV300 y una vez recuperados en *E. coli*, los plásmidos recombinantes se electroporaron en células de CRL 2034 electro-competentes. Se aislaron y analizaron las colonias de CRL 2034 resistentes a eritromicina mediante reacciones rep-PCR (Fig. 22) y secuenciación del gen 16S rRNA, para corroborar que las cepas mutantes provenían de la misma cepa parental. A su vez, se corroboró la correcta inserción del plásmido en los genomas de las células mutadas por secuenciación.

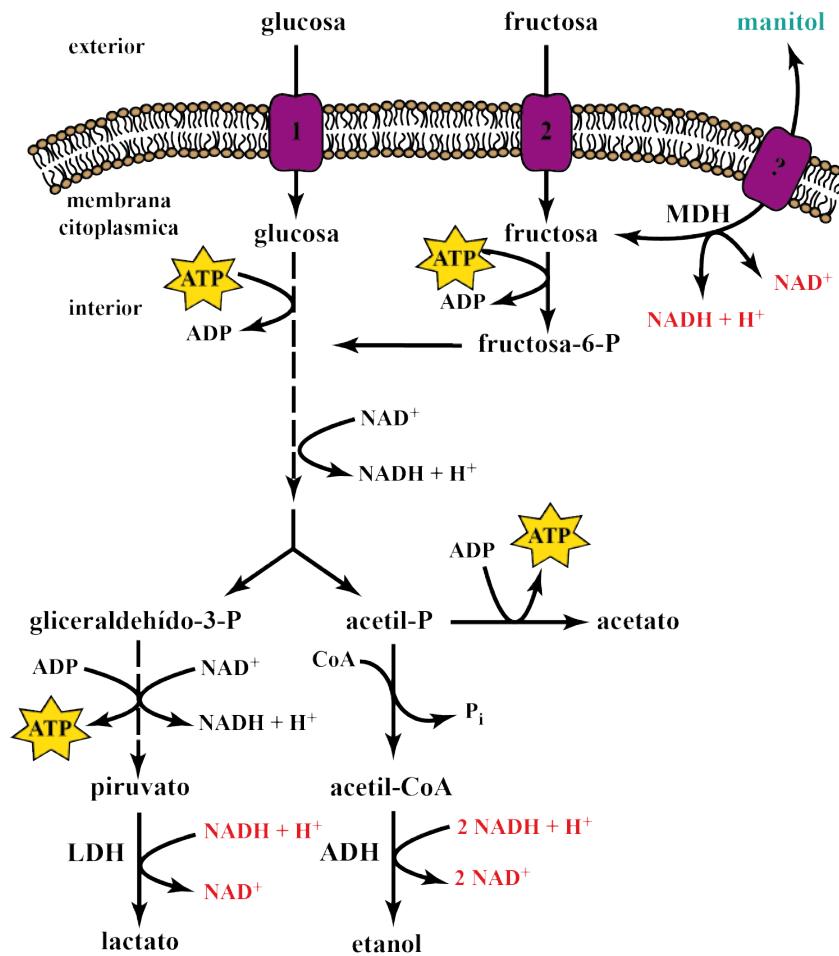


Figura 20. Esquema (simplificado) de la fermentación de hexosas y pentosas en bacterias lácticas heterofermentativas.

Con letra roja se indican las reacciones que regeneran NAD(P)⁺. MDH: manitol deshidrogenasa; LDH: lactato deshidrogenasa; ADH: alcohol deshidrogenasa (ausente en *F. trofaeoli*).

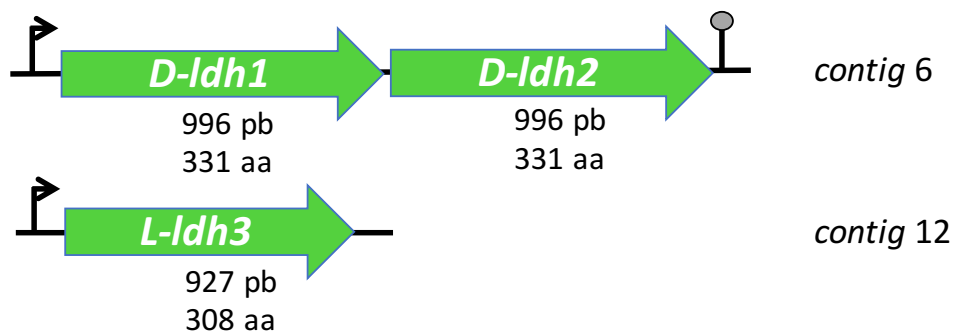


Figura 21. Esquema de los operones *ldh* encontrados en *F. trofaeoli* CRL 2034.

Una vez obtenidas las mutantes CRL 2034::*per*, CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* se realizaron ensayos de actividad MDH con células crecidas en MRS-Fru 2 %, a 30 °C y bajo agitación. Como se observó que CRL 2034::*ldh1* crece más lento que las demás cepas, la toma de muestra en este caso se realizó con células cosechadas durante la fase exponencial tardía, que corresponde a la fase de crecimiento donde la cepa salvaje presenta la mayor actividad.

Los estudios enzimáticos revelaron que la mutante CRL 2034::*ldh1* posee aproximadamente el doble de actividad MDH (7,47 U/mg proteína) que la cepa original (CRL 2034: 4,15 U/mg proteína), mientras no se observó un aumento significativo de la actividad MDH (::*per* 5,35, ::*ldh2* 5,27, ::*ldh3* 4,90 U/mg proteína) con las otras mutantes (Fig. 23).

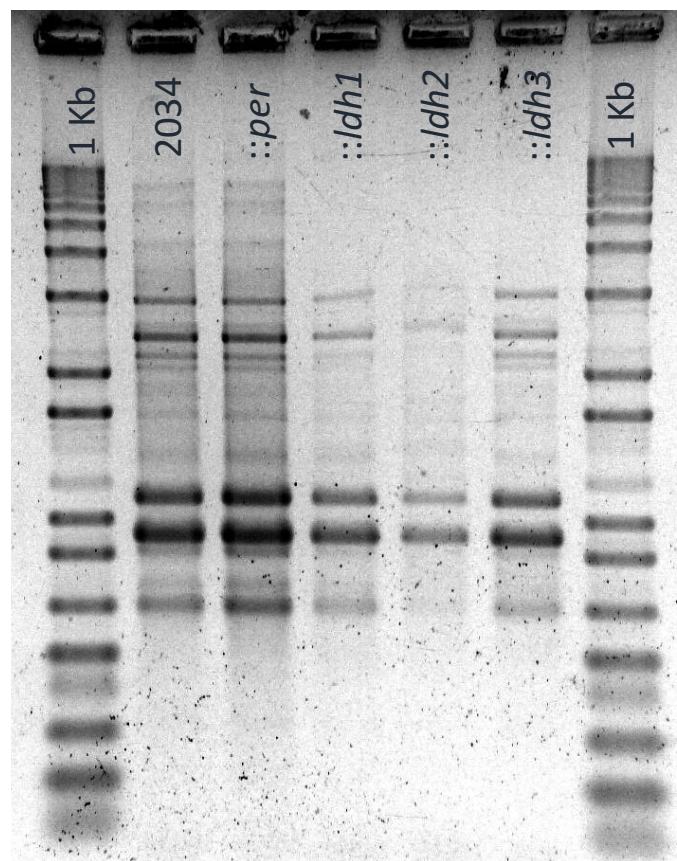


Figura 22. Gel de agarosa que muestra los perfiles de rep-PCR de las cepas CRL 2034 y sus mutantes CRL 2034::*per*, CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3*. 1 Kb, marcador de peso molecular.

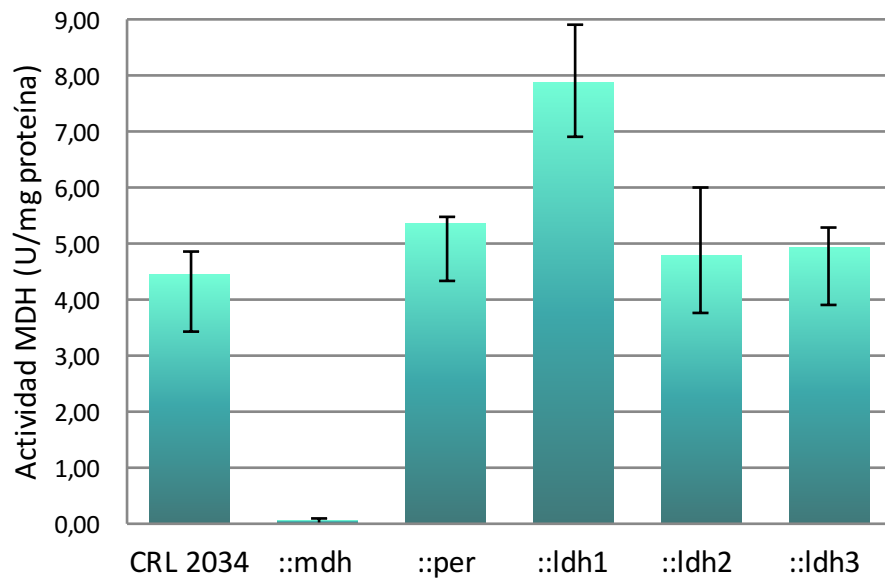
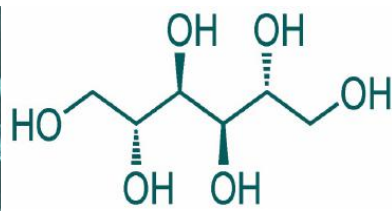
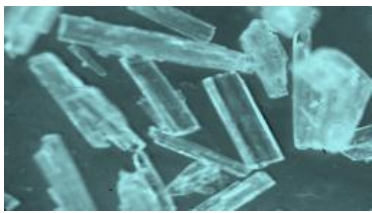


Figura 23. Actividad específica de MDH de la cepa CRL 2034 y sus mutantes CRL 2034::*per*, CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3*.



CAPÍTULO 2:

Crecimiento y actividades enzimáticas relacionadas
con la producción de manitol por *Fructobacillus*
tropaeoli CRL 2034 y sus mutantes

CAPÍTULO 2: Crecimiento y actividades enzimáticas relacionadas con la producción de manitol por *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034 y sus mutantes

Introducción

Ciertas BL, en particular de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, se han utilizado como microorganismos productores de una diversidad de compuestos incluyendo compuestos químicos, ingredientes alimenticios, nutracéuticos y otros metabolitos de alto valor. La comprensión de las vías celulares combinadas con la disponibilidad de herramientas genéticas permite el cambio deliberado y racional del metabolismo primario en BL y, en consecuencia, la generación de fábricas celulares para la producción de plataformas y bioquímicos de alto valor a través de la ingeniería metabólica (Gaspar y col., 2013).

En este capítulo presentamos los análisis microbiológico y enzimático comparativos realizados entre la cepa *F. tropaeoli* CRL 2034 y sus mutantes (obtenidas como se describe en el capítulo 1), con el fin de determinar la contribución de los genes mutados en el metabolismo de manitol de CRL 2034. Esta información permitirá sentar las bases moleculares para utilizar esta cepa como fábrica celular de manitol.

Resultados

Se realizaron estudios comparativos entre la cepa original y sus mutantes CRL 2034::*mdh*, CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2*, CRL 2034::*ldh3*, y CRL 2034::*per* con respecto al crecimiento de las mismas en los medios MRS y MRS-Fru, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Además, se comparó el crecimiento a 30 °C de todas las cepas (CRL 2034 y mutantes) en medio FYP con glucosa 20 % y fructosa 40 %, incubadas en condición estática y agitada (200 r.p.m.). Se determinaron los parámetros cinéticos (velocidad máxima de crecimiento y de acidificación), actividades enzimáticas MDH y LDH, consumo de azúcares y producción de manitol y ácido láctico. Estos estudios nos permitieron predecir la contribución de las funciones genéticamente modificadas en la eficiencia de producción de manitol por la cepa CRL 2034.

Análisis comparativo de los fenotipos de las mutantes aisladas

Mutante *mdh*⁻

Como se indicó, *F. tropeoli* sólo crece en presencia de glucosa si un aceptor externo de electrones (i.e., fructosa) se encuentra presente en el medio de cultivo. Así, la mutante aislada CRL 2034::*mdh*, deficiente en actividad MDH, no podría utilizar la fructosa como aceptor externo de electrones y necesitaría de un aceptor alternativo de electrones (i.e, el O₂) para crecer en un medio que contenga glucosa + fructosa. Los resultados presentados en la Fig. 24 confirman esta predicción. Cuando las cepas CRL 2034 (control) y CRL 2034::*mdh*, crecidas a 30 °C en caldo MRS-Fru con una agitación de 200 r.p.m., fueron diluidas y sembradas en medios agarizados de MRS y MRS-Fru, solo la cepa CRL 2034 fue capaz de crecer (en todas las diluciones realizadas) en el medio MRS-Fru en condiciones anaeróbicas, utilizando en este caso a la fructosa como aceptor de electrones (Fig. 24B). En la Fig. 24, se observa que ambas cepas crecieron en medio MRS en condiciones aeróbicas, pero no lo hacen en condiciones anaeróbicas (ausencia de aceptor externo de electrones). En cambio la cepa CRL 2034::*mdh* solo crece en aerobiosis y no en anaerobiosis (Fig. 24B; usando O₂ como aceptor de electrones externos), a pesar de estar disponible la fructosa.

La dependencia del O₂ para el crecimiento de la cepa CRL 2034::*mdh* también se puede observar en medio líquido usando tubos de poco volumen (poco aire disponible) y con agitación suave. En la Fig. 25 se muestra el crecimiento en caldo de las cepas CRL 2034 y CRL 2034::*mdh* en medio MRS-Fru incubadas a 30 °C y 120 r.p.m. durante 10 h. Mientras la cepa CRL 2034 presenta un crecimiento homogéneo en todo el tubo, la cepa CRL 2034::*mdh* crece solo en la parte superior del tubo (superficie con mayor columna de oxígeno). Los resultados observados, tanto en medio líquido como en medio sólido, confirman el fenotipo esperado de la mutante CRL 2034::*mdh* y contribuyen a reafirmar que el gen mutado es el único gen del genoma de *F. tropeoli* CRL 2034 comprometido en la conversión de fructosa a manitol en las condiciones ensayadas.

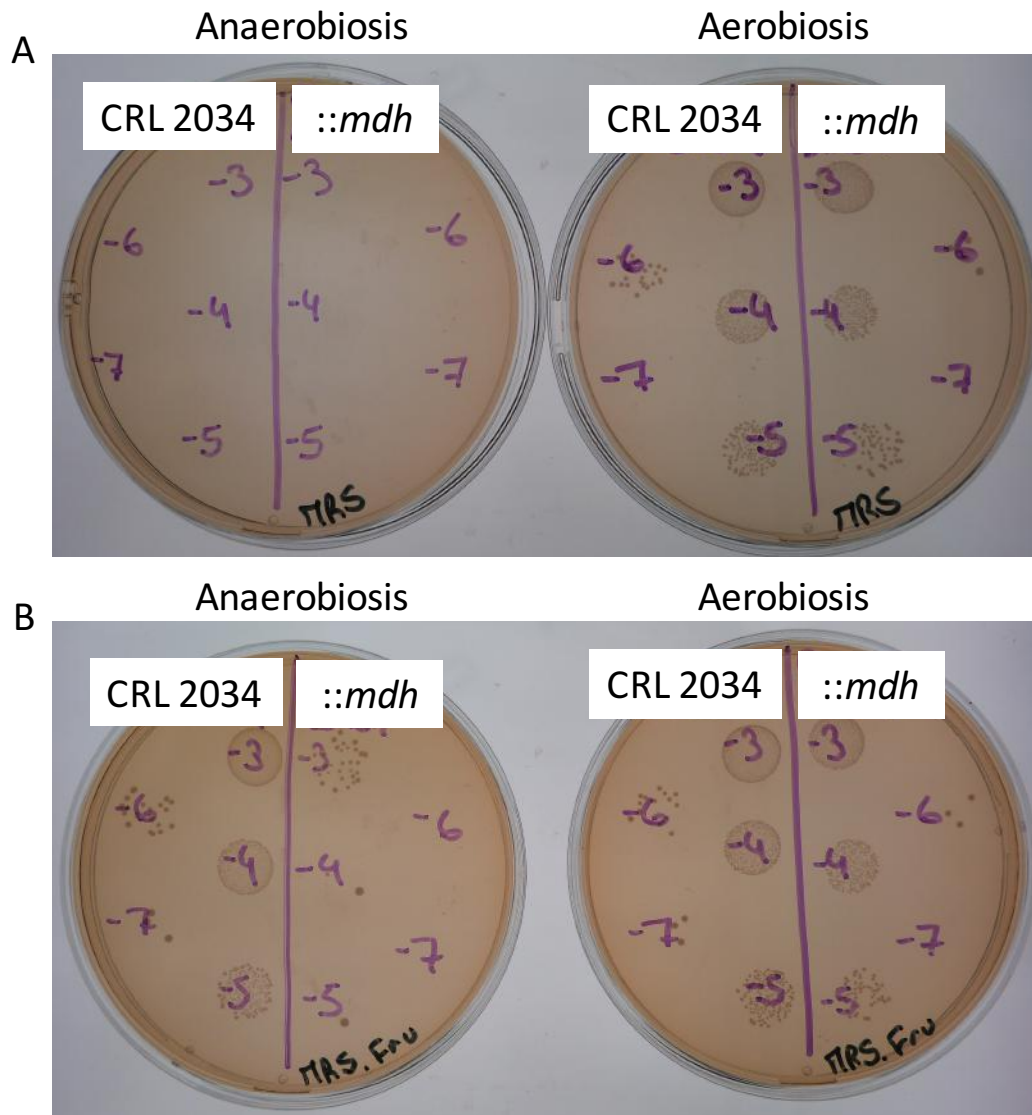


Figura 24. Crecimiento de *F. trofaeoli* CRL 2034 y CRL 2034::*mdh* en condiciones anaeróbicas y aeróbicas en medio MRS (A) y MRS-Fru (B).

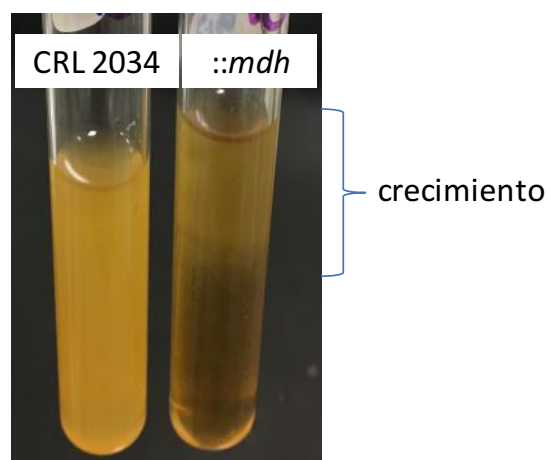


Figura 25. Crecimiento de *F. trofaeoli* CRL 2034 y CRL 2034::*mdh* en tubos con caldo MRS-Fru incubados a 30 °C con agitación suave.

Mutantes CRL 2034::*per*, CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3*

A diferencia de CRL 2034::*mdh*, las mutantes CRL 2034::*per*, CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* no mostraron una dependencia de oxígeno para su crecimiento. Se observó que las mutantes CRL 2034::*per*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* se comportaban fenotípicamente como la cepa control en medio MRS-Fru. Sin embargo, CRL 2034::*ldh1* mostró diferencias en el tamaño de sus colonias con respecto a la cepa parental y a las demás mutantes. En la Fig. 26A se observa una placa de MRS-Fru sembrada con las mutantes CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* incubadas a 30 °C por 48 h. Se puede apreciar que la colonia de la cepa CRL 2034::*ldh1* es mucho más pequeña que la de las otras cepas. Además al microscopio óptico, la mutante *ldh1* muestra células más delgadas y alargadas con respecto a la cepa parental (Fig. 26B).

Cuando se compararon las células CRL 2034 y CRL 2034::*ldh1* mediante microscopía electrónica de transmisión (Fig. 27), se observó la presencia de invaginaciones (posiblemente mesosomas) en las células de la cepa mutante (Fig. 27 C y D), estructuras membranosas no observadas en las células de *F. trophaeoli* CRL 2034. Además, se midió el espesor de la pared celular, encontrándose que el promedio del espesor de las paredes celulares de la cepa CRL 2034::*ldh1* es más gruesa (16,82 nm ± 0,14) que las de las células de la cepa CRL 2034 (15,66 nm ± 0,80).

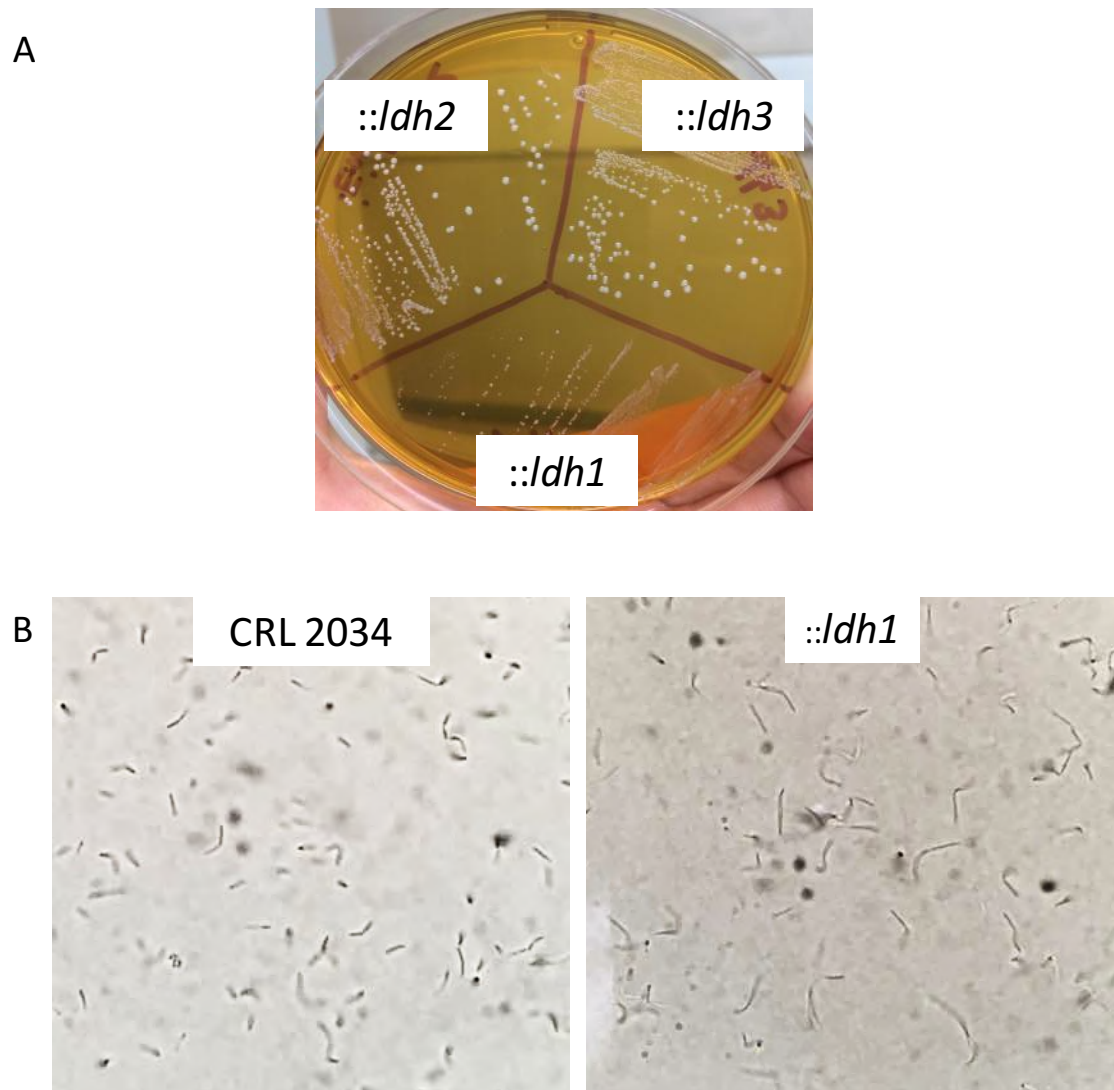
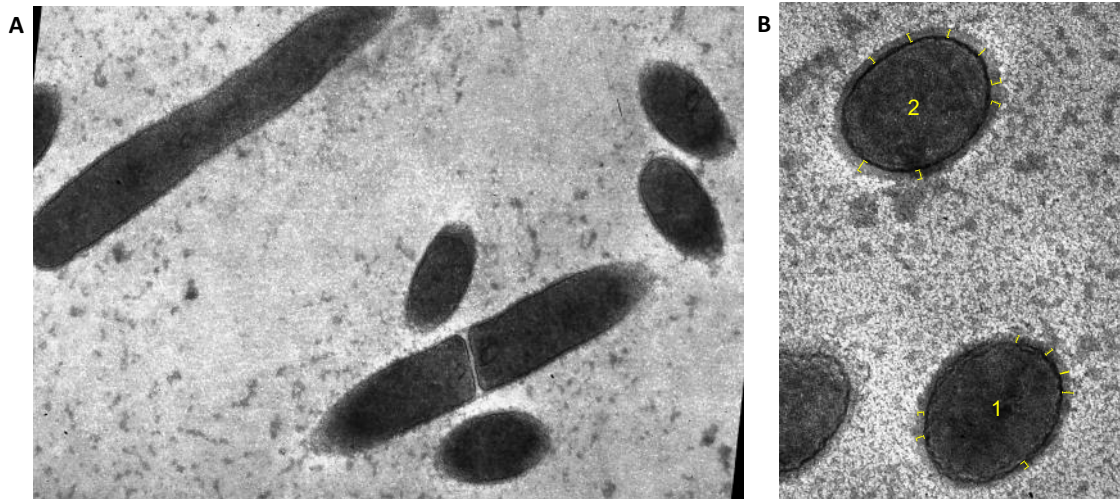


Figura 26. Fenotipos distintivos de la mutante *ldh1*.

(A) Colonias de las mutantes CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* crecidas en MRS-Fru a 30 °C durante 48 h; (B) Morfología celular de *F. trofaeoli* CRL 2034 y CRL 2034::*ldh1* crecidas en FYP a 30 °C durante 16 h al microscopio óptico (1000 X).

CRL 2034



::*ldh1*

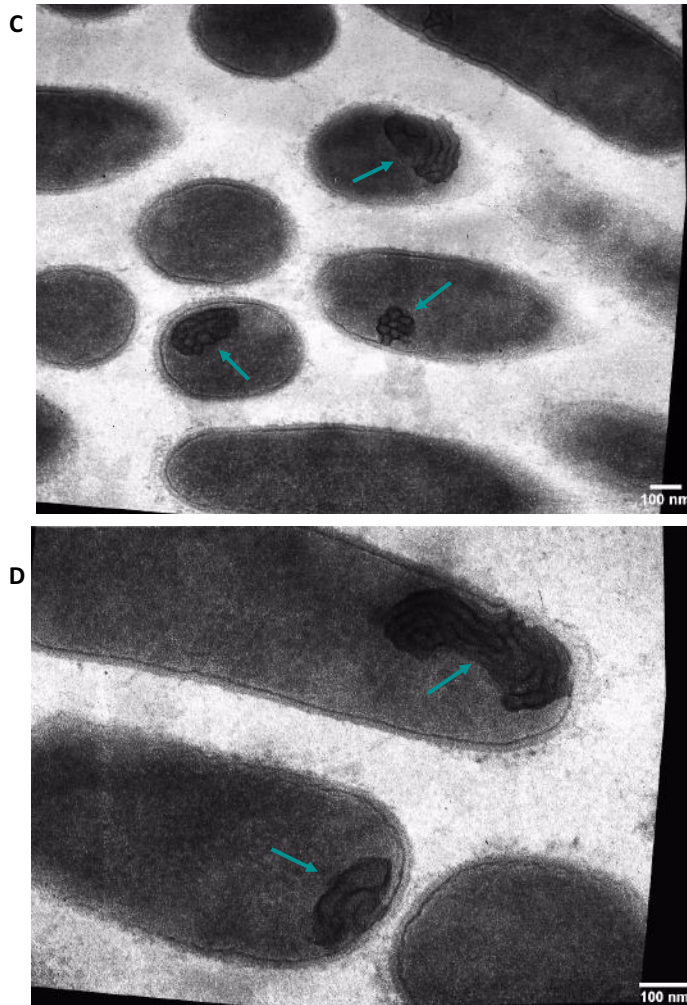


Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células de *F. trophaeoli* CRL 2034 (A 22800 X y B 34300 X) y CRL 2034::*ldh1* (C 34300 X y D 56600 X) crecidas en FYP a 30 °C durante 16 h.

En B se indica como se tomaron las medidas de la pared. En C y D se muestran con flechas las estructuras membranosas encontradas.

Características del crecimiento celular en condición estática y agitada

Como se indicó, los estudios cinéticos de crecimiento de las cepas en estudio se realizaron en medio FYP (glu 20 % y fru 40 %), a 30 °C, y en condición estática o con agitación 200 r.p.m. Se determinaron los valores de DO_{600nm} , $\log UFC/mL$ y pH (Fig. 28). En todas las condiciones ensayadas, el comportamiento de las cepas CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* fue similar al de la cepa parental por lo que no se muestran los resultados obtenidos.

Cultivo Estático

En cultivo estático (sin agitación), la cepa CRL 2034::*mdh* no mostró crecimiento confirmando la necesidad de esta cepa de un aceptor externo de electrones distinto a la fructosa. Respecto al resto de las cepas, el comportamiento de las cepas CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* fue similar al de la cepa parental (no mostrado). Sin embargo, los valores de DO_{600nm} como los de $\log UFC/mL$ de la cepa CRL 2034 fueron más elevados (mayor crecimiento) que los observados para las mutantes CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1* (Fig. 28; estático). Se observa también que la cepa CRL 2034::*ldh1* posee una fase lag más prolongada que los de las cepas CRL 2034 y CRL 2034::*per*. El crecimiento de la mutante CRL 2034::*per* es mayor que la mutante *ldh1* hasta las 16 h de incubación, pero menor en todos los puntos comparado con la cepa parental. En cuanto al pH, se observó que la cepa control disminuye el pH más rápidamente que el resto de las cepas en estudio, seguido por la cepa CRL 2034::*per* y finalmente la cepa CRL 2034::*ldh1*; sin embargo, los valores finales de pH de todas las cepas estudiadas fueron similares (aproximadamente de 3,5).

En la Tabla 7 se incluyen los valores de velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max} , h^{-1}) y la velocidad máxima de acidificación calculadas mediante la aplicación de las ecuaciones descritas en Materiales y Métodos durante la fase de crecimiento exponencial. A pesar de las diferencias observadas en la Fig. 28, los valores en Tabla 7 indican que no hay diferencias significativas en las velocidades máximas de crecimiento y de acidificación, cuando se determinan dichos parámetros en las fases

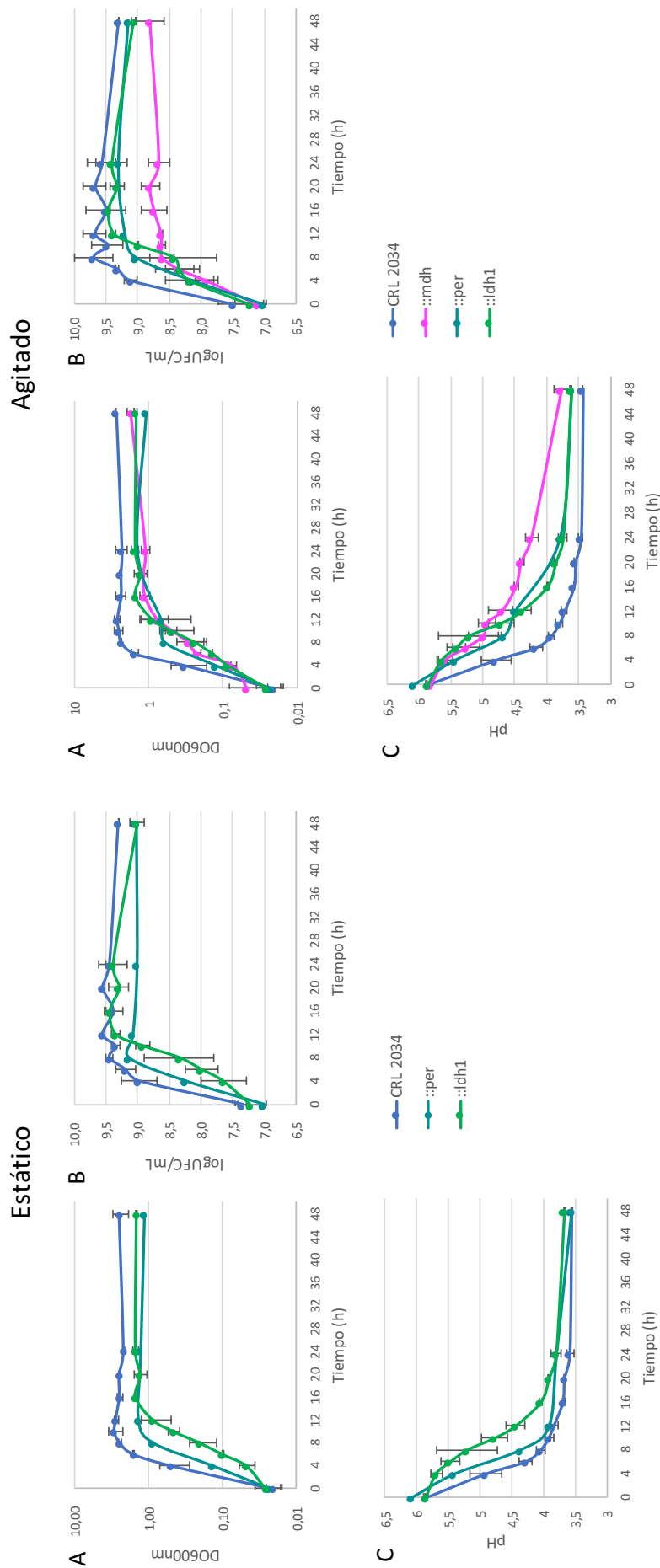


Figura 28. Cinética de crecimiento de *F. trophaeoli* CRL 2034 y sus mutantes cultivadas en medio FYP a 30 °C, en condición estática y agitación. A) DO_{600nm}, B) logUFC/mL, C) pH

de crecimiento exponencial. Sin embargo, la mutante que presentó menor velocidad máxima de acidificación fue la cepa CRL 2034::*ldh1* (0,20), cepa que tiene mutada uno de los genes responsables de la producción de ácido láctico. Los valores también destacan que las mediciones de estas velocidades se hicieron en distintos tiempos: para la cepa control, las velocidades máximas de crecimiento y acidificación se tomaron entre las 0 y 4 h; en el caso de la mutante en el gen permeasa, entre las 4 y las 8 h; y finalmente, para la mutante *ldh1*⁻, hubo un desfase entre la velocidad máxima de crecimiento (entre las 8 a 12 h) y la de acidificación (entre las 6 y 10 h).

Cultivo Agitado

Como se muestra en la Fig. 28, y al igual que lo observado en la condición estática, la cepa que presentó mejor crecimiento fue CRL 2034. Los valores de DO_{600nm} de las tres mutantes (CRL 2034::*mdh*, CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1*) fueron similares, aunque más bajos que los de la cepa control. Respecto al conteo celular, los valores de las mutantes CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1* fueron similares, aunque menores a los de CRL 2034 (9,30 log UFC/mL), mientras los valores más bajos de UFC/mL fueron los de la cepa ::*mdh*. En cuanto al potencial de acidificación, CRL 2034 fue la más acidificante, seguida por las cepas CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1*. La capacidad acidificante de la mutante CRL 2034::*mdh* fue muy limitada, alcanzando valores de pH= 4 a las 32 h de cultivo (versus 8 h de CRL 2034).

A pesar de observar diferencias en el crecimiento y que el valor de la velocidad de crecimiento de las cepas CRL 2034::*mdh* (0,53 h⁻¹) y CRL 2034::*per* (0,78 h⁻¹) son menores que el control (0,94 h⁻¹), los valores de μ_{\max} no presentaron diferencias significativas. En cambio, todas las mutantes analizadas presentaron valores significativamente menores de velocidad máxima de acidificación comparada con la cepa control (Tabla 7), siendo la mutante *ldh1*⁻ la que menor valor presentó (0,14), repitiéndose lo observado en la condición estática.

De igual forma que en la condición estática, los parámetros cinéticos se calcularon a distintos tiempos de incubación. La velocidad máxima de crecimiento para *F. trofaeoli* CRL 2034 y CRL 2034::*per* se determinaron entre las 0 y 4 h; para la cepa CRL

2034::*mdh* entre las 4 a 6 h y finalmente, para la cepa::*ldh1* entre las 6 y 10 h (esta cepa fue la de crecimiento más lento). Respecto a la velocidad máxima de acidificación, para la cepa CRL 2034 se determinó entre las primeras 6 h de crecimiento, mientras que para las cepas CRL 2034::*mdh*, CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1* entre las 4 y 8 h.

Tabla 7. Velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) y acidificación para *F. tropaeoli* CRL 2034 y sus mutantes crecidas en caldo FYP a 30 °C.

En condición estática

Cepa	Velocidad Máxima de Crecimiento (h^{-1})	Velocidad Máxima de Acidificación
CRL 2034	$0,94 \pm 0,20^A$ (0 a 4 h)	$0,32 \pm 0,06^A$ (0 a 4 h)
::<i>per</i>	$0,85 \pm 0,11^A$ (4 a 8 h)	$0,24 \pm 0,01^A$ (4 a 8 h)
::<i>ldh1</i>	$1,13 \pm 0,10^A$ (8 a 12 h)	$0,20 \pm 0,07^A$ (6 a 10 h)

En condición agitada

Cepa	Velocidad Máxima de Crecimiento (h^{-1})	Velocidad Máxima de Acidificación
CRL 2034	$0,94 \pm 0,20^A$ (0 a 4 h)	$0,33 \pm 0,04^B$ (0 a 6 h)
::<i>mdh</i>	$0,53 \pm 0,16^A$ (4 a 6 h)	$0,19 \pm 0,01^A$ (4 a 8 h)
::<i>per</i>	$0,78 \pm 0,29^A$ (0 a 4 h)	$0,22 \pm 0,03^A$ (4 a 8 h)
::<i>ldh1</i>	$1,00 \pm 0,28^A$ (6 a 10 h)	$0,14 \pm 0,01^A$ (4 a 8 h)

Los valores entre paréntesis indican las horas en que se determinaron los valores de velocidad máxima de crecimiento y acidificación para cada cepa.

Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$); las comparaciones entre las condiciones estudiadas se realizaron mediante el análisis de la varianza (one-way ANOVA) seguido de la prueba de Tukey HSD.

Actividades MDH y LDH

Los valores obtenidos de actividad MDH de las cepas en estudio se muestran en la Fig. 29 y se expresan como unidades enzimáticas por mg de proteína (actividad específica). Con el objetivo que todas se encuentren en la misma fase de crecimiento, se utilizaron

extractos libres de células a las 8 h para las cepas CRL 2034, CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*per* y de 16 h para la cepa CRL 2034::*ldh1*.

La mutante CRL 2034::*ldh1* mostró los mayores valores, estadísticamente significativos, en ambas condiciones (7,88 y 6,49 U/mg de proteína en condiciones estática y agitada, respectivamente) comparados con los valores MDH del control (5,46 y 4,29 U/mg de proteína, condiciones estática y agitada, respectivamente). Los valores MDH de la mutante CRL 2034::*per* no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa parental. Finalmente, la cepa CRL 2034::*mdh* no presentó actividad MDH en la condición ensayada. Se observa además una tendencia de menor actividad MDH cuando las cepas se incuban bajo agitación, lo que podría deberse a que el oxígeno presente puede ser utilizado como aceptor de electrones, reemplazando a la fructosa como tal.

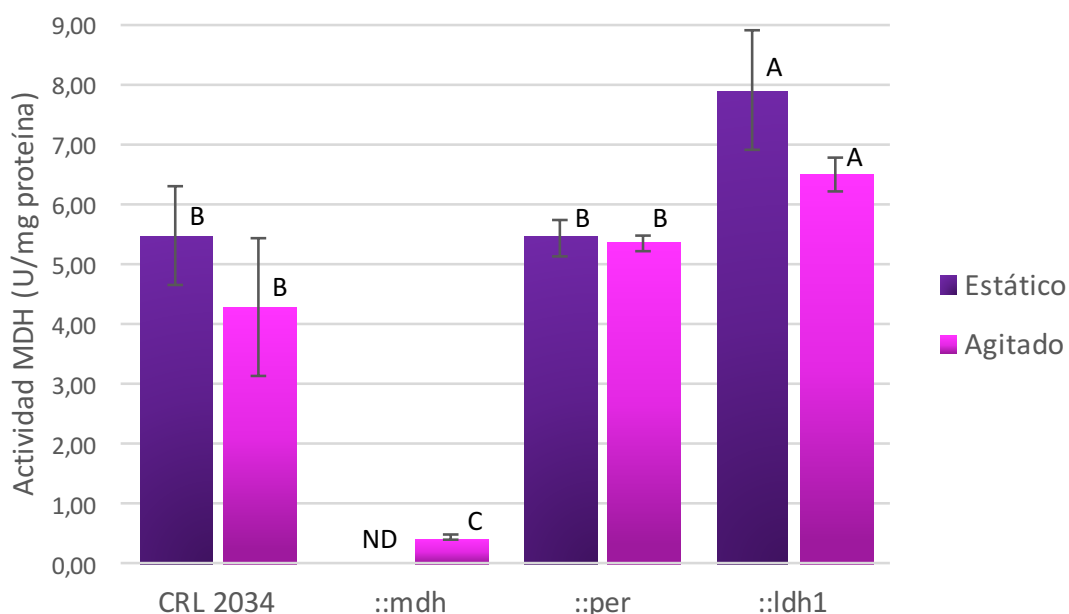


Figura 29. Actividad MDH de *F. tropeoli* CRL 2034 y sus mutantes crecidas en caldo FYP a 30 °C bajo condiciones estática y agitada.

Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$); las comparaciones entre las condiciones estudiadas se realizaron mediante el análisis de la varianza (one-way ANOVA) seguido de la prueba de Tukey HSD.

En la Fig. 30 se muestran los valores de actividad LDH de las cepas estudiadas evaluados en los extractos celulares usados para determinar actividad MDH. Como era

de esperar, la cepa que menor actividad LDH presentó fue la mutante CRL 2034::*ldh1* (3,05 y 3,45 U/mg de proteína en condiciones estática y agitada, respectivamente), valores significativamente menores que los detectados en la cepa control, que fueron de 5,83 y 6,71 U/mg de proteína en las mismas condiciones. Es importante recordar que la cepa CRL 2034 posee tres genes *ldh*, por lo que los valores detectados en la mutante CRL 2034::*ldh1* corresponden a la actividad LDH de los otros genes *ldh* no mutados.

Los valores de LDH detectados en las mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*per* no fueron significativamente diferentes a la actividad LDH de CRL 2034, lo que sugiere que la menor capacidad acidificante observada en estas mutantes no puede atribuirse a la actividad LDH.

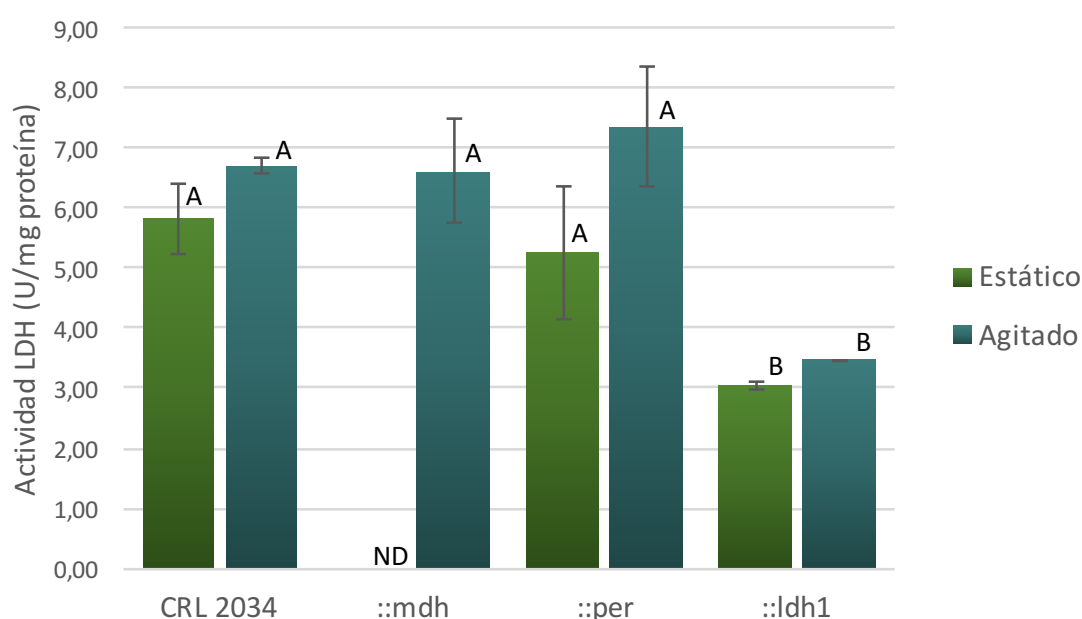


Figura 30. Actividad LDH de *F. trophaeoli* CRL 2034 y sus mutantes crecidas en caldo FYP a 30 °C en condiciones estática y agitada.

Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$); las comparaciones entre las condiciones estudiadas se realizaron mediante el análisis de la varianza (one-way ANOVA) seguido de la prueba de Tukey HSD.

Consumo de azúcares, producción de manitol y ácidos orgánicos

Se determinó el consumo de los azúcares (glucosa y fructosa) presentes en el medio FYP.Fru, y la producción de manitol y ácidos orgánicos por las cepas en estudio. La

determinación de estos componentes se realizó por HPLC como se describió antes (Materiales y Métodos).

Producción de manitol, ácido láctico y ácido acético

En la Tabla 8 se presenta el consumo de azúcares y producción de manitol, ácido láctico, ácido acético y etanol (expresados en mM) detectados a las 48 h de cultivo bajo condiciones estática y agitada. Los valores detectados para las cepas CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* fueron similares a los observados para la cepa CRL 2034, por lo que no se incluyen los mismos en el análisis.

En primer lugar, se observa que la glucosa originalmente presente en el medio de cultivo (177 mM) no es completamente consumida por ninguno de las cepas, alcanzando un nivel de consumo final entre 96-105 mM. Respecto a la fructosa, solo con *F. tropeoli* CRL 2034 se observa un consumo total de este azúcar en condición estática, lo que se traduce en la máxima producción de manitol (201 mM) de todas las condiciones ensayadas. En general, las mutantes consumen menos fructosa que la cepa CRL 2034; sin embargo, la diferencia de consumo de este azúcar, entre condiciones estática y agitada, es mucho menor en las mutantes que para la cepa CRL 2034 (232 mM en condición estática versus 187 mM en condiciones de agitación). Por el contrario, en la mutante CRL 2034::*per* se observa incluso un consumo de fructosa mayor en condiciones de agitación (191 mM).

En cuanto a los metabolitos producidos, los mayores niveles de síntesis correspondieron a manitol respecto a los ácidos láctico y acético con todas las cepas (a excepción de la cepa CRL 2034::*mdh*). Se detectó etanol solo en los cultivos de las mutantes CRL 2034::*mdh* y ::*per* aunque en bajas cantidades. La fructosa consumida no fue totalmente convertida a manitol en las cepas CRL 2034::*mdh*, CRL 2034::*ldh1* y CRL 2034::*per*, por lo que una parte estaría siendo fermentada a los ácidos láctico y acético. La producción de estos ácidos siempre fue mayor en la condición agitada que en estática; a su vez, la menor relación ácido láctico:ácido acético siempre fue menor en la mutante CRL 2034::*ldh1*. En las mutantes, el total de los metabolitos

Tabla 8. Consumo de azúcares y producción de manitol, ácido láctico, ácido acético y etanol (en mM) por las cepas *F. tropaeoli* CRL 2034 y sus mutantes crecidas en medio FYP* a 30 °C luego de 48 h de incubación bajo condiciones en cultivos estáticos y agitados.

Cepa	Consumo (mM)				Producción (mM)				Consumo – Producción	Ác. láctico: Ác. acético: Etanol
	Fructosa	Glucosa	Azúcares totales	Manitol	Ác. láctico	Ác. acético	Etanol	Total		
	CRL 2034	232,02	105,39	337,41	201,02	70,62	74,90	346,54		
::<i>mdh</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24,62	0,8:0,9:0,3	
::<i>per</i>	181,45	108,72	290,17	153,70	46,24	51,87	265,55	6,49	0,9:1,1:0,0	
::<i>ldh1</i>	184,34	90,39	274,73	152,44	50,01	65,79	268,24			

Cepa	Consumo (mM)				Producción (mM)				Consumo – Producción	Ác. láctico: Ác. acético: Etanol
	Fructosa	Glucosa	Azúcares totales	Manitol	Ác. láctico	Ác. acético	Etanol	Total		
	CRL 2034	186,83	96,11	282,94	171,10	59,99	81,17	312,26		
::<i>mdh</i>	170,07	103,11	273,18	39,08	34,55	52,49	145,81	127,37	0,6:1,0:0,4	
::<i>per</i>	191,00	103,67	294,67	111,98	38,92	53,45	219,14	75,54	0,7:1,0:0,3	
::<i>ldh1</i>	163,80	100,44	264,24	119,67	25,67	36,38	181,72	82,52	0,8:1,2:0,0	

ND: No Determinado

Ác. láctico: Ác. acético: Etanol: expresa la relación molar entre estos componentes

*Azúcar inicial en el medio FYP: 237,72 mM de fructosa y 172,72 mM de glucosa

Tabla 9. Producción total de ácido láctico de D- y L- láctico crecidos en medio FYP a 30 °C luego de 48 h por *F. tropaeoli* CRL 2034 y sus mutantes en cultivos estático y agitado.

Cultivo Estático				
	Ácido láctico (g/L) *	D-láctico (g/L)	L-láctico (g/L)	D:L
CRL 2034	6,36 ± 0,67 ^B	5,62 ± 0,25 ^B	0,87 ± 0,11 ^B	8,7:1,3
::<i>ldh1</i>	4,50 ± 0,15 ^A	2,05 ± 0,41 ^A	1,15 ± 0,00 ^C	6,4:3,6
::<i>ldh2</i>	5,78 ± 0,53 ^B	4,96 ± 0,02 ^B	0,52 ± 0,17 ^B	9,1:0,9
::<i>ldh3</i>	6,26 ± 0,18 ^B	5,94 ± 0,32 ^B	0,06 ± 0,08 ^A	9,9:0,1

Cultivo Agitado				
	Ácido láctico (g/L) *	D-láctico (g/L)	L-láctico (g/L)	D:L
CRL 2034	5,40 ± 0,35 ^B	5,32 ± 0,05 ^B	0,69 ± 0,13 ^B	8,9:1,1
::<i>ldh1</i>	2,31 ± 0,87 ^A	2,64 ± 0,02 ^A	1,16 ± 0,08 ^C	6,9:3,1
::<i>ldh2</i>	6,18 ± 0,67 ^B	5,91 ± 0,38 ^B	0,67 ± 0,24 ^B	9,0:1,0
::<i>ldh3</i>	5,59 ± 0,43 ^B	5,44 ± 0,32 ^B	0,11 ± 0,09 ^A	9,8:0,2

* Ácido láctico total medido mediante HPLC. Los isómeros D- y L- láctico se determinaron determinados con kit enzimático

determinados en la condición agitada fue menor al total de los azúcares consumidos. Esto sucede principalmente en la cepa CRL 2034::*mdh*, donde de los 273 mmoles de azúcares consumidos en condiciones de agitación, solo se detectaron 146 mmoles de metabolitos, por lo que casi el 50 % (127 mmoles) de los azúcares consumidos estarían siendo utilizados en la producción de biomasa, CO₂ o algún otro metabolito no determinado.

Por último, es importante mencionar que se detectó bajas cantidades de etanol en las mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*per*; y bajos niveles de manitol en la mutante CRL 2034::*mdh* en cultivos crecidos en agitación.

Ácido D- y L- láctico

Se evaluó también la producción de los isómeros D- y L- del ácido láctico para detectar modificaciones en la relación D-:L- al generar las mutantes en los distintos genes *ldh*. Las mediciones de estos valores se determinaron en los mismos tiempos de incubación que los estudios previamente descritos.

En la Tabla 9 se detalla el total de ácido láctico y se diferencia la cantidad de los isómeros D- y L- láctico obtenidos por la cepa CRL 2034 y las cepas mutantes CRL 2034::*ldh1*, CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3*. Las mutantes CRL 2034::*mdh* y ::*per* no mostraron diferencias en las relaciones con respecto al control (datos no mostrados).

Se observa que la cepa CRL 2034::*ldh1* es la única que presenta menor producción total de ácido láctico en ambas condiciones ($4,50 \pm 0,15$ y $2,31 \pm 0,87$ g/L, en condiciones estática y agitada, respectivamente) presentando valores significativamente diferentes a los obtenidos con el control ($6,36 \pm 0,67$ y $5,40 \pm 0,35$ g/L en condición estática y agitada, respectivamente). Los valores observados en las mutantes CRL 2034::*ldh2* y ::*ldh3* son similares a los detectados en CRL 2034, lo que indica que las mutaciones en los genes *ldh2* y *ldh3* no modifican significativamente la producción de ácido láctico total en estas cepas. Sin embargo, cuando se analizan los valores de los isómeros D- y L- láctico se observan diferencias en las relaciones obtenidas. La especie *F. trofaeoli* produce durante la fermentación de la glucosa ácidos D- y L- láctico en una relación 9:1 (Endo y col., 2011); esta relación se encontró

en la cepa parental y en la mutante CRL 2034::*ldh2*, no así en las mutantes CRL 2034::*ldh1* y CRL 2034::*ldh3*. En la cepa CRL 2034::*ldh1* la relación es 6,4:3,6 y 6,9:3,1 y en la cepa CRL 2034::*ldh3* la relación es 9,9:0,1 y 9,8:0,2 en las condiciones de cultivo estático y agitado, respectivamente. Estos resultados demuestran que la mutación en el gen *ldh1* está modificando la relación D:L y favoreciendo la producción de ácido L-láctico; en el caso de la mutación del gen *ldh3* favorece aún más la producción de ácido D-láctico, mostrando la ausencia de una enzima racemasa o solo una racemasa dependiente del isómero L-láctico.

Producción de manitol, rendimiento y producción específica

En la Tabla 10 se observan los consumos de glucosa y fructosa y la producción de manitol (en g/L) tanto en la condición estática como agitada luego de 48 h de cultivo. También se presentan los rendimientos de manitol en función de la fructosa consumida y la fructosa inicial en el medio de cultivo y la producción específica de manitol por unidad formadora de colonia.

En condiciones de cultivo estático se observó que el consumo de glucosa fue similar entre las tres cepas estudiadas (CRL 2034 = $18,97 \pm 0,41$ g/L; CRL 2034::*per* = $19,57 \pm 0,87$ g/L; y CRL 2034::*ldh1* = $16,27 \pm 1,17$ g/L); por el contrario, el consumo de fructosa fue diferente entre la cepa parental y las mutantes correspondiendo valores de $41,80 \pm 0,04$ g/L a *F. tropeoli* CRL 2034 y de $32,69 \pm 1,50$ y $33,21 \pm 0,47$ g/L de fructosa consumida a las cepas : CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1*, respectivamente.

A pesar que la producción de manitol y el rendimiento respecto a la fructosa inicial fue mayor con CRL 2034 ($37,62 \pm 0,85$ g/L y 85,74 %, respectivamente) comparado con los valores de las mutantes (::i>per = $28 \pm 1,04$ g/L y 69,05 %; ::i>ldh1 = $27,77 \pm 0,81$ g/L y 64,95 %, respectivamente), el rendimiento con respecto a la fructosa consumida (Y_M) fue levemente superior para la cepa parental respecto a las mutantes (87,61-83,62 %). Sin embargo, la producción específica de manitol por UFC fue mayor en la mutante CRL 2034::*ldh1* ($1,99 \times 10^{-8}$ mg/UFC) con respecto al control ($1,64 \times 10^{-8}$ mg/UFC) y a la mutante CRL 2034::*per* ($1,49 \times 10^{-8}$ mg/UFC).

Tabla 10. Consumo de azúcares, producción y rendimiento de manitol por *F. tropaeoli* CRL 2034 y sus mutantes crecidas en medio FYP a 30 °C luego de 48 h bajo condiciones estática y de cultivo agitado.

		Cultivo Estático 48 h					
Cepa	Consumo (g/L)		Producción (g/L)		Rendimiento		Producción Específica
	Glucosa	Fructosa	Manitol	Y _M =P/S (%)	Y=P/T (%)	Y _{MU} =P/X (mg/UFC)	
CRL 2034	18,97 ± 0,41 ^A	41,80 ± 0,04 ^B	36,62 ± 0,85 ^B	87,61	85,74	1,64 X 10 ⁻⁸	
::<i>mdh</i>	ND	ND	ND	-	-		
::<i>per</i>	19,57 ± 0,87 ^A	32,69 ± 1,50 ^A	28,00 ± 1,04 ^A	85,65	69,05	1,49 X 10 ⁻⁸	
::<i>ldh1</i>	16,27 ± 1,17 ^A	33,21 ± 0,47 ^A	27,77 ± 0,81 ^A	83,62	64,97	1,99 X 10 ⁻⁸	

		Cultivo Agitado 48 h					
Cepa	Consumo (g/L)		Producción (g/L)		Rendimiento		Producción Específica
	Glucosa	Fructosa	Manitol	Y _M =P/S (%)	Y=P/T (%)	Y _{MU} =P/X (mg/UFC)	
CRL 2034	17,30 ± 1,54 ^A	33,66 ± 1,44 ^A	31,17 ± 1,87 ^C	92,61	87,20	1,56 X 10 ⁻⁸	
::<i>mdh</i>	18,56 ± 0,21 ^A	30,64 ± 1,12 ^A	7,12 ± 0,66 ^A	23,24	16,66	0,96 X 10 ⁻⁸	
::<i>per</i>	18,66 ± 0,98 ^A	34,41 ± 2,53 ^A	20,40 ± 1,36 ^B	59,57	50,55	1,40 X 10 ⁻⁸	
::<i>ldh1</i>	18,08 ± 1,44 ^A	29,51 ± 0,55 ^A	21,80 ± 1,65 ^B	73,88	60,98	1,90 X 10 ⁻⁸	

ND: No Determinado

Y_M=P/S: rendimiento de manitol respecto a la fructosa consumida

Y=P/T: rendimiento de manitol con respecto a la fructosa inicial en el medio de cultivo

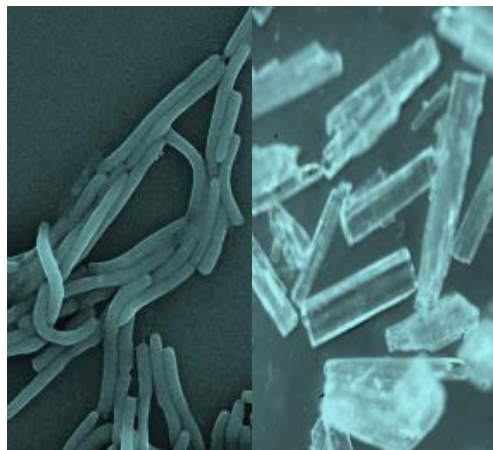
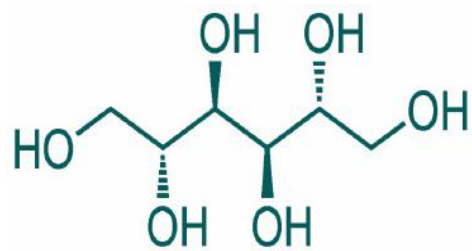
Y_{MU}=P/X: producción específica de manitol por unidad formadora de colonia

Valores con letras distintas son significativamente diferentes (p < 0,05); las comparaciones entre las condiciones estudiadas se realizaron mediante el análisis de la varianza (one-way ANOVA) seguido de la prueba de Tukey HSD.

En condiciones de cultivo agitado el consumo de glucosa fue similar por todas las cepas estudiadas (CRL 2034 = $17,30 \pm 1,54$ g/L; $::mdh = 18,56 \pm 0,21$ y $::per = 18,66 \pm 0,98$ g/L y $::ldh1 = 18,08 \pm 1,44$ g/L). En cuanto al consumo de fructosa ninguna de las cepas estudiadas consumió su totalidad (CRL 2034 = $33,66 \pm 1,44$ g/L; $::mdh = 30,64 \pm 1,12$ g/L; $::per = 34,41 \pm 2,53$ g/L; y $::ldh1 = 29,51 \pm 0,55$ g/L) mostrando diferencias en cuanto a las condiciones de cultivo estático donde la cepa parental consumió la totalidad de la fructosa a las 48 h de incubación. Con respecto a la producción de manitol la cepa parental fue la que presentó la máxima producción, con diferencias significativas y mayores rendimientos ($31,17 \pm 1,87$ g/L; Y_M 93 % e Y 87 %) respecto a las cepas mutantes siendo la cepa CRL 2034::*mdh* la que mostró los menores valores de producción y rendimientos ($7,12 \pm 0,66$ g/L; 23 % y 17 %). Similarmente a lo observado en fermentaciones estáticas, la producción específica de manitol por UFC fue mayor para la mutante CRL 2034::*ldh1* ($1,90 \times 10^{-8}$ mg/UFC) con respecto al control ($1,56 \times 10^{-8}$ mg/UFC) y a las demás mutantes ($::mdh = 9,64 \times 10^{-9}$ mg/UFC y $::per = 1,40 \times 10^{-8}$ mg/UFC).

Así, a pesar de los mayores niveles de actividad MDH obtenidos en la mutante *ldh1*, la producción de manitol y rendimientos sobre sustrato por esta cepa fueron menor a los de *F. tropeoli* CRL 2034 a las 48 h tanto en condición estática como agitada. Sin embargo, la producción específica de manitol por UFC fue mayor en CRL 2034::*ldh1* ($1,99 \times 10^{-8}$ y $1,90 \times 10^{-8}$ mg/UFC, condición estática y agitada, respectivamente) que en CRL 2034. Estos resultados muestran que la mutante CRL 2034::*ldh1* fue más eficiente en la producción de manitol que la cepa salvaje en ambas condiciones estudiadas.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis se describe la identificación y el estudio comparativo de los genes *mdh*, que codifican para la enzima manitol 2-deshidrogenasa (MDH), en tres BL heterofermentativas obligadas: *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. tropaeoli* CRL 2034. Los genes *mdh* localizados en cada especie poseen un tamaño similar entre ellos (1011 – 1017 pb). Los contextos genómicos encontrados en *L. reuteri* CRL 1101 y *L. mucosae* CRL 573 fueron similares; el gen *mdh* se encuentra formando un operón monocistrónico y se localizaron, corriente arriba y en sentido contrario a *mdh*, un gen comprometido con el transporte de manganeso y corriente abajo y en el mismo sentido, un gen para un regulador transcripcional de la familia TetR. El gen *mdh* de CRL 1101 codifica para una proteína de 366 aa; sin embargo, el gen *mdh* de *L. mucosae* CRL 573 presentó un codón de terminación y por lo tanto, expresaría dos proteínas de 154 aa y otra de 185 aa. En el caso de *F. tropaeoli* CRL 2034 se encontró un contexto genómico diferente al de los lactobacilos; el gen *mdh*, que codifica para una proteína de 368 aa, forma parte de un operón bicistrónico junto a una putativa fructosa permerasa (*per*). Un contexto similar al observado en *F. tropaeoli* CRL 2034 se encontró en la cepa *Leu. mesenteroides* ATCC 8293, aunque en este caso se encontró un gen extra localizado corriente arriba del operón *mdh*, que codifica para el represor del operón de sacarosa ScrR de la familia Lacl.

Los tres únicos genes *mdh* y proteínas MDH caracterizados previamente en BL fueron descritos por Aarnikunnas y col. (2002), Hahn y col. (2003) y Sasaki y col. (2005) en las cepas *Leu. mesenteroides* ATCC 9135 (GenBank AAM09029.1), *Leu. pseudomesenteroides* KCTC 3652 (CAD31644.1), y *L. reuteri* ATCC 53608, (AAS55855.1), respectivamente. Esos genes y los caracterizados en este trabajo en las cepas *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. tropaeoli* CRL 2034 son homólogos y sus proteínas presentan tamaños similares y porcentajes de identidad mayor al 70 %. Las enzimas MDH identificadas en las cepas CRL 1101, CRL 573, CRL 2034, ATCC 53608, KCT C3652 y ATCC 9135 son miembros de la superfamilia de reductasas/deshidrogenasas de cadena media (MDR) y de la familia de deshidrogenasas dependientes de zinc; presentan estructuras secundarias similares, con un plegamiento típico de Rossmann para la unión de dinucleótidos, y poseen dos

DISCUSIÓN

sitios de unión al catión Zn: un sitio de unión al Zn catalítico, coordinado por los aminoácidos C37, G38, T39, F61, E62 y E146 (éste último ausente en las proteínas MDH de CRL 573), y un sitio de unión al Zn estructural, coordinado por los residuos C91, C94, C97 y C105. La presencia de dos átomos de Zn por subunidad sugiere que estas proteínas pueden formar dímeros o tetrámeros.

Los estudios filogenéticos realizados muestran a las proteínas M1-PDH (manitol 1-fosfato deshidrogenasa) y MDH en dos clados bien diferenciados, lo que sugiere una divergencia en su evolución. A su vez, se observa que las distintas MDH se asocian, en general, de manera específica con el género y la especie de las que provienen. Así, en el *subcluster 1* se agrupan las MDH de los géneros *Leuconostoc*, *Fructobacillus* y *Weissella*, géneros muy relacionados filogenéticamente, forman parte de la familia *Leuconostoc*, cuando son clasificados de acuerdo al gen 16S rRNA (Endo y Okada, 2008). Una observación similar se nota entre la relación de las MDH de *L. reuteri*, *L. fermentum* y *L. mucosae* y la relación filogenética entre estas especies, estrechamente asociadas también al hábitat de las que fueron aisladas descrito por Duar y col. (2017). La asociación de las enzimas MDH de manera específica con el género y la especie de las que provienen sugiere la ausencia de transferencia horizontal de estos genes y la diversificación de los mismos luego de la especiación de las BL.

Los exhaustivos e infructuosos estudios realizados para generar mutantes en el gen *mdh* de *L. reuteri* CRL 1101 se debieron principalmente a la baja frecuencia de electrotransformación de este microorganismo y a la imposibilidad de seleccionar las mutantes deseadas mediante el uso de la técnica de *recombineering*. Landete y col. (2014) informaron similares inconvenientes para transformar dos cepas de *L. reuteri*; estos autores evaluaron 10 protocolos distintos optimizados para la electrotransformación de BL y obtuvieron transformantes solo con 1 o 3 de los protocolos utilizados, demostrando que la transformación en esta especie podría ser cepa dependiente. Sin embargo, en nuestro trabajo se logró la optimización del protocolo de transformación para la cepa *L. reuteri* CRL 1101 (descrita en el Anexo de esta Tesis) que puede ser de interés para otros investigadores; este protocolo sirvió además para transformar la cepa *F. trophaeoli* CRL 2034 (ver abajo).

DISCUSIÓN

Respecto a la técnica de *recombineering* empleada (van Pijkeren y Britton, 2012), se puso en evidencia que la misma es funcional en *L. reuteri* CRL 1101 ya que se logró el aislamiento de mutantes en el gen de la enzima ARN polimerasa (mutantes resistentes a rifampicina), aunque las frecuencias obtenidas fueron mucho más bajas a las descritas en la literatura. La imposibilidad de encontrar una mutante empleando la técnica de *recombineering* podría deberse a una baja frecuencia en la incorporación de la mutación deseada o a que exista en *L. reuteri* CRL 1101 otro gen con una actividad complementaria a la actividad MDH descrita. La presencia putativa de un gen complementario a *mdh*, es también probable en la cepa *L. mucosae* CRL 573; este microorganismo es un excelente productor de manitol, pero posee un gen *mdh* mutado. Sin embargo, una nueva búsqueda de genes homólogos a *mdh* en los genomas de *L. reuteri* CRL 1101 y *L. mucosae* CRL 573 fueron negativos.

F. tropeoli CRL 2034 es una especie heterofermentativa obligada que carece del gen *adhE* responsable de la conversión de acetil-P a etanol con la regeneración de 2 moléculas de NAD⁺; por este motivo, este género requiere de un aceptor de electrones externo como la fructosa, el oxígeno o el piruvato para poder recuperar el NAD⁺ necesario para las primeras etapas de la fermentación de azúcares (Endo y col., 2014). Por esto, que cuando se comprobó la función del gen *mdh* como el único responsable de la producción de manitol al generar una mutación de inserción en el mismo, la cepa mutante (CRL 2034::*mdh*) requirió de O₂ para crecer demostrando la necesidad de un aceptor de electrones alternativo distinto a la fructosa. Como se esperaba, la mutante CRL 2034::*mdh* no presentó actividad MDH y no produjo manitol. Estos resultados describen por primera vez al gen *mdh* como responsable de la producción de manitol en la especie *F. tropeoli* y su importancia para utilizar la fructosa como aceptor de electrones externo durante el crecimiento celular en un medio con glucosa como fuente de carbono. La capacidad de la cepa *F. tropeoli* CRL 2034 como eficiente productora de manitol (alcanzando valores cercanos a 100 g/L) en un medio de cultivo con fructosa y glucosa como fuentes de carbono se demostró recientemente (Ruiz Rodríguez y col., 2017).

DISCUSIÓN

En los estudios sobre cinética de crecimiento, *F. trophaeoli* CRL 2034 mostró mayor velocidad máxima de acidificación y similar velocidad máxima de crecimiento que la mutante CRL 2034::*mdh* demostrando que la mutación de este gen afecta el crecimiento celular y que la habilidad de producir manitol con la consecuente regeneración de NAD⁺ y producción de ATP otorgan una ventaja adaptativa para el crecimiento celular del microorganismo en el ambiente en que se encuentra (Zaunmüller y col., 2006; Årsköld y col., 2008).

Es importante destacar que la mutante CRL 2034::*mdh* podría ser también una mutante en el gen *per* (putativa fructosa permeasa), el segundo gen que se encuentra formando el operón bicistrónico *mdh* en *F. trophaeoli* CRL 2034, por lo que los fenotipos observados en *F. trophaeoli* CRL 2034::*mdh* podrían atribuirse también a la ausencia de la función de la proteína de membrana Per en dicha mutante. Sin embargo, si bien la mutante CRL 2034::*per* mostró menores velocidades de crecimiento y de acidificación que la cepa *F. trophaeoli* CRL 2034, sus valores de actividad MDH y LDH y de producción de manitol fueron similares a la cepa control en todas las condiciones estudiadas. Además, la mutante CRL 2034::*per* mostró un consumo de fructosa similar a CRL 2034 indicando que la proteína de membrana Per no sería el único sistema activo responsable del transporte de este azúcar al interior celular. Similares resultados fueron descritos por Heuser y col. (2009) en *Leu. mesenteroides*, donde el gen *fupL*, localizado en el operón bicistrónico *mdh* de esa cepa, codifica para FupL (de *Fructose Uptake Permease of Leuconostoc*), descrito como un transportador secundario de fructosa.

Con el objetivo de complementar las mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*per*, se buscó clonar los genes *mdh* y *mdh.per*, con resultados negativos. Esto podría haberse debido a la toxicidad y/o perturbación del metabolismo de *Escherichia coli* al expresar los genes *mdh* y *mdh.per* y a los requerimientos de la enzima MDH por el sustrato. Similares inconvenientes fueron informados por diversos autores al intentar clonar otros genes de enzimas deshidrogenasas. Lerch y col. (1989) clonaron con dificultad el gen correspondiente a la enzima D-2-hidroxiisocaproato deshidrogenasa de *L. casei* DSM20008; la expresión heteróloga de este gen afectaba el crecimiento de las células

DISCUSIÓN

recombinantes de *E. coli*. Bernard y col. (1991) observaron que solo lograban clonar el gen D-lactato deshidrogenasa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LMG6901 cuando un elemento móvil se insertaba en el promotor del gen modificando la fuerza de su expresión. Lee y col. (1991) no pudieron generar clones con la secuencia original del gen de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Leu. mesenteroides* ATCC 12291 y sugirieron que el ADN podría contener secuencias reconocidas y modificadas por el sistema de restricción-modificación de *E. coli*. Otros autores afirman que estas dificultades son inherentes al propio ADN de *Lactobacillus*, independientemente de la posible expresión de un producto tóxico, y podrían resultar de la inestabilidad segregacional del plásmido recombinante y de la división y/o reordenamiento por un sistema del huésped *E. coli* (Bernard y col., 1994). Miroux y Walker (1996) intentaron sobreexpresar 7 proteínas de membrana, de manera independiente, en *E. coli* y detectaron que cuando inducían la expresión de las mismas se producía la muerte de la célula huésped, posiblemente debido a la permeabilización de la membrana celular. Esto también ocurrió al clonar el gen *per* de *F. tropeoli* CRL 2034 al ser la fructosa permeasa una proteína de membrana. En nuestro caso, los clones recombinantes obtenidos presentaban fragmentos parciales del gen *per*.

La expresión de genes *mdh* de BL ya fue descrita en la literatura usando distintas estrategias, aunque en todos los casos se utilizaron vectores de inducción. Algunos ejemplos de expresión de *mdh* en *E. coli* fueron descritos por Aarnikunnas y col. (2002), Hahn y col. (2003), Kaup y col. (2004), Liu y col. (2005) y Sasaki y col. (2005) al clonar el gen *mdh* de cepas de *Leu. mesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides*, *L. brevis* y *L. reuteri* utilizando los vectores pKK223-3, pET y pRSET, todos inducibles por IPTG. Wisselink y col. (2004) utilizaron el vector pNZ8148 (inducible por nisina) para sobreexpresar el gen *mdh* de *L. plantarum* en *L. lactis*. En nuestro caso siempre utilizamos el promotor propio del operón *mdh-per* que inferimos que podría ser un promotor fuerte, con el que no pudimos regular su expresión.

Con el objetivo de evaluar la influencia de genes relacionados en el balance redox en la producción de manitol, se generaron distintas mutantes en la cepa CRL 2034 por recombinación simple. Los principales genes relacionados al balance redox son los

genes que codifican para las enzimas alcohol y lactato deshidrogenasas, que requieren del cofactor NAD(P)H y lo convierten en NAD(P)⁺, necesario para las primeras etapas de la fermentación de azúcares (Fig. 20). Al generar cepas deficientes en algunos de estos genes se espera desviar el metabolismo hacia la producción de manitol; la enzima MDH utilizará el exceso de NAD(P)H para reducir a la fructosa en manitol y así recuperar el NAD(P)⁺ manteniendo el balance redox de la célula. En el genoma de *F. trophaeoli* CRL 2034, se comprobó la ausencia del gen bifuncional *adhE*, necesario para la actividad alcohol/acetaldehído deshidrogenasa, característica del género *Fructobacillus*, por lo que estas bacterias no producen etanol (o muy poco) causando la acumulación de NAD(P)H, lo que hace necesario la presencia de un aceptor de electrones externo para el metabolismo de la glucosa (Endo y col., 2014).

En el genoma de *F. trophaeoli* CRL 2034 se encontraron tres genes *ldh*, dos D-*ldh* (*ldh1* y *ldh2*) y uno L-*ldh* (*ldh3*). La presencia de múltiples genes *ldh* ya fue descrita en BL; Rico y col. (2008) describieron 4 genes en *L. casei* BL23 involucrados en la síntesis de lactato y plantearon la posibilidad de que existieran aún otros ante la evidencia de que la cepa con los cuatro genes mutados aún poseía actividad LDH. Recientemente, la presencia de más de un gen D-*ldh* también fue descrita por Huang y col. (2017) en una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. En esta cepa se encontraron 5 genes D-*ldh* putativos, de los cuales solo dos son responsables de la mayor producción de ácido láctico.

En nuestro trabajo, se generaron cepas mutantes en cada uno de los genes *ldh* (*ldh1*, *ldh2*, *ldh3*) presentes en el genoma de *F. trophaeoli* CRL 2034. La producción de ácido láctico en *F. trophaeoli* se caracteriza por una relación 9:1 de D-lactato:L-lactato lo que concuerda con lo descrito para esta especie (Endo y col., 2011). El análisis de producción de ácido láctico y de sus isómeros D- y L- revelaron que la producción de este ácido graso y sobre todo la relación de D:L- fue afectada en las mutaciones de los distintos genes *ldh*. La mutación en el gen *ldh1* provocó una disminución de la producción total de ácido láctico y una relación 7:3 de D:L-lactato, tanto en condiciones de cultivo estático y agitado respecto a la cepa control. Si bien la cantidad total de ácido láctico producido por las mutantes CRL 2034::*ldh2* y CRL 2034::*ldh3* fue

DISCUSIÓN

similar al control (cepa CRL 2034), en la mutante CRL 2034::*ldh3* la producción fue principalmente la del isómero D del ácido láctico. Esto sugiere la ausencia de una actividad racemasa en la cepa *F. tropeoli* CRL 2034, o al menos de una racemasa inducible por D- lactato. Por otro lado, es interesante notar la relación 7:3 de D:L- lactato observada en la cepa *F. tropeoli* CRL 2034::*ldh1* ya que al formar los genes *ldh1* y *ldh2* un mismo operón, la mutación en el gen *ldh1* debería también inactivar la función del gen *ldh2* (si ambos genes responden al mismo promotor). Los altos niveles de D-lactato observados en CRL 2034::*ldh1* podrían explicarse por alguna actividad LDH distinta a las caracterizadas, o bien a una actividad racemasa dependiente del isómero L-lactato, similar a lo planteado por otros autores. Ferain y col. (1994) y Ferain y col. (1996) generaron una cepa de *L. plantarum* deficiente en la enzima D-LDH y sin actividad D-LDH; sin embargo, producía los dos isómeros de ácido láctico en concentraciones equivalentes. El mismo comportamiento se observó con la mutante *ldh3⁻* generada en este trabajo. Malleret y col. (1998) también mostraron que en una cepa de *L. sakei* con una disrupción en el único gen codifica la L-LDH se formaban los dos isómeros de ácido láctico a partir de la acción de la enzima D-LDH, proponiendo la acción de una racemasa. Otros autores observaron también modificaciones en la síntesis de los isómeros D- y L- al generar mutaciones en distintos genes *ldh*.

En todas las cepas estudiadas (CRL 2034 y mutantes) se observó menor actividad LDH en cultivo agitado con respecto a la condición estática. Este comportamiento se observó también con uno de los genes estudiados en *L. delbrueckii* (*ldb0101*) que fue reprimido en presencia de oxígeno el cual se estaría utilizando como aceptor externo de electrones (Huang y col., 2017). La proteína codificada por el gen *ldb0101* presenta un 67 y 61 % de identidad con las enzimas LDH1 y LDH2 de CRL 2034, respectivamente, lo que sugiere que estas enzimas también podrían estar reguladas por la presencia de oxígeno. En este sentido, son interesantes las características observadas en la mutante CRL 2034::*ldh1*. Esta cepa presentó mayor actividad MDH respecto a la cepa control (7,88 y 5,56 U/mg de proteína, respectivamente) y creció más lentamente, siendo sus colonias más pequeñas en medio sólido; se observaron también diferencias morfológicas al microscopio óptico. Además, en microfotografías electrónicas de

transmisión, sus células mostraron unas estructuras parecidas a mesosomas y una pared celular más gruesa que la de las células control. Aarnikunnas y col. (2003) detectaron menor crecimiento celular de cepas mutadas en los genes *ldh* también fue descrito por, quienes observaron que la doble mutación de los genes *ldhD* y *ldhL* en la cepa *L. fermentum* NRRL-B-1932 influyó negativamente en el consumo de glucosa y en el crecimiento celular. Los mesosomas fueron descritos como estructuras que solo se encuentran en células procariotas y cuya función aún no está totalmente dilucidada. Estas estructuras funcionarían activamente cuando se producen lesiones celulares y en procesos celulares fisiológicos como la replicación y separación de nucleótidos y en la fosforilación oxidativa. Las estructuras y funciones de los mesosomas se han estudiado e identificado, pero la regulación de sus propiedades funcionales aún no es clara. Thorne y Barker (1969) aislaron algunas enzimas como acetoquinasa, fosfoactiltransferasa y ATPasa de mesosomas de *L. casei*. Santhana Raj y col. (2007) describieron la formación de mesosomas cuando se afectaba la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con distintos antibióticos. Los autores Li y col. (2008) y Xin y col. (2014) observaron la formación de estas estructuras al utilizar rifampicina en los cultivos de cepas de *Xanthomonas campestris* y *E. coli*, y describieron que los mesosomas están siempre acompañados por la acumulación de peróxido de hidrógeno dentro de sus membranas. Por ello, entre las posibles razones para explicar la formación de los mesosomas en la cepa CRL 2034::*ldh1* se mencionan la presencia en el medio de cultivo del antibiótico utilizado para mantener la inserción del plásmido; la posible acumulación de peróxido de hidrógeno al utilizar el O₂ como aceptor de electrones; o a la mutación del gen *ldh1* que genera cambios en el metabolismo celular.

Respecto al uso de O₂ como aceptor de electrones por parte de *F. tropaeoli* CRL 2034, un análisis *in silico* de su genoma reveló la presencia de genes necesarios para la utilización del mismo. Entre los genes encontrados se mencionan: los genes para citocromo O ubiquinol oxidasa (EC. 1.10.3.11), NADH dehidrogenasa/oxidoreductasa (EC 1.6.99.3) y un putativo componente de citocromo C- menaquinona reductasa (EC. 1.10.22), que serían las funciones responsables de utilizar el O₂ reduciéndolo a H₂O.

DISCUSIÓN

Además, se encontraron dos NADH peroxidasas (EC 1.11.1.1) que podrían ser responsables de la utilización de O₂ convirtiéndolo en H₂O₂. Finalmente, se encontró una pseudocatalasa (manganeso catalasa EC 1.11.1.6) responsable de la detoxificación del peróxido catalizando la interconversión del H₂O₂ a O₂ y H₂O. Posiblemente, en la mutante *F. tropeoli* CRL 2034::*ldh1*, la acumulación de NAD(P)H estimularía la actividad de las NADH peroxidasas, las que convertirían el O₂ en H₂O₂ y se acumularía en los mesosomas, como fue descrito en *E. coli* por Xin y col. (2014). Finalmente, las diferencias en el grosor de la pared celular observadas en la mutante se deberían posiblemente a las modificaciones de los terminadores de los polisacáridos de la pared celular D-lactato. En este sentido, Ferain y col. (1996) describieron un cambio drástico en la pared celular de *L. plantarum* NCIMB8826 al generar cepas mutantes en los genes D- y L- LDH; los autores indicaron que se generaba la sustitución de D- lactato por D- alanina en la cadena peptídica del peptidoglicano, modificando así los niveles de resistencia a vancomicina.

En cuanto a la producción de metabolitos se observó que, a excepción de la mutante CRL 2034::*mdh*, tanto la cepa control como sus mutantes fueron capaces de sintetizar manitol, ácido láctico y ácido acético, tanto en condiciones de crecimiento estático y agitado. Inesperadamente, la mutante CRL 2034::*mdh* fue capaz de sintetizar manitol (en condición agitada) mientras que las mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*per* produjeron etanol (Fig. 32). Una característica común en ambas mutantes es la inactivación de la función Per pudiendo especularse que la producción de etanol y manitol podría deberse a la presencia de deshidrogenasas presentes en el genoma de *F. tropeoli* CRL2034 sin función asignada aún y que dichas actividades estarían inhibidas por Per en la cepa salvaje. La inhibición mediada por Per de estas putativas deshidrogenasas optimizaría la regeneración del NAD(P)H a NAD⁺ y la mayor producción de ATP indirectamente por la vía de la MDH, responsable de la conversión de fructosa en manitol.

La especie *F. tropeoli* produce cantidades equimolares de ácido láctico y ácido acético (1:1) (Endo y col., 2011) y este comportamiento se observa en la cepa control y en la mutante CRL 2034::*per* en condición estática, no así en la condición agitada, en donde

DISCUSIÓN

la proporción de ácido acético es mayor que la de ácido láctico. Lucey y Condon (1986) notaron que en presencia de O₂ la producción de acetato aumentaba y disminuía la cantidad de etanol formado en algunas especies de *Leuconostoc*; Kang y col. (2013) observaron también este comportamiento en la cepa de *sourdough*, *Lactobacillus panis* PM1. Estos autores justifican el cambio de metabolismo en condiciones de aireación ya que en estas condiciones obtienen la ventaja de producción de ATP a través de la formación de acetato y la utilización de O₂ como aceptor de electrones para regenerar NADH por esta vía en vez de la de producción de etanol. Por lo tanto, el reciclaje de NADH en presencia de O₂ sería ventajoso para el metabolismo energético. Este comportamiento justificaría el metabolismo de las cepas CRL 2034 y CRL 2034::*per* ya que al no contar con la enzima responsable de la producción de etanol, el aumento de ácido acético con ganancia de energía sería a expensas de una menor producción de ácido láctico y se utilizaría el O₂ como aceptor de electrones externos. En las mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*ldh1* este tipo de metabolismo se ve aumentado y en el caso de la mutante CRL 2034::*ldh1* se observa tanto en condiciones de cultivo estática como agitada. En la cepa CRL 2034::*mdh*, la deficiencia de la enzima MDH para regenerar NADH provoca el uso obligado del O₂ como aceptor de electrones externo y la mayor producción de acetato generaría mayor producción de ATP con la concomitante ventaja para el crecimiento celular. En el caso de la mutante CRL 2034::*ldh1*, la relación ácido láctico: ácido acético estaría favorecida hacia la producción de acetato por una disminución de la producción de ácido láctico en las condiciones estudiadas.

La mutante CRL 2034::*ldh1* produce menor cantidad de ácido láctico respecto a la cepa parental en todas las condiciones estudiadas, por lo que en esta cepa se acumularía piruvato en exceso. Mediante la herramienta de comparación de metabolismo del programa SEED Viewer versión 2.0 (Overbeek y col., 2005) se determinaron las enzimas involucradas en el metabolismo del piruvato presentes en el genoma de CRL 2034. En la Fig. 31 se muestran los posibles destinos del piruvato; en azul y verde se muestran las enzimas (y productos) presentes y en rojo las enzimas (y productos) ausentes en el genoma de *F. tropeoli* CRL 2034. Como se observa, no se encuentran

DISCUSIÓN

las enzimas responsables de la producción de formiato, acetaldehído y etanol mientras que sí están presentes las enzimas involucradas en la producción de acetato (la relación ácido láctico:ácido acético es mayor en la cepa CRL 2034::*ldh1*) y de malonil-CoA, precursor de la síntesis de ácidos grasos, pudiendo ambas ser las posibles vías del metabolismo del piruvato. Al mismo tiempo, el piruvato puede convertirse en α -cetolactato y luego en acetoína que, dependiendo de la enzima, puede ser transformado en los compuestos de aroma diacetilo o 2,3 butanodiol. Se encuentran también las vías de biosíntesis de los aminoácidos esenciales valina, leucina e isoleucina (aunque esta última parece estar incompleta). A partir de fosfoenolpiruvato (metabolito anterior al piruvato en la fermentación de los azúcares) puede convertirse en oxalacetato a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, para luego producir citrato o aspartato/asparagina y fumarato.

Por otro lado, la producción de manitol por la mutante CRL 2034::*ldh1* a las 48 h de fermentación fue similar a la de la cepa CRL 2034, a pesar que la mutante presentó mayores niveles de actividad MDH en las condiciones estudiadas. También, Aarnikunnas y col. (2003) encontraron que al generar una doble mutante de los genes *ldhD* y *ldhL* en la cepa *L. fermentum* NRRL-B-1932 no mejoró la biosíntesis de manitol. Sin embargo, otros autores demostraron que esta estrategia fue funcional para optimizar la producción de manitol en cepas de *L. lactis* (Neves y col., 2000) y para la síntesis de otros polioles, en *L. plantarum* y *L. casei* (Nissen y col., 2005; Ladero y col., 2007) mostrando que quizás esta estrategia sería válida solamente para bacterias homofermentativas.

DISCUSIÓN

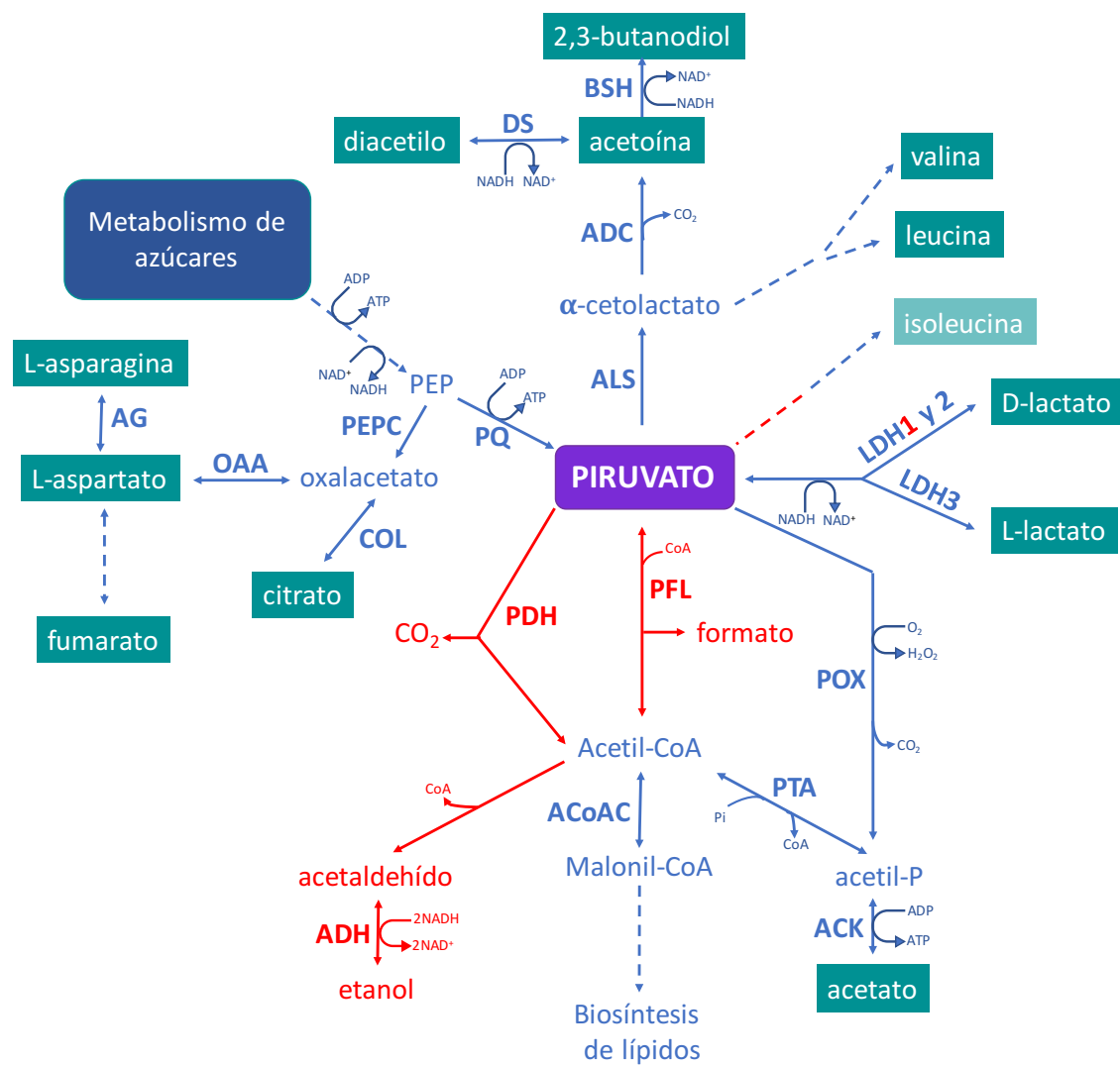


Figura 31. Metabolismo del piruvato

Enzimas y productos en rojo están ausentes en CRL 2034.

PEP: fosfoenolpiruvato

PQ: piruvato quinasa; PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; COL: citrato-oxalacetato liasa; OAA: oxalacetato-aspartato aminotransferasa; AG: asparaginasa; LDH (1,2 y 3): lactato deshidrogenasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; PFL: piruvato-formato liasa; POX: piruvato oxidasa; ACK: acetato quinasa; PTA: fosfoacetiltransferasa; ACoAC: acetil-CoA carboxilasa; ALS: acetolactato sintasa; ADC: acetolactato descarboxilasa; DS: diacetilo sintasa/reductasa; BSH: 2,3-butanodiol deshidrogenasa.

Una síntesis de las modificaciones de los metabolitos producidos por *F. trophaeoli* CRL 2034 y las mutantes generadas en esta Tesis se presenta en la Figura 32. Se observa que cada cepa genera proporciones distintas de los metabolitos estudiados. En la cepa control se distingue que en las primeras etapas de la fermentación de azúcares se generan 3 moléculas de NADH por cada molécula de glucosa consumida; estos NADH son consumidos y regenerados a NAD^+ a través de la producción de lactato (vía LDH; 1 NAD^+) y de manitol (vía MDH; 2 NAD^+) (se observa la producción de dos moléculas de manitol por cada molécula de lactato). Los mayores niveles de lactato, acetato (ATP) y manitol se determinaron en la cepa CRL 2034. Similares niveles de lactato y acetato se observaron en las mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*per* que fueron capaces de producir también manitol aunque los niveles observados en CRL 2034::*mdh* fueron menores. En condiciones de cultivo agitado, la mutante CRL 2034::*mdh* fue capaz de crecer utilizando al oxígeno como aceptor de electrones externo; sin embargo, su crecimiento no fue comparable a la de la cepa CRL 2034 posiblemente porque en presencia de NAD(P)H acumulado y de oxígeno, se producen compuestos tóxicos como H_2O_2 o radicales libres. Estos resultados indicarían que el aceptor externo de electrones óptimo para esta cepa es la fructosa ante el oxígeno. Como se sugirió previamente, la presencia de Per es esencial para una óptima actividad de MDH; esta proteína de membrana actúa como un transportador secundario de fructosa y, sugerimos, sería un regulador negativo de actividades deshidrogenasas aún no identificadas, responsables de la producción de etanol y manitol por vías alternativas. Una mutación en el gen *per* explicaría los niveles de manitol y etanol detectados en las mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*per*.

Por último, se detectaron los menores niveles de lactato y acetato fueron detectados en las mutantes CRL 2034::*ldh1*. Sin embargo, el rendimiento de manitol con respecto a la fructosa consumida en esta mutante fue similar a la de cepa CRL 2034 en condición estática. Los valores detectados en estas dos cepas fueron similares a los descritos por cepas de *Leu. pseudomesenteroides*, en distintas condiciones de cultivos (Soetaert W, 1999), y en *L. intermedius* en lote alimentado (Racine y Saha, 2007); siendo los mayores porcentajes de rendimientos obtenidos a la fecha entre las BL.

DISCUSIÓN

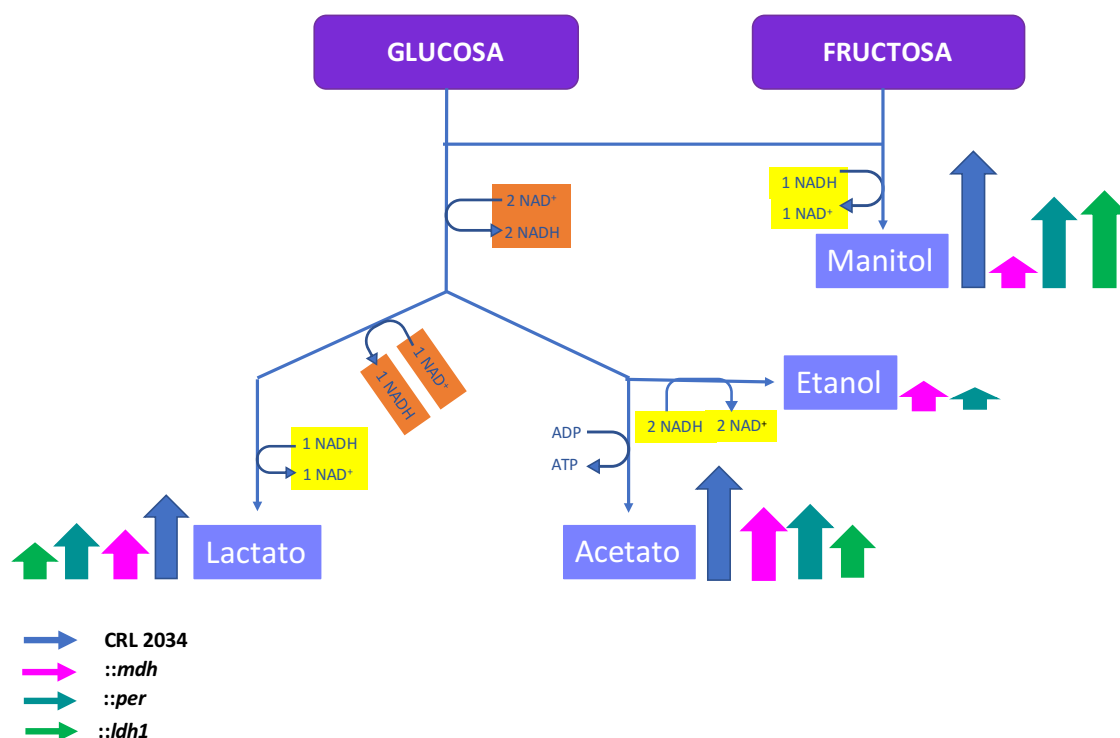


Figura 32. Metabolitos producidos en condiciones de crecimiento agitado por *F. trofaeoli* CRL 2034 y sus mutantes CRL 2034::*mdh*, CRL 2034::*per*, y CRL 2034::*ldh1*

La altura de las flechas indica la proporción del metabolito producido

De esta forma, se determinó que la mutante CRL 2034::*ldh1* posee una mayor producción específica de manitol por unidad formadora de colonia que la de la cepa control ($1,99 \times 10^{-8}$ mg/UFC en CRL 2034::*ldh1* versus $1,64 \times 10^{-8}$ mg/UFC en CRL 2034). Con estos resultados y teniendo en cuenta que la mutante CRL 2034::*ldh1* tiene un crecimiento más lento que el de la cepa control, se podría utilizar CRL 2034::*ldh1* como célula inmovilizada para la producción de manitol, tal como se describe en la patente de Ojamo y col. (2003) o como células no proliferantes referidas por Neves y col. (2000), quienes estudiaron el metabolismo de células no proliferantes de *Lac. lactis* MG1363 con una disrupción en el gen *ldh* y observaron una elevada producción de manitol. En 2002, von Weymarn (2002) propuso a la cepa *Leu. mesenteroides* ATCC 9135 como la mejor productora de manitol en ese momento utilizando *resting cells*; además Gaspar y col. (2004) describieron que células mutantes de *Lac. lactis* que producían mayor cantidad de manitol seguido por cantidades equimolares de lactato, etanol y 2,3-butanodiol cuando utilizaron células no proliferantes en suspensión.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES FINALES

- Se identificó y caracterizó el gen *mdh* en las cepas de BL heterofermentativas *L. reuteri* CRL 1101, *L. mucosae* CRL 573 y *F. trophaeoli* CRL 2034. Los tamaños de los genes y proteínas son similares; en CRL 1101 (1011 pb y 336 aa) y CRL 2034 (1017 pb y 338 aa), mientras que en CRL 573 se encontraron dos genes *mdh* contiguos, de 435 pb (144 aa) y 558 pb (185 aa).
- Se determinó la organización y el contexto genómico del gen *mdh* en las cepas estudiadas mediante estudios *in silico*. El contexto genómico del gen *mdh* de CRL 1101 y CRL 573 es similar: corriente arriba se detectó un gen de transporte de manganeso y corriente abajo un gen regulador. El gen *mdh* de CRL 2034 forma parte de un operón junto a un gen que codifica para una proteína transportadora de fructosa. Corriente arriba del operón se detectó un gen que podría estar implicado en la resistencia a selenio (*DedA*).
- Se diseñó y optimizó un protocolo de transformación de *L. reuteri* CRL 1101 (penicilina 0,7 µg/mL, 600 Ω 25 µF 1,8 kV; pJP042 10⁴ UFC/ug ADN). Aunque su uso no permitió modificar genéticamente la cepa CRL 1101, fue de gran utilidad para las modificaciones genéticas de *F. trophaeoli* CRL 2034.
- Se generaron y caracterizaron mutantes de *F. trophaeoli* CRL 2034 en los genes *mdh*, *per*, *ldh1*, *ldh2* y *ldh3*, que codifican para las enzimas manitol 2-deshidrogenasa, fructosa permeasa, D-lactato deshidrogenasa 1 y 2 y L-lactato deshidrogenasa (*ldh3*), respectivamente. Para el aislamiento de las mutantes, se utilizó el plásmido de inserción pRV30, generando la interrupción de los genes por recombinación simple.
- La cepa CRL 2034::*mdh* no presentó actividad MDH, fue incapaz de producir manitol y requirió de oxígeno para crecer.

- Las mutantes *ldh2* y *ldh3* no mostraron diferencias significativas con la cepa parental respecto a los parámetros de crecimiento, actividades LDH y MDH, consumo de azúcares y producción de manitol.
- La cepa CRL 2034::*per* mostró un crecimiento más lento que la cepa parental aunque no presentó diferencias significativas en las actividades LDH y MDH, en el consumo de azúcares, ni en la producción de manitol.
- Las cepas CRL 2034::*ldh1* y CRL 2034::*ldh3* mostraron una producción de los isómeros D- y L- láctico variable con respecto al control. La cepa CRL 2034::*ldh1* favoreció la producción de ácido L-láctico mientras que la cepa ::*ldh3* favoreció la producción de ácido D-láctico.
- La mutante CRL 2034::*ldh1* mostró diferencias morfológicas con mesosomas, una pared celular más gruesa y células más delgadas y largas comparada con la cepa CRL 2034.
- La cepa CRL 2034::*ldh1* presentó menor actividad LDH, mayor actividad MDH y produjo menor cantidad de ácido láctico. La producción de manitol fue similar a la cepa parental; sin embargo, la producción específica fue mayor en CRL 2034::*ldh1* ($1,99 \times 10^{-8}$ mg/UFC) que en CRL 2034 ($1,64 \times 10^{-8}$ mg/UFC) demostrando que la mutante es más eficiente para la producción manitol.

CONCLUSIÓN GENERAL

En este trabajo de Tesis se describe por primera vez la organización genética del gen manitol 2-deshidrogenasa en Fructobacillus trophaeoli CRL 2034 y su importante contribución en el crecimiento de este microorganismo en un medio que contiene fructosa como aceptor de electrones externo. Además, se generó una cepa mutante (::ldh1) más eficiente en la producción de manitol que la cepa salvaje en las condiciones estudiadas. Los resultados logrados contribuyen al conocimiento sobre el metabolismo de fructosa/manitol en la cepa CRL 2034 y destacan la importancia comportamiento del potencial redox en la especie Fructobacillus trophaeoli. Estos estudios sientan las bases necesarias para un diseño racional de las modificaciones genéticas en el genoma de CRL 2034, con el fin de utilizarlo como una fábrica celular eficiente de manitol.

PROYECCIONES

PROYECCIONES

- Estudiar el balance redox [NAD(P)H/NAD(P)⁺] y ATP producido por la cepa control y las cepas mutantes CRL 2034::*mdh* y CRL 2034::*ldh1*.
- Evaluar la producción de otros metabolitos en las cepas CRL 2034::*mdh*, CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1* para estudiar el destino de los azúcares consumidos.
- Evaluar la expresión diferencial de los genes involucrados en la síntesis de manitol y metabolismo de fructosa en las cepas CRL 2034, CRL 2034::*mdh*, CRL 2034::*per* y CRL 2034::*ldh1* bajo condiciones de crecimiento definidas.
- Evaluar la producción de manitol por la mutante CRL 2034::*ldh1* usando células inmovilizadas o no proliferantes.

ANEXO

Secuencias utilizadas para el árbol filogenético

Tabla 11. Secuencias utilizadas para realizar el árbol filogenético

Microorganismo	Número de Acceso
<i>Leu. mesenteroides subsp. suionicum</i> ATCC 9135	AAM09029.1
<i>Leu. mesenteroides subsp. dextranicum</i>	KMY82191.1
<i>Leu. mesenteroides</i>	ACT22631.1
<i>Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>	KMY78497.1
<i>Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides 2</i>	ORI80600.1
<i>Leu. mesenteroides subsp. cremoris</i>	KMY80413.1
<i>Weissella cibaria</i>	ALI34166.1
<i>Leu. citreum</i> KM20	ACA82186.1
<i>Leu. pseudomesenteroides</i> KCTC 3652	CAD31644.1
<i>Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides 3</i>	ORI81820.1
<i>Leu. pseudomesenteroides</i> 1159	KDA48520.1
<i>Leu. carnosum</i> JB16	AFT82159.1
<i>Leu. gelidum subsp. gasicomitatum</i> LMG 18811	CBL92099.1
<i>Leu. gelidum subsp. gasicomitatum</i>	CUW19723.1
<i>Weissella jogaejeotgali</i>	APS42006.1
<i>Leu. fallax</i>	WP_010006726.1
<i>F. fructosus</i> KCTC 3544	KRN53392.1
<i>W. paramesenteroides</i> ATCC 33313	EER74459.1
<i>W. paramesenteroides</i>	WP_040760069.1
<i>W. bombi</i>	SCB72562.1
<i>W. hellenica</i>	WP_074427386.1
<i>Leu. pseudomesenteroides</i>	WP_084012202.1
<i>W. hellenica</i>	WP_042492594.1
<i>Leu. lactis</i>	KQB80794.1
<i>Leu. lactis 2</i>	WP_084459763.1
<i>Leu. lactis 3</i>	WP_010001368.1
<i>Leu. citreum 4</i>	WP_048700467.1
<i>L. reuteri</i> ATCC 53608	AAS55855.1
<i>L. reuteri</i>	WP_003665087.1
<i>L. reuteri</i>	WP_086141707.1
<i>L. reuteri</i>	WP_035157092.1
<i>L. reuteri</i> JCM 1112	BAG26258.1
<i>L. reuteri</i>	WP_085678440.1
<i>L. sp. marseille</i> -P3519	WP_076460138.1
<i>L. coleohominis</i> 101-4-CHN	EEU29704.1
<i>L. coleohominis</i> DSM 14060	KRM81686.1
<i>L. fermentum</i>	WP_049183507.1
<i>L. secaliphilus</i>	WP_057742073.1

<i>L. secaliphilus</i> 2	KRN58541.1
<i>L. fermentum</i> 2	WP_070955878.1
<i>L. fermentum</i> 3	WP_069775887.1
<i>L. fermentum</i> 4	AOR74332.1
<i>L. mucosae</i> LM1	AJT49654.1
<i>L. equigenerosi</i> DSM 18793 = JCM 14505	RL96362.1
<i>L. ingluviei</i>	WP_056993567.1
<i>L. mucosae</i>	WP_048345680.1
<i>L. ingluviei</i> DSM 15946	KRL91757.1
<i>L. ingluviei</i> 2	WP_019206276.1
<i>L. fermentum</i> 5	KRN09729.1
<i>L. gastricus</i> DSM 16045	KRM02657.1
<i>L. fermentum</i> F-6	AGL89906.1
<i>L. fermentum</i>	CDN24926.1
<i>L. gastricus</i> PS3	EHS85628.1
<i>L. fermentum</i> NB-22	ESS02292.1
<i>L. brevis</i> ATCC 367	ABJ65213.1
<i>L. brevis</i> KB290	BAN07857.1
<i>L. brevis</i>	WP_043022279.1
<i>L. hammesii</i> DSM 16381	KRL93717.1
<i>L. paucivorans</i>	WP_057877733.1
<i>L. parabrevis</i> ATCC 53295	KRK35924.1
<i>L. senmaizukei</i> DSM 21775 = NBRC 103853	KRN02355.1
<i>L. koreensis</i> JCM 16448	KRK87314.1
<i>L. hammesii</i> DSM 16381	KRL93713.1
<i>L. parabrevis</i> ATCC 53295	KRK35928.1
<i>L. zymae</i>	WP_087742722.1
<i>L. acidifarinae</i> DSM 19394	KRK95804.1
<i>L. acidifarinae</i>	WP_057800987.1
<i>L. zymae</i> DSM 19395	KRL16328.1
<i>L. zymae</i>	WP_057730481.1
<i>L. acidifarinae</i>	WP_057800990.1
<i>L. acidifarinae</i> DSM 19394	KRK95807.1
<i>L. spicheri</i> DSM 15429	KRL48686.1
<i>L. zymae</i>	WP_057730485.1
<i>L. zymae</i> DSM 19395	KRL16331.1
<i>L. namurensis</i> DSM 19117	KRK74459.1
<i>L. diolivorans</i> DSM 14421	KRL65187.1
<i>L. farraginis</i> DSM 18382 = JCM 14108	AF36193.1
<i>L. buchneri</i> CD034	AFS01476.1
<i>L. sanfranciscensis</i>	WP_056957746.1
<i>L. sanfranciscensis</i> DSM 20451	KRM80847.1
<i>L. sanfranciscensis</i>	WP_014081600.1

<i>F. tropaeoli</i> CRL2034	
<i>F. tropaeoli</i>	WP_059393297.1
<i>F. pseudoficulneus</i>	WP_059377690.1
<i>F. sp. EFB-N1</i>	WP_047974881.1
<i>F. ficulneus</i>	WP_061993383.1
<i>Leu.aceae bacterium</i> R-53105	WP_089938688.1
<i>F. fructosus</i>	WP_010691611.1
<i>Leu. kimchii</i> IMSNU 11154	ADG40635.1
<i>Leu. mesenteroides</i> 2	ACM66886.1
<i>Leu. pseudomesenteroides</i> 4882	CCJ66599.1
<i>Leu. lactis</i> 5	ANY11325.1
<i>L. reuteri</i> CRL 1101	LX03_09970
<i>L. mucosae</i> CRL 573	CRL753
<i>L. plantarum</i>	ARW34230.1
<i>L. plantarum</i> JDM1	ACT61106.1
<i>L. pentosus</i> MP-10	CCB82841.1
<i>L. plantarum</i> EGD-AQ4	EQM54718.1
<i>L. xiangfangensis</i>	WP_057706267.1
<i>L. herbarum</i>	WP_047998777.1
<i>L. fabifermentans</i> DSM 21115	KRO28875.1
<i>Oenococcus oeni</i> IOEB_0502	KGH72266.1
<i>O. oeni</i>	WP_071445366.1

Secuencias en negrita: secuencias estudiadas en este trabajo de Tesis y secuencias identificadas en la bibliografía

Optimización del protocolo de transformación de CRL 1101

Uno de los principales problemas encontrados en los estudios genéticos de bacterias lácticas es la dificultad para transformar las cepas seleccionadas. El método de elección para introducir ADN exógeno es la electroporación; aunque se han descritos protocolos para una eficiente electroporación para algunas cepas de las especies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus thermophilus*, para otras especies las frecuencias son bajas e incluso nulas (i.e., *Lc. delbrueckii*).

Con el objetivo de definir y optimizar la eficiencia de transformación de *L. reuteri* CRL 1101, se utilizaron distintos plásmidos y se evaluaron diferentes protocolos para generar células electro-competentes. Se utilizaron protocolos descritos por Luchansky y col. (1989), Ausbel F (1999), Turner y col. (1999), Mason y col. (2005), Lo y col. (2009), Stephenson y col. (2011) y combinaciones de algunos de estos métodos.

Tabla 13. Protocolos de transformación utilizados para electroporar *L. reuteri* CRL 1101 y frecuencias obtenidas

Protocolo de Transformación	Condiciones de crecimiento celular	Condiciones de lavado de célula	Parámetros de electroporación	Dilución e incubación	Eficiencia de transformación
<u>Protocolo con NaCl</u> (Ausbel F, 1999)	De un cultivo ON inocular 100 mL de MRS+NaCl 0,7 M al 4 % . Incubar a T° óptima hasta DO _{600nm} de 0,4 o 0,5	Centrifugar 15 min 2.400 xg 4 °C. Lavar 3 veces con agua mili Q (fría), 1 lavado con sacarosa 0,5 M-glicerol 10 % (frío). Resuspender en solución de con sacarosa 0,5 M-glicerol 10 %	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω Capacitancia: 25 µF	MRS vf 800 µL 37 °C 2,5 h	p29cat232Small: 5 x10 ¹ UFC/mL µg ADN
<u>Protocolo con penicilina</u> (Wei y col., 1995; Turner y col., 1999)	Diluir el cultivo ON 66 veces en MRS e incubar hasta DO _{600nm} 0,2 – 0,3. Agregar 1,25 µg/mL de penicilina e incubar 1 h	Centrifugar 15 min 2.400 xg 4 °C. Lavar 2 veces con buffer Na ₃ PO ₄ 5mM-MgCl ₂ 1mM pH 7. Resuspender en Sacarosa 0,9 M-MgCl ₂ 3 mM pH 7,4	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω Capacitancia: 25 µF	MRS vf 800 µL 37 °C 1h agregó Cm 1µg/mL 37 °C 23 h	p29cat232Small: 1,7 x 10 ⁴ UFC/mL µg ADN
<u>Protocolo con glicina</u> (Stephenson y col., 2011)	De un cultivo ON inocular 1/100 en MRS 0,5 % glicina e incubar hasta DO _{590nm} de 0,6	Centrifugar 15 min 2.400 xg 4 °C. Lavar 4 veces con Sacarosa 0.9M- MgCl ₂ 3mM. Resuspender en el mismo buffer	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω Capacitancia: 25 µF	MRS vf 800 µL 37 °C 3 h	p29cat232Small: 8,5 x10 ¹ UFC/mL µg ADN
<u>Protocolo con glicina</u> (Mason y col., 2005)	De un cultivo ON inocular 1/6 en MRS 2 % glicina . Incubar 90 min	Centrifugar 15 min 2.400 xg 4 °C. Lavar 2 veces con H ₂ O miliQ fría. Resuspender en EDTA 0.5M e incubar 5 min en hielo. Lavar 2 veces con Sacarosa 0,3 M. Resuspender en Sacarosa 0,3 M	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω Capacitancia: 25 µF	MRS vf 800 µL 37 °C 3 h	p29cat232Small: 3 x10 ⁰ UFC/mL µg ADN

T°: temperatura vf: volumen final; min: minutos; Cm: cloranfenicol

Protocolo de Transformación	Condiciones de crecimiento celular	Condiciones de lavado de célula	Parámetros de electroporación	Dilución e incubación	Eficiencia de transformación
<u>Protocolo con glicina 2 % y penicilina 0,7 µg/mL</u>	Diluir el cultivo ON 66 veces en MRS 2 % glicina e incubar hasta DO _{600nm} 0,2-0,3. Agregar 0,7 µg/mL de penicilina e incubar 1h	Centrifugar 15 min 2.400 xg 4 °C. Lavar 2 veces con buffer Na ₃ PO ₄ 5mM-MgCl ₂ 1mM pH 7. Resuspender en Sacarosa 0,9 M-MgCl ₂ 3mM pH 7,4	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω Capacitancia: 25 µF	MRS vf 800 µL 37 °C 1 h agrego Cm 1 µg/mL 37 °C 23 h	p29cat232Small: 1 x10 ² UFC/mL µg ADN
<u>Protocolo con glicina 0,5 % y penicilina</u>	Diluir el cultivo ON 66 veces en MRS 0,5 % glicina e incubar hasta DO _{600nm} 0,2-0,3. Agregar 0,7 µg/mL de penicilina e incubar 1h	Centrifugar 15 min 2.400 xg 4 °C. Lavar 2 veces con buffer Na ₃ PO ₄ 5mM-MgCl ₂ 1mM pH 7. Resuspender en Sacarosa 0,9 M-MgCl ₂ 3mM pH 7,4	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω Capacitancia: 25 µF	MRS vf 800 µL 37 °C 1 h agrego Cm 1 µg/mL 37 °C 23 h	p29cat232Small 1,1 x10 ² UFC/mL µg ADN
<u>Protocolo penicilina 0,7 µg/mL</u>	De un cultivo ON (DO _{600nm} aprox. 7) inocular 50 mL de MRS al 1 %, incubar hasta DO _{600nm} 0,2. Agregar penicilina 0,7 µg/mL (conc. final). Continuar incubando a 37°C hasta una DO _{600nm} 0,3-0,4	Centrifugar a 2.400 xg 10 min a 4 °C. Lavar dos veces las células en 5-10 mL de solución Sacarosa 0,5 M – Glicerol 10 %. Resuspender en la misma solución	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω	MRS 800 µL vf 37 °C 2 h	p29cat232Small: 7,4 x10² UFC/mL µg ADN pJP042: 6,4x10⁴ UFC/mL µg ADN
<u>Protocolo glicina 6 %</u>	De un cultivo ON (DO _{600nm} aprox. 7) inocular 50 mL de MRS glicina 6 % al 1 %, incubar en estufa a 37 °C hasta una DO _{600nm} 0,2-0,3	Centrifugar a 2.400 xg 10 min a 4 °C. Lavar dos veces las células en 5-10 mL de solución Sacarosa 0,5 M – Glicerol 10 %. Resuspender en la misma solución	Voltaje: 1,8 kV Resistencia: 600 Ω	MRS 800 µL vf 37 °C 2 h	p29cat232Small: 2 x10 ² UFC/mL µg ADN

vf: volumen final; min: minutos; Cm: cloranfenicol

Se aplicaron distintos debilitadores de la pared celular de este microorganismo como NaCl, penicilina y glicina, en distintas concentraciones. También se probaron distintas condiciones de electroporación: 600 Ω 25 μ F 1,8 o 2,5 kV y a 200 Ω 25 μ F 1,8 y 2,5 kV. Todos los protocolos utilizados están descriptos en la Tabla 12. Se utilizaron además distintos plásmidos [pGhost (Biswas y col., 1993; Maguin y col., 1996), pRV85 (Gory y col., 2001), pRV300 (Simões-Barbosa y col., 2004), p3B1 (Cuozzo, 2002), pTVC_lac (Poyart y Trieu-Cuot, 1997), p29cat232Small (Walter y col., 2003), pJP042 (van Pijkeren y Britton, 2012), pNZ124 (Platteeuw y col., 1994). El mejor rendimiento fue con el protocolo en el que se utiliza penicilina 0,7 μ g/mL y las condiciones de electroporación 600 Ω 25 μ F 1,8 kV, obteniendo una eficiencia de **7,4 x10² UFC/mL μ g ADN** con el plásmido p29cat232Small (Walter y col., 2003) y **6,4x10⁴ UFC/mL μ g ADN** con el plásmido pJP042 (van Pijkeren y Britton, 2012).

Aislamientos de mutación del gen *mdh* y *ldh* en *L. reuteri* CRL 1101

Técnica de *recombineering*

Con el objetivo de estudiar la relación entre la producción de manitol y el gen *mdh* identificado en CRL 1101, se planteó generar cepas deficientes en el mencionado gen. Para generar estas mutantes en CRL 1101 se utilizó la técnica de *recombineering* descrita por van Pijkeren y Britton (2012). Esta técnica se basa en la utilización de un plásmido que posee un gen que codifica para la proteína RecT y oligonucleótidos que son idénticos a la hebra rezagada, pero contienen algunas bases modificadas que son las que van a incorporar en el proceso de replicación del ADN generando la mutación. Estos oligonucleótidos van a ser transformados en la célula, que contiene el plásmido que expresa la proteína RecT cuya función es proteger al mismo de la degradación por parte de la célula huésped, y se van a incorporar en el ADN como un fragmento de Okazaki durante la replicación (Fig. 33). Las mutantes son identificadas a través de la de la reacción MAMA PCR (*Mismatch Amplification Mutation Assay* PCR) descrita por Qiang y col. (2002). Esta técnica se basa en una PCR en la que se utilizan tres *primers*, un par de *primers* que amplifica el gen o el sector que posea la mutación puntual y un

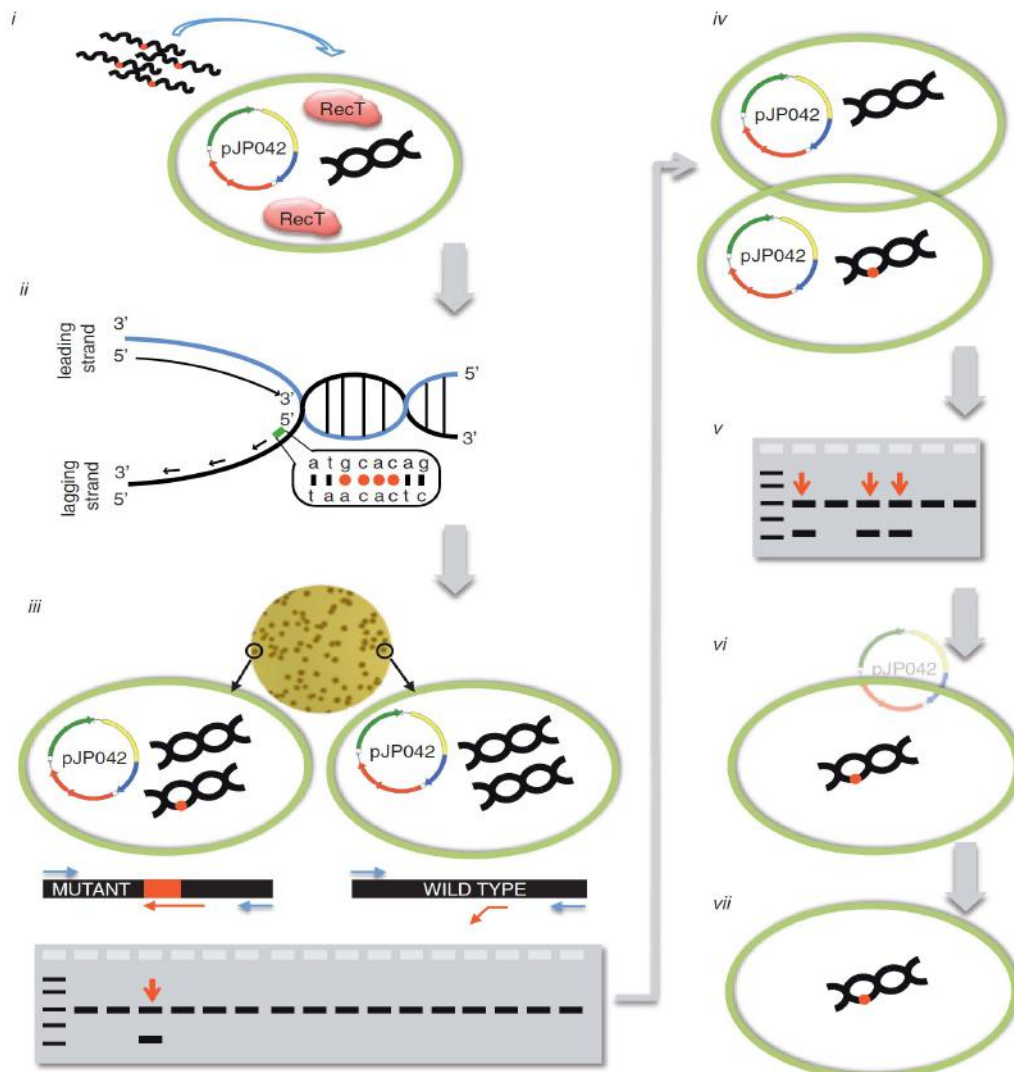


Figura 33. Técnica de *recombineering* descrita por Van Pijkeren y Britton 2012

(i) Células electro-competentes en donde RecT es expresado por el plásmido pJP042 son transformadas con el oligonucleótido. Las líneas onduladas negras con un punto rojo representan el oligonucleótido con las bases para la mutación, en verde se representa a la célula bacteriana, la doble hélice negra representa el ADN cromosómico, la expresión de RecT está indicada dentro de la célula. (ii) El oligonucleótido es integrado al ADN cromosómico como un fragmento de Okazaki. (iii) Las células son recuperadas en placas libre de antibiótico y la recombinación es detectada por MAMA PCR. Dos cebadores representados como flechas azules amplificarán un fragmento de 1 Kb, mientras un tercer cebador representado como flecha roja solo amplificará en caso de que la mutación se encuentre en el ADN generando un amplicón de 500 pb. Como el oligonucleótido de recombinación solo se dirige a una hebra durante la replicación del ADN, las colonias serán de genotipo mixto. El punto rojo en el cromosoma indica que las mutaciones se incorporan. (iv) Se realiza una purificación de una sola colonia para separar el genotipo de tipo salvaje del genotipo mutante. (v) La reacción de MAMA-PCR se repite como se describe en la sección iii para identificar un genotipo puro mutante (vi) El plásmido pJP042 puede ahora ser curado de la cepa mutante con repiques de las bacterias sin selección de antibióticos para producir un derivado exento de plásmido (vii). Imagen tomada de van Pijkeren y Britton (2012).

tercer cebador que tiene la mutación puntual y solo amplifica si la mutación está presente en el ADN tal como se muestra en la Fig. 33.

Primero se transformó la cepa CRL 1101 con el plásmido pJP042, que posee la proteína RecT y luego se transformó con el oligonucleótido oJP577 (utilizado en la técnica como control), que genera una mutación en la RNA polimerasa haciéndola resistente a rifampicina. Se obtuvieron $1,68 \times 10^3$ UFC/mL (1,5 %) resistentes a Rf (25 μ g/mL), demostrando de esta manera que la técnica de *recombineering* funciona, pero en una baja frecuencia en CRL 1101.

El oligonucleótido **omdh** (Materiales y Métodos, *primers*), para generar una cepa deficiente en actividad MDH se diseñó con dos codones *stop* sucesivos con el objetivo de generar dos proteínas de 174 y 58 aa no funcionales (Fig. 34).

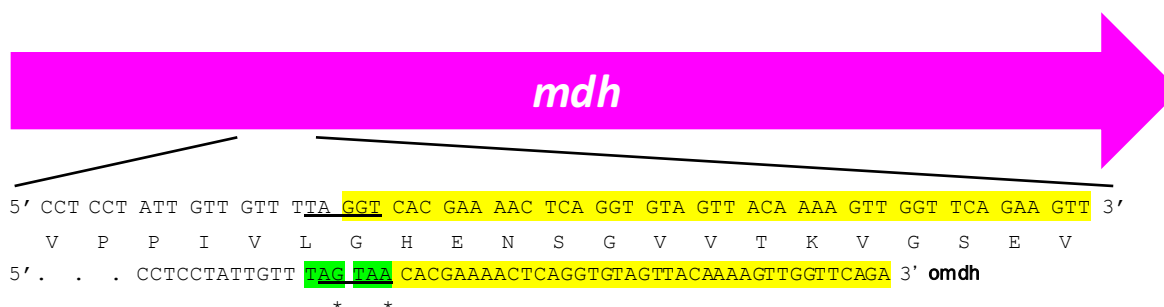


Figura 34. Diseño del oligonucleótido omdh

En rosa se representa el gen *mdh* de CRL 1101, la primera secuencia de nucleótidos es la secuencia original, luego la secuencia de aminoácidos original y al final la secuencia del oligonucleótido con los dos codones *stop* consecutivos (resaltados en verde), el resto de la secuencia es idéntica a la original (resaltado en amarillo).

Luego de electroporar la cepa CRL 1101 (pJP042) con el oligonucleótido **omdh**, se evaluaron las potenciales células recombinantes a través de la reacción MAMA PCR. Se picaron más de 300 colonias, se realizaron las MAMA PCR con los cebadores Jb-*mdh*-F y Jr (2398 pb) como control y el *primer* MDHm-f' para detectar la mutación generando un amplicon de 1191 pb con el cebador Jr. Las reacciones de MAMA PCR fueron sembradas en un gel de agarosa al 0,8 % (Fig. 35 primer aislamiento). Las colonias que amplificaron con el cebador que detecta la mutación en *mdh*, fueron re-estriadas con el objetivo de que la mutación esté presente en las dos hebras del ADN,

como se dijo anteriormente los oligonucleótidos se insertan como fragmento de Okazaki por lo que es necesario una segunda replicación del ADN para que la mutación puntual este en ambas hebras. Se picaron más de 50 colonias y se realizaron las reacciones de MAMA PCR de las mismas, se sembraron las amplificaciones en un gel de agarosa (Fig. 35 segundo aislamiento).

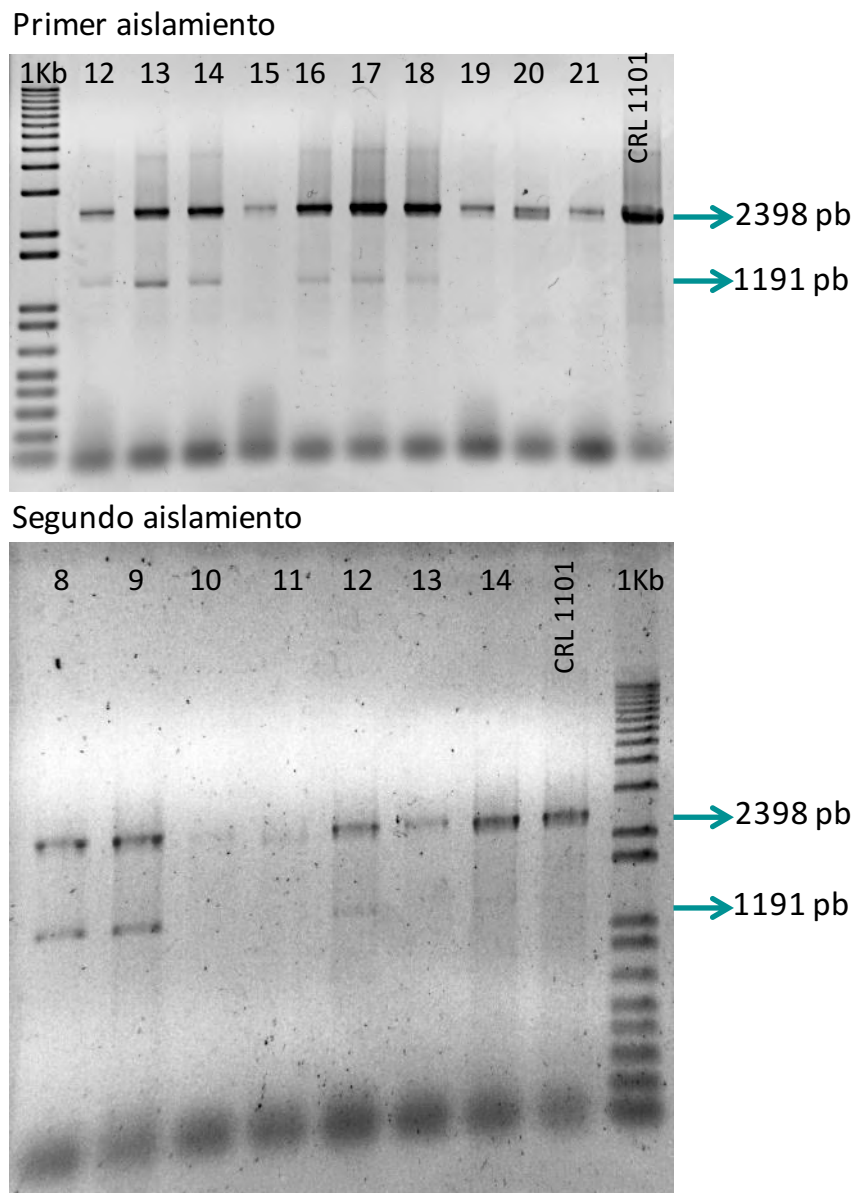


Figura 35. Fotos de los gels de MAMA-PCR de las colonias picadas, técnica *recombineering*
 Primer aislamiento: en las calles se observan los números de las cepas picadas y el control CRL 1101; las cepas 12, 13, 14, 16, 17, 18 son las putativas recombinantes; las cepas 15, 19, 20 y 21 son colonias que no recombinaron.
 Segundo aislamiento: en las calles se observan los números de las cepas picadas luego del segundo aislamiento y el control CRL 1101; las cepas 8, 9 y 12 provienen de colonias que habrían recombinado.

Una de las colonias que dio positivo para la reacción MAMA PCR en el segundo aislamiento (CRL 1101 13-8) se seleccionó para estudiar la actividad MDH. Para ello la posible recombinante y el control (CRL 1101) fueron crecidas por 8 h a 37 °C en MRS (glu 7 % condición a) y MRS con fructosa (glu 2 % y fru 5 % condición b) para utilizar los extractos celulares y medir actividad MDH. Estudios previos (Ortiz, 2014) demostraron que la cepa control presenta mayor actividad a las 8 h y en medio MRS con glu 2 % fru 5 %. La putativa mutante presentó actividad MDH similar a la cepa control (a: 0,87-0,67 y b: 2,37-2,83) como se muestra en la Figura 36. Se secuenció el gen *mdh* de la putativa mutante y se corroboró que no presentan los codones *stop* diseñados en el oligonucleótido. Las posibles causas de no encontrar las mutantes serían los inconvenientes a la hora de identificar las mutantes por MAMA PCR y la baja frecuencia que tuvimos de la técnica en sí, o al diseño del oligonucleótido que podría no haber sido el adecuado, que la mutación generada no afecte la actividad MDH (como parecería suceder en CRL 573) o que la cepa CRL 1101 posee más de una función MDH. Es por ello que se decidió utilizar la técnica de simple recombinación para generar las mutaciones que permita una selección eficiente.

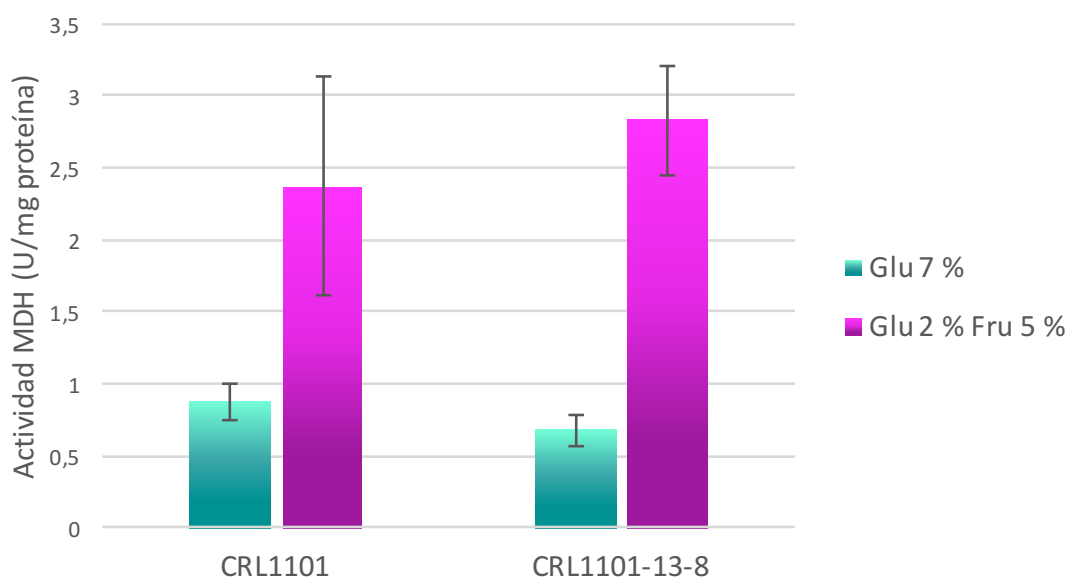


Figura 36. Actividad MDH específica de la cepa CRL 1101 y la putativa recombinante CRL 1101-13-8

Técnica de recombinación simple

Se buscó generar la mutante en el gen *mdh* mediante la técnica de simple recombinación utilizando el vector no replicativo en gram positivas pRV300 (Leloup y col., 1997). El vector de inserción p::ldhCRL1101, que contiene un fragmento de aproximadamente 400 pb internos del gen *ldh* de CRL 1101, que se generó de la forma descrita en la Fig. 37. El plásmido recombinante p::ldhCRL1101 fue electroporado en células electro-competentes de CRL 1101. Para seleccionar las mutantes se utilizaron distintas concentraciones de eritromicina. Sin embargo, no se logró aislar ninguna cepa que posea inserto el plásmido generando la interrupción del gen *ldh*. Para esta técnica existen diversos inconvenientes; uno es la eficiencia de transformación del plásmido, podría ser que no estaría ingresando a la célula, por otro lado, que no se esté produciendo la recombinación o problemas con la sensibilidad a Em de esta cepa.

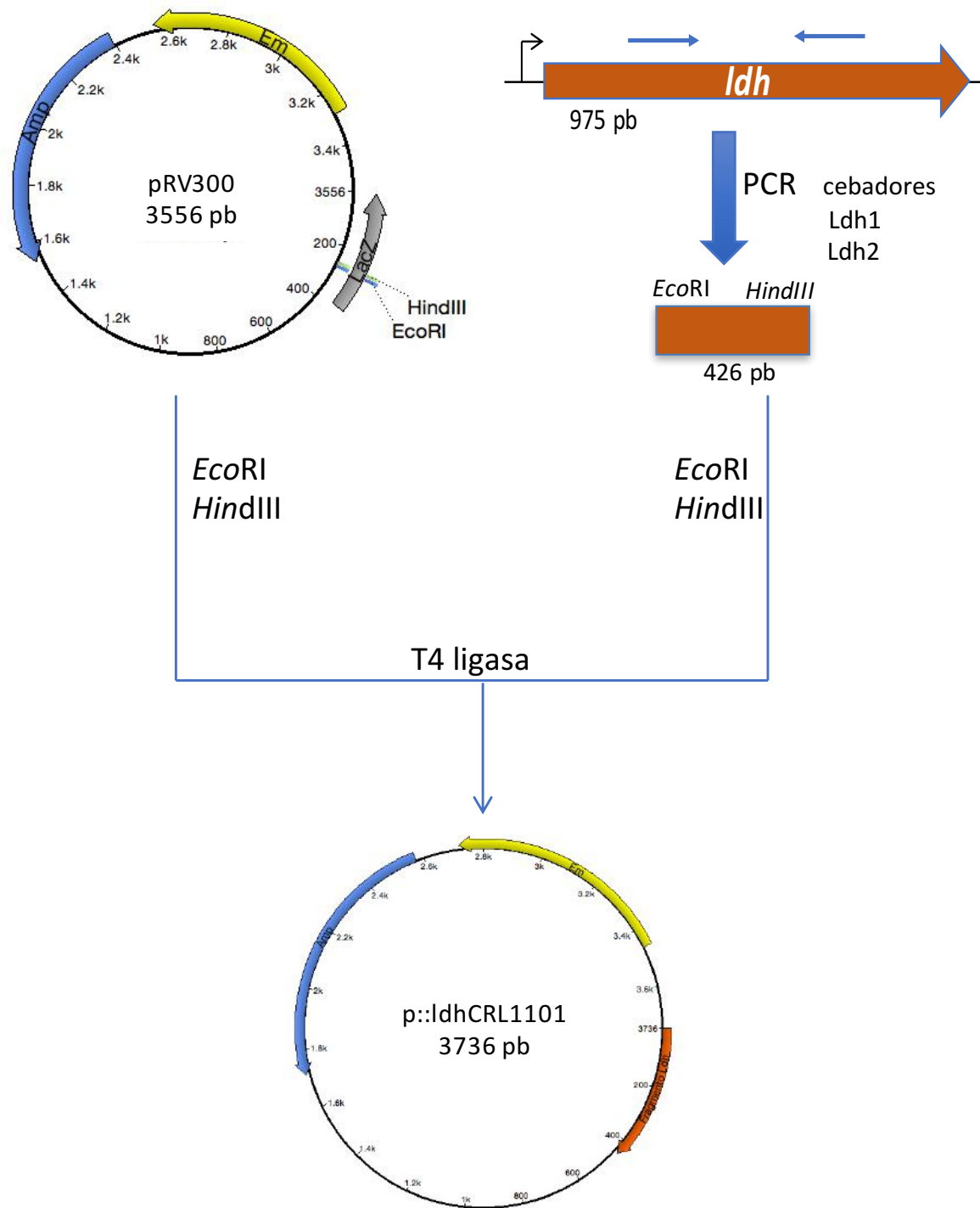


Figura 37. Construcción del plásmido p::ldhCRL1101

BIBLIOGRAFÍA

- Aarnikunnas, J., Rönholm, K., & Palva, A. (2002). The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 665-671.
- Aarnikunnas, J., von Weymarn, N., Rönholm, K., Leisola, M., & Palva, A. (2003). Metabolic engineering of *Lactobacillus fermentum* for production of mannitol and pure L-lactic acid or pyruvate. *Biotechnology Bioengineering*, 82(6), 653-663.
- Abreu-Goodger, C., & Merino, E. (2005). RibEx: a web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W690-692.
- Adachi, O., Toyama, H., & Matsushita, K. (1999). Crystalline NADP-dependent D-mannitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(2), 402-407.
- Akinterinwa, O., Khankal, R., & Cirino, P. C. (2008). Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Current Opinion Biotechnology*, 19(5), 461-467.
- Årsköld, E., Lohmeier-Vogel, E., Cao, R., Roos, S., Rådström, P., & van Niel, E. W. (2008). Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 206-212.
- Ausbel F, B. R., Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. (1999). A compendium of methods from current protocols in molecular biology. In B. R. Ausbel F, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K (Ed.), *Short Protocols in Molecular Biology* (4th ed.).
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9, 75-75.
- Bernard, N., Ferain, T., Garmyn, D., Hols, P., & Delcour, J. (1991). Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS letters*, 290(1-2), 61-64.
- Bernard, N., Johnsen, K., Ferain, T., Garmyn, D., Hols, P., Holbrook, J. J., & Delcour, J. (1994). NAD⁺-dependent d-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *The FEBS Journal*, 224(2), 439-446.
- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3628-3635.
- Bleckwedel, J., Terán, L. C., Bonacina, J., Saavedra, L., Mozzi, F., & Raya, R. R. (2014). Draft Genome Sequence of the Mannitol-Producing Strain *Lactobacillus mucosae* CRL573. *Genome Announcements*, 2(6), e01292-01214.
- Brünker, P., Altenbuchner, J., Kulbe, K. D., & Mattes, R. (1997). Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas*

- fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1351(1), 157-167.
- Buchan, D. W., Minneci, F., Nugent, T. C., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W349-W357.
- Burger, A., Henck, J. O., Hetz, S., Rollinger, J. M., Weissnicht, A. A., & Stöttner, H. (2000). Energy/temperature diagram and compression behavior of the polymorphs of D-mannitol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(4), 457-468.
- Carvalho, F., Moniz, P., Duarte, L. C., Esteves, M. P., & Gírio, F. M. (2011). Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(1), 221-227.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo XVIII: aditivos alimentarios. 2007, actualización 01/2014.
- Cummings, J., & Stephen, A. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(S1), S5.
- Cuozzo, S. (2002). *Estudio genético de lactocina 705, una bacteriocina producida por Lactobacillus casei CRL 705* (Tesis Doctoral), UNT Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- Daviskas, E., Anderson, S. D., Jaques, A., & Charlton, B. (2010). Inhaled mannitol improves the hydration and surface properties of sputum in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 137(4), 861-868.
- Debord, B., Lefebvre, C., Guyot-Hermann, A. M., Hubert, J., Bouché, R., & Cuyot, J. C. (1987). Study of different crystalline forms of mannitol: comparative behaviour under compression. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 13(9-11), 1533-1546.
- Devos, F. (1995). Process for the manufacture of mannitol: Google Patents.
- Doerrler, W. T., Sikdar, R., Kumar, S., & Boughner, L. A. (2013). New functions for the ancient DedA membrane protein family. *Journal of Bacteriology*, 195(1), 3-11.
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M. & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S27-S48.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csörgő, B., Pósfai, G., Weinstock, G. M. & Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597-2606.
- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubière & P. Gruss, A. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4509-4516.

- Endo, A., Irisawa, T., Futagawa-Endo, Y., Sonomoto, K., Itoh, K., Takano, K., Okada, S. & Dicks, L. M. (2011). *Fructobacillus tropaeoli* sp. nov., a fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 898-902.
- Endo, A., & Okada, S. (2008). Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), 2195-2205.
- Endo, A., Tanaka, N., Oikawa, Y., Okada, S., & Dicks, L. (2014). Fructophilic characteristics of *Fructobacillus* spp. may be due to the absence of an alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*). *Current Microbiology*, 68(4), 531-535.
- Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P., & Delcour, J. (1994). *Lactobacillus plantarum* *ldhL* gene: overexpression and deletion. *Journal of Bacteriology*, 176(3), 596-601.
- Ferain, T., Hobbs, J. N., Richardson, J., Bernard, N., Garmyn, D., Hols, P., Allen, N. E. & Delcour, J. (1996). Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 178(18), 5431-5437.
- Fontes, C. P., Honorato, T. L., Rabelo, M. C., & Rodrigues, S. (2009). Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(4), 493-499.
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. R. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 31(6), 764-788.
- Gaspar, P., Neves, A. R., Gasson, M. J., Shearman, C. A., & Santos, H. (2011). High yields of 2, 3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD⁺ cofactor recycling. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6826-6835.
- Gaspar, P., Neves, A. R., Ramos, A., Gasson, M. J., Shearman, C. A., & Santos, H. (2004). Engineering *Lactococcus lactis* for production of mannitol: high yields from food-grade strains deficient in lactate dehydrogenase and the mannitol transport system. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1466-1474.
- Gory, L., Montel, M.-C., & Zagorec, M. (2001). Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS Microbiology Letters*, 194(2), 127-133.
- Grand View Research, I. <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/mannitol-market> (17 Septiembre 2017).
- Hahn, G., Kaup, B., Bringer-Meyer, S., & Sahm, H. (2003). A zinc-containing mannitol-2-dehydrogenase from *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: purification of the enzyme and cloning of the gene. *Archives of Microbiology*, 179(2), 101-107.
- Halász, A. (2009). Lactic acid bacteria. *Food Quality and Standards*, 3, 70-82.
- Hammes, W. P., & Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (pp. 19-54): Springer.

BIBLIOGRAFÍA

- Hebert, E. M., Saavedra, L., & Ferranti, P. (2010). Bioactive peptides derived from casein and whey proteins. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 233-249.
- Helanto, M., Aarnikunnas, J., von Weymarn, N., Airaksinen, U., Palva, A., & Leisola, M. (2005). Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Journal of Biotechnology*, 116(3), 283-294.
- Heuser, F., Marin, K., Kaup, B., Bringer, S., & Sahm, H. (2009). Improving d-mannitol productivity of *Escherichia coli*: impact of NAD, CO₂ and expression of a putative sugar permease from *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *Metabolic Engineering*, 11(3), 178-183.
- Howaldt, M., Gottlob, A., Kulbe, K. D., & Chmiel, H. (1988). Simultaneous conversion of glucose/fructose mixtures in a membrane reactor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 542(1), 400-404.
- Huang, Y., You, C., & Liu, Z. (2017). Cloning of d-lactate dehydrogenase genes of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and their roles in d-lactic acid production. *3 Biotech*, 7(3), 194.
- Hughenoltz, J. (2008). The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal*, 18(5), 466-475.
- Johnson, J. C. (1976). *Specialized sugars for the food industry*: Noyes Data Corporation.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, 292(2), 195-202.
- Kang, T. S., Korber, D. R., & Tanaka, T. (2013). Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1. *AMB Express*, 3(1), 10.
- Karsten, U., Barrow, K. D., Nixdorf, O., West, J. A., & King, R. J. (1997). Characterization of mannitol metabolism in the mangrove red alga *Caloglossa leprieurii* (Montagne) J. Agardh. *Planta*, 201(2), 173-178.
- Kaup, B., Bringer-Meyer, S., & Sahm, H. (2004). Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(3), 333-339.
- Kets, E., Galinski, E. A., De Wit, M., De Bont, J., & Heipieper, H. J. (1996). Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *Journal of Bacteriology*, 178(23), 6665-6670.
- Korakli, M., & Vogel, R. F. (2003). Purification and characterisation of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 281-286.
- Kulbe, K. D., Schwab, U., & Gudernatsch, W. (1987). Enzyme-catalyzed production of mannitol and gluconic acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 506(1), 552-568.

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Ladero, V., Ramos, A., Wiersma, A., Goffin, P., Schanck, A., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., Smid, E. J. & Hols, P. (2007). High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1864-1872.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rodland, E. A., Staerfeldt, H. H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35(9), 3100-3108.
- Landete, J. M., Arques, J. L., Peiroten, A., Langa, S., & Medina, M. (2014). An improved method for the electrotransformation of lactic acid bacteria: A comparative survey. *Journal Microbiology Methods*, 105, 130-133.
- Laslett, D., & Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 11-16.
- Lawson, M. E. (1997). Sugar alcohols. In K. J. a. H.-G. M (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (John Wiley & Sons Inc., New York, USA ed., Vol. 23, pp. 93-119).
- Ledgham, F., Quest, B., Vallaey, T., Mergeay, M., & Covès, J. (2005). A probable link between the DedA protein and resistance to selenite. *Research in microbiology*, 156(3), 367-374.
- Lee, W. T., Flynn, T., Lyons, C., & Levy, H. (1991). Cloning of the gene and amino acid sequence for glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(20), 13028-13034.
- Leloup, L., Ehrlich, S. D., Zagorec, M., & Morel-Deville, F. (1997). Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacl* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2117-2123.
- Lerch, H.-P., Blöcker, H., Kallwass, H., Hoppe, J., Hsin, T., & Collins, J. (1989). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase gene of *Lactobacillus casei*. *Gene*, 78(1), 47-57.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Li, X., Feng, H. Q., Pang, X. Y., & Li, H. Y. (2008). Mesosome formation is accompanied by hydrogen peroxide accumulation in bacteria during the rifampicin effect. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 311(1), 241-247.
- Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *Journal of applied microbiology*, 99(4), 783-793.
- Liu, S., Saha, B., & Cotta, M. (2005). Cloning, expression, purification, and analysis of mannitol dehydrogenase gene *mtlK* from *Lactobacillus brevis*. *Applied biochemistry and Biotechnology*, 121(1-3), 391-401.

- Livesey, G. (2003). Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutrition Research Reviews*, 16(02), 163-191.
- Lo, R., Turner, M. S., Barry, D. G., Sreekumar, R., Walsh, T. P., & Giffard, P. M. (2009). Cystathionine γ -lyase is a component of cystine-mediated oxidative defense in *Lactobacillus reuteri* BR11. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1827-1837.
- LPSN. (2017). <http://www.bacterio.net/-taxonomy.html> (18 de agosto).
- Lucey, C., & Condon, S. (1986). Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*. *Journal of General Microbiology*, 132, 1789-1796.
- Luchansky, J. B., Kleeman, E. G., Raya, R. R., & Klaenhammer, T. R. (1989). Genetic transfer systems for delivery of plasmid deoxyribonucleic acid to *Lactobacillus acidophilus adh*: conjugation, electroporation, and transduction. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1408-1417.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. D., & Gruss, A. (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(3), 931-935.
- Maicas, S., Ferrer, S., & Pardo, I. (2002). NAD (P) H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology*, 148(1), 325-332.
- Makkee, M., Kieboom, A., & Van Bekkum, H. (1985). Production Methods of D-Mannitol. *Starch-Stärke*, 37(4), 136-141.
- Malleret, C., Lauret, R., Ehrlich, S. D., Morel-Deville, F., & Zagorec, M. (1998). Disruption of the sole *IdhL* gene in *Lactobacillus sakei* prevents the production of both L- and D-lactate. *Microbiology*, 144(12), 3327-3333.
- Martinez, G., Barker, H., & Horecker, B. (1963). A specific mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Journal of Biological Chemistry*, 238(5), 1598-1603.
- Mason, C. K., Collins, M. A., & Thompson, K. (2005). Modified electroporation protocol for *Lactobacilli* isolated from the chicken crop facilitates transformation and the use of a genetic tool. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3), 353-363.
- Mayo, B., Aleksandrzyk-Piekarczyk T, Fernández M, Kowalczyk M, Álvarez-Martín P, & J, B. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In R. R. Mozzi F, Vignolo G (Eds.) Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA (Ed.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications* (pp. 273-287).
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., & Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1216-1236.
- Miller, G. (2002). Breaking down barriers. *Science*, 297(5584), 1116-1118.
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289-298.
- Monedero, V., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2010). Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1003-1015.

- Mozzi, F., Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., De Vuyst, L., & Pescuma, M. (2013). Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International*, 54(1), 1152-1161.
- Munster, I. V., & Nagengast, F. M. (1993). The role of carbohydrate fermentation in colon cancer prevention. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 28(sup200), 80-86.
- Neves, A. R., Ramos, A., Shearman, C., Gasson, M. J., Almeida, J. S., & Santos, H. (2000). Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo ¹³C-NMR. *European Journal of Biochemistry*, 267(12), 3859-3868.
- Neves, A. R., Ventura, R., Mansour, N., Shearman, C., Gasson, M. J., Maycock, C., Ramos, A. & Santos, H. (2002). Is the glycolytic flux in *Lactococcus lactis* primarily controlled by the redox charge? kinetics of NAD⁺ and NADH pools determined in vivo by ¹³C NMR. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 28088-28098.
- Nidetzky, B., Haltrich, D., Schmidt, K., Schmidt, H., Weber, A., & Kulbe, K. D. (1996). Simultaneous enzymatic synthesis of mannitol and gluconic acid: II. Development of a continuous process for a coupled NAD (H)-dependent enzyme system. *Biocatalysis and Biotransformation*, 14(1), 47-65.
- Niehaus, W., & Dilts, R. (1982). Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Bacteriology*, 151(1), 243-250.
- Nissen, L., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2005). Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain expressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 177-183.
- Nonet, M. L., Marvel, C. C., & Tolan, D. R. (1987). The *hisT-purF* region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Identification of additional genes of the *hisT* and *purF* operons. *Journal of Biological Chemistry*, 262(25), 12209-12217.
- Ojamo, H., Koivikko, H., & Heikkilä, H. (2003). Process for the production of mannitol by immobilized micro-organisms: Google Patents.
- Ortiz, M. E. (2014). *Producción de manitol por bacterias lácticas*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Tucumán.
- Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., Raya, R. R., & Mozzi, F. (2013). Biotechnological and in situ food production of polyols by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 4713-4726.
- Ortiz, M. E., Fornaguera, M. J., Raya, R. R., & Mozzi, F. (2012). *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 highly produces mannitol from sugarcane molasses as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(4), 991-999.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R. M., Choudhuri, J. V., Chuang, H.-Y., Cohoon, M., de Crécy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., Fonstein, M., Frank, E. D., Gerdes, S., Glass, E. M., Goesmann, A., Hanson, A., Iwata-Reuyl, D., Jensen, R., Jamshidi, N., Krause, L., Kubal, M., Larsen, N., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Neuweger, H., Olsen, G., Olson, R., Osterman, A., Portnoy, V., Pusch, G.D., Rodionov, D. A., Rückert, C., Steiner, J., Stevens, R., Thiele, I., Vassieva, O., Ye, Y., Zagnitko, O., &

- Vonstein, V. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5691-5702.
- Patra, F., Tomar, S. K., & Arora, S. (2009). Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 74(1), R16-R23.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86.
- Platteuw, C., Simons, G., & de Vos, W. M. (1994). Use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 587-593.
- Pontes, D. S., De Azevedo, M. S. P., Chatel, J.-M., Langella, P., Azevedo, V., & Miyoshi, A. (2011). *Lactococcus lactis* as a live vector: heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expression and Purification*, 79(2), 165-175.
- Poyart, C., & Trieu-Cuot, P. (1997). A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to β -galactosidase in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 156(2), 193-198.
- Qiang, Y. Z., Qin, T., Fu, W., Cheng, W. P., Li, Y. S., & Yi, G. (2002). Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(3), 549-552.
- Racine, F. M., & Saha, B. C. (2007). Production of mannitol by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693 in fed-batch and continuous cell-recycle fermentations. *Process Biochemistry*, 42(12), 1609-1613.
- Rapoport, S. I. (2001). Advances in osmotic opening of the blood-brain barrier to enhance CNS chemotherapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 10(10), 1809-1818.
- Rico, J., Yebra, M. J., Pérez-Martínez, G., Deutscher, J., & Monedero, V. (2008). Analysis of *ldh* genes in *Lactobacillus casei* BL23: role on lactic acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(6), 579-586.
- Rodríguez, C., Rimaux, T., Fornaguera, M. J., Vrancken, G., de Valdez, G. F., De Vuyst, L., & Mozzi, F. (2012). Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2519-2527.
- Ruiz Rodriguez, L. G., Aller, K., Bru, E., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2017). Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034. *Applied Microbiology Biotechnology*, 101 (15), 6165-6177.
- Ruiz-Rodríguez, L., Bleckwedel, J., Eugenia Ortiz, M., Pescuma, M., & Mozzi, F. (2017). Lactic Acid Bacteria. *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, 395-451.
- Saha, B. C. (2004). Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus intermedius*. *Biotechnology Progress*, 20(2), 537-542.
- Saha, B. C., & Racine, F. M. (2011). Biotechnological production of mannitol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 879-891.

- Sakai, S., & Yamanaka, K. (1968). Crystalline d-Mannitol: NAD Oxidoreductase from *Leuconostoc mesenteroides*: Part II. Substrate and Coenzyme Specificity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32(7), 894-899.
- Salminen, S., & Hallikainen, A. (2002). Sweeteners. In D. Branen AL, PM, Salminen S and Thorngate JH (Ed.), *Food Additives* (pp. 451-456): Marcel Dekker Ink., New York, USA.
- Sambrook, J., Maniatis, T., & Fritsch, E. F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2 ed.): Cold Spring harbor laboratory Cold Spring Harbor, New York, USA:
- Santhana Raj, L., Hing, H. L., Baharudin, O., Teh Hamidah, Z., Aida Suhana, R., Nor Asiha, C. P., Vimala, B., Paramsarvaran, S. Sumarni, G. & Hanjeet, K. (2007). Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Trop Biomed*, 24(1), 105-109.
- Sasaki, Y., Laivenieks, M., & Zeikus, J. G. (2005). *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608 *mdh* gene cloning and recombinant mannitol dehydrogenase characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 36-41.
- Schiweck, H., Bär A, Vogel R, Schwarz E, Kunz M, Dusautois C, Clement A, Lefranc C, Lüssem B, Moser M. & Peters S (2012). Sugar alcohols. In W. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (7 ed., pp. 1-37).
- Schiweck H, B. r. A., Vogel R, Schwarz E, Kunz M, Dusautois C, Clement A, Lefranc C, Lüssem B, Moser M, Peters S. (1994). Sugar alcohols. In H. S. Elvers B, Russey W (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (pp. 413–437): Wiley-VCH, Weinheim.
- Schneider, K. H., Giffhorn, Friedrich. (1989). Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *The FEBS Journal*, 184(1), 15-19.
- Schwarz, E. (1994). Sugar alcohols: mannitol. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 423-426.
- Shen, B., Jensen, R. G., & Bohnert, H. J. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology*, 115(2), 527-532.
- Simões-Barbosa, A., Abreu, H., Silva Neto, A., Gruss, A., & Langella, P. (2004). A food-grade delivery system for *Lactococcus lactis* and evaluation of inducible gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 61-67.
- Slatner, M., Nagl, G., Haltrich, D., Kulbe, K. D., & Nidetzky, B. (1998). Enzymatic production of pure D-mannitol at high productivity. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16(5), 351-363.
- Soetaert, W. (1990). Production of mannitol with *Leuconostoc mesenteroides*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*, 55(4), 1549-1552.
- Soetaert, W., Buchholz, K., & Vandamme, E. (1995). Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation by *Leuconostoc mesenteroides*. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 6 (1), 41-44.

- Soetaert W, V. P., Vandamme EJ (1999). The production of mannitol by fermentation. In B. C (Ed.), *Carbohydrate Biotechnology Protocols* (Vol. 10, pp. 261-275). Totowa, New Jersey, USA.
- Song, S. H., & Vieille, C. (2009). Recent advances in the biological production of mannitol. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84(1), 55-62.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 198-203.
- Steidler, L., & Rottiers, P. (2006). Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072(1), 176-186.
- Stephenson, D. P., Moore, R. J., & Allison, G. E. (2011). Transformation of, and heterologous protein expression in, *Lactobacillus agilis* and *Lactobacillus vaginalis* isolates from the chicken gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), 220-228.
- Thorne, K. J. I., & Barker, D. C. (1969). Bactoprenol, ATPase and Acetate Activating Enzymes of a Vesicular Fraction from *Lactobacillus casei*. *European Journal of Biochemistry*, 11(3), 582-591.
- Turner, M. S., Woodberry, T., Hafner, L. M., & Giffard, P. M. (1999). The *bspA* locus of *Lactobacillus fermentum* BR11 encodes an L-cystine uptake system. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2192-2198.
- Van Loveren, C. (2004). Sugar alcohols: what is the evidence for caries-preventive and caries-therapeutic effects? *Caries Research*, 38(3), 286-293.
- van Pijkeren, J.-P., & Britton, R. A. (2012). High efficiency recombineering in lactic acid bacteria. *Nucleic Acids Research*, 40(10), e76-e76.
- Viana, R., Yebra, M. J., Galán, J. L., Monedero, V., & Pérez-Martínez, G. (2005). Pleiotropic effects of lactate dehydrogenase inactivation in *Lactobacillus casei*. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 641-649.
- Viihari, L., & Korhola, M. (1986). Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 471-476.
- von Weymarn, N. (2002). *Process development for mannitol production by lactic acid bacteria*. (Tesis Doctoral), Helsinki University of Technology.
- von Weymarn, N., Hujanen, M., & Leisola, M. (2002). Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 37(11), 1207-1213.
- Vrancken, G., Rimaux, T., De Vuyst, L., & Mozzi, F. (2010). Low-calorie sugars produced by lactic acid bacteria *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications*. (pp. 193-209). Wiley-Blackwell, Ames, USA.
- Walter, J., Heng, N. C. K., Hammes, W. P., Loach, D. M., Tannock, G. W., & Hertel, C. (2003). Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2044-2051.

- Wei, M.-Q., Rush, C. M., Norman, J. M., Hafner, L. M., Epping, R. J., & Timms, P. (1995). An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *Journal of Microbiological Methods*, 21(1), 97-109.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A. F., & Kula, M. R. (1981). Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotechnology Bioengineering*, 67(6), 791-804.
- Wisselink, H., Weusthuis, R., Eggink, G., Hugenholtz, J., & Grobber, G. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12(2), 151-161.
- Wisselink, H. W., Mars, A. E., Van Der Meer, P., Eggink, G., & Hugenholtz, J. (2004). Metabolic engineering of mannitol production in *Lactococcus lactis*: influence of overexpression of mannitol 1-phosphate dehydrogenase in different genetic backgrounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4286-4292.
- Xin, L., Lipeng, Y., Jiaju, Q., Hanqing, F., Yunhong, L., Min, Z., Yuxian, Z. & Hongyu, L. (2014). Revisiting the Mesosome as a Novel Site of Hydrogen Peroxide Accumulation in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 69(4), 549-553.
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., & Uden, G. (2006). Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(3), 421-429.