



03088 4
29

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UACPyP/CCH

Papel fisiológico de las isoenzimas de
piruvato cinasa de *Escherichia coli*
en el metabolismo celular.

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
Presenta:
M. en C. Elizabeth Ponce Rivas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Morelos 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Designado:

PRESIDENTE: Dr. Francisco Bolívar Zapata

SECRETARIO: Dr. Xavier Soberón Mainero

VOCAL: Dr. Antonio Peña Díaz

VOCAL: Dr. David Romero Camarena

VOCAL: Dr. Miguel Lara Flores

SUPLENTE: Dra. Guadalupe Espín Ocampo

SUPLENTE: Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la supervisión de los Doctores Francisco Bolívar Zapata y Fernando Valle Baheza.

ABSTRACT

Several mutants in the pyruvate kinase structural genes (*pykA* and *pykF*) and in the phosphotransferase system were used to study the role of the pyruvate kinase isoenzymes from *Escherichia coli* on pyruvate biosynthesis. These mutants were evaluated at a fermentation level using glucose as the only carbon source as well as in solid medium supplemented with several glycolytic and gluconeogenic carbon sources. Contrarily to some previous reports, the results showed that the cell needs both pyruvate kinases (PykA and PykF) to reach the same growth rate as the wild type strain. These enzymes are also important throughout all the life cycle of the microorganism and not only in a particular phase. Furthermore, the PykF isoenzyme contributes in a major proportion to pyruvate biosynthesis than PykA when glucose is used as the only carbon source. The biomass yields on glucose indicated that *pts* mutants and especially *pts* and *pts-pykA* mutants directed glucose to biomass with a higher efficiency than the other strains and that they did not produce any detectable quantities of mixed acids. The double mutant in pyruvate kinase (*pykA-pykF*) also showed a significant reduction of the acetate formation as compared with the wild type strain. In addition, carbon evaluation suggests that the metabolic intermediates may be converted to storage polymers in both single and double pyruvate kinase mutants and in the *pts-pykF* mutant as the biomass. CO₂ and acetate produced by these strains brought the 80% of the total carbon. These results also indicate a high plasticity of the carbon metabolic pathways that allows the cells to respond to environmental changes.

VoBo

Tutor Principal: Dr. Francisco Bolívar Zapata
Investigador Titular "C" T. C.

RESUMEN

Diversas mutantes, tanto en los genes estructurales de las piruvato cinasas (*pykA* y *pykF*) como en el sistema de la fosfotransferasa (PTS o sistema PT) han sido utilizadas para estudiar el papel de las piruvato cinasas de *Escherichia coli* en la biosíntesis del piruvato, ya que estos dos sistemas representan las vías de aporte de piruvato en la célula. Este conjunto de mutantes, fue caracterizado tanto a nivel de fermentador en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, como en cajas con medio mínimo con distintas fuentes de carbono, tanto glicolíticas como gluconeogénicas. Los resultados mostraron que a diferencia de lo reportado anteriormente, ambas piruvato cinasas (PykA y PykF) son importantes para alcanzar velocidades de crecimiento similares a las mostradas por la cepa silvestre y que estas enzimas, además, se requieren a lo largo de todo el ciclo de vida del organismo. La isoenzima PykF aporta piruvato en una mayor cantidad que la isoenzima PykA cuando se utiliza glucosa como la única fuente de carbono. Los rendimientos de biomasa obtenidos en base a glucosa, mostraron que las mutantes *pts* y en especial las *pts* y *pts-pykA* canalizan más eficientemente la glucosa hacia la formación de biomasa. En estas cepas, además, no se detectó la formación de ningún producto de fermentación ácido-mixta como en la cepa silvestre o en cepas con mutaciones en una de las dos piruvato cinasas. La doble mutante en piruvato cinasa (*pykA-pykF*) mostró asimismo, una disminución significativa en la formación de acetato. Los balances de carbono realizados, sugieren la formación de polímeros de almacenamiento de carbono en las cepas con uno o ambos genes de piruvato cinasa mutados así como en la *pts-pykF*, que fueron las cepas en donde los datos de biomasa, CO₂ y acetato sólo aportaron alrededor del 80% del carbono total. Los resultados de los rendimientos CO₂-sustrato y de los análisis radiorrespirométricos de las distintas mutantes, sugieren una mayor participación de la vía de las pentosas en las cepas que llevan las mutaciones *pts* y *pts-pykA*. Por otro lado, el hecho de que las mutantes *pykA-pykF* y *pts-pykA-pykF* sean capaces crecer en fuentes de carbono como el gluconato pero no en ribosa o xilosa sugiere la participación de vías alternativas de utilización de carbono como la vía de Entner-Doudoroff. Estos resultados indican una alta plasticidad de las vías involucradas en el metabolismo del carbono, lo que le permite que la célula adapte a diferentes situaciones y sobrevivir en diferentes condiciones medioambientales.

VoBo

Tutor Principal: Dr. Francisco Bolívar Zapata
Investigador titular "C" T. C.

A mi familia por su constante impulso.

Al los Dres. Francisco Bolívar y Fernando Valle por su valiosa asesoría y apoyo.

Al M. en C. Alfredo Martínez por su importante colaboración para la realización de éste trabajo.

A mis compañeros por su amistad y entusiasmo.

A todos los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias a este trabajo.

INDICE GENERAL

	Página
I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	2
III. INTRODUCCION	3
IV. ANTECEDENTES	7
V. OBJETIVOS	8
VI. MATERIALES Y METODOS	9
VII. RESULTADOS	
- Construcción de la triple mutante (<i>pts-pykA-pykF</i>)	17
- Efecto de las mutaciones en los genes <i>pyk</i> y <i>pts</i> sobre el crecimiento y utilización de la glucosa	20
- Evaluación de parámetros cinéticos de las fermentaciones	23
Rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{X/S}$)	
Velocidad específica de consumo de sustrato (Q_S)	
Rendimiento biomasa-CO ₂ (Y_{X/CO_2})	
Velocidad específica de producción de CO ₂ (Q_{CO_2})	
Rendimiento CO ₂ -sustrato ($Y_{CO_2/S}$)	
Rendimientos acetato-sustrato ($Y_{P/S}$)	
Velocidades específicas de producción de acetato (Q_{Acet})	
- Estimación de la recuperación del carbono	27
- Crecimiento de las cepas en medio sólido con diferentes fuentes de carbono	28
- Análisis enzimáticos	32

- Análisis radiorrespirométricos	34
VIII. DISCUSION	40
IX. CONCLUSIONES GENERALES	49
X. PERSPECTIVAS	51
XI. BIBLIOGRAFIA	53
XII. ANEXO	
Artículo publicado	58

I. ABREVIATURAS

μ	velocidad específica de crecimiento
AMP	adenosina 5'-monofosfato
ADP	adenosina 5'-difosfato
ATP	adenosina 5'-trifosfato
Ap	ampicilina
C_{rec}	carbono recuperado
DO	densidad óptica
Gm	gentamicina
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
PEP	fosfoenolpiruvato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PTS	sistema de la fosfotransferasa
PykA	isoenzima piruvato cinasa A (tipo II)
PykF	isoenzima piruvato cinasa F (tipo I)
Q_{Acet}	velocidad específica de producción de acetato
Q_{CO_2}	velocidad específica de producción de CO_2
Q_s	velocidad específica de consumo de sustrato
Sm	estreptomina
t_D	tiempo de duplicación
U.I.	unidades internacionales
vvm	volúmen de aire/minuto/volúmen de medio
$Y_{CO_2/S}$	rendimiento CO_2 -sustrato
$Y_{P/S}$	rendimiento acetato-sustrato
$Y_{X/S}$	rendimiento biomasa-sustrato
Y_{X/CO_2}	rendimiento biomasa- CO_2

II. RESUMEN

Diversas mutantes, tanto en los genes estructurales de las piruvato cinasas (*pykA* y *pykF*) como en el sistema de la fosfotransferasa (PTS o sistema PT) han sido utilizadas para estudiar el papel de las piruvato cinasas de *Escherichia coli* en la biosíntesis del piruvato, ya que estos dos sistemas representan las vías de aporte de piruvato en la célula. Este conjunto de mutantes, fue caracterizado tanto a nivel de fermentador en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, como en cajas con medio mínimo con distintas fuentes de carbono, tanto glicolíticas como gluconeogénicas. Los resultados mostraron que a diferencia de lo reportado anteriormente, ambas piruvato cinasas (PykA y PykF) son importantes para alcanzar velocidades de crecimiento similares a las mostradas por la cepa silvestre y que estas enzimas, además, se requieren a lo largo de todo el ciclo de vida del organismo. La isoenzima PykF aporta piruvato en una mayor cantidad que la isoenzima PykA cuando se utiliza glucosa como la única fuente de carbono. Los rendimientos de biomasa obtenidos en base a glucosa, mostraron que las mutantes *pts* y en especial las *pts* y *pts-pykA* canalizan más eficientemente la glucosa hacia la formación de biomasa. En estas cepas, además, no se detectó la formación de ningún producto de fermentación ácido-mixta como en la cepa silvestre o en cepas con mutaciones en una de las dos piruvato cinasas. La doble mutante en piruvato cinasa (*pykA-pykF*) mostró asimismo, una disminución significativa en la formación de acetato. Los balances de carbono realizados, sugieren la formación de polímeros de almacenamiento de carbono en las cepas con uno o ambos genes de piruvato cinasa mutados así como en la *pts-pykF*, que fueron las cepas en donde los datos de biomasa, CO₂ y acetato sólo aportaron alrededor del 80% del carbono total. Los resultados de los rendimientos CO₂-sustrato y de los análisis radiorrespirométricos de las distintas mutantes, sugieren una mayor participación de la vía de las pentosas en las cepas que llevan las mutaciones *pts* y *pts-pykA*. Por otro lado, el hecho de que las mutantes *pykA-pykF* y *pts-pykA-pykF* sean capaces crecer en fuentes de carbono como el gluconato pero no en ribosa o xilosa sugiere la participación de vías alternativas de utilización de carbono como la vía de Entner-Doudoroff. Estos resultados indican una alta plasticidad de las vías involucradas en el metabolismo del carbono, lo que le permite que la célula adapte a diferentes situaciones y sobrevivir en diferentes condiciones medioambientales.

III. INTRODUCCION

En el metabolismo central de *Escherichia coli* se incluyen la vía de Embden-Meyerhof-Parnas que convierte la glucosa 6-P a piruvato, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos que oxida acetil CoA a CO₂ y la vía de las pentosas que oxida glucosa 6-P a CO₂. Estas vías proveen a la célula de los doce metabolitos precursores de los cuales se sintetizan los 75-100 bloques primarios, coenzimas y grupos prostéticos por reacciones que emplean energía, poder reductor y fuentes de nitrógeno, azufre y unidades de carbono. Otra vía central en *E. coli* es la vía inducible de Entner-Doudoroff la cual metaboliza gluconato. El metabolismo central también incluye a las vías anapleróticas que involucran reacciones de conexión entre vías, reacciones de flujo reverso y reacciones de relleno de pozas de metabolitos precursores que son utilizados para biosíntesis (Neidhardt, 1990).

El piruvato es el primer intermediario no fosforilado de la vía glicolítica y ocupa un papel central en el metabolismo, tanto en las reacciones del catabolismo como de la biosíntesis, virtualmente en todas las células. Su formación depende de las condiciones de crecimiento y de las necesidades del organismo, y debido a su papel central, existen varias vías metabólicas que pueden producir este compuesto. Cuando los microorganismos, como *E. coli*, crecen en glucosa como la única fuente de carbono, obtienen la mayor parte del piruvato durante la internalización de la glucosa mediante el uso del sistema de la fosfotransferasa (Fig. 1) (Holms, 1986). Durante este proceso, el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) es transferido a la molécula de glucosa, generando piruvato y glucosa 6-P (Postma *et al.*, 1993; Saier & Chin, 1990). Otra ruta metabólica importante para la obtención del piruvato es a través de la acción de las enzimas piruvato cinasas (ATP:piruvato 2-O-fosfotransferasa, EC 2.7.1.40). Estas enzimas catalizan la segunda de las dos reacciones de formación de adenosina 5' trifosfato (ATP) en la vía glicolítica. La reacción catalizada por este tipo de enzima lleva a cabo la conversión de PEP a piruvato por la adición de un protón y la pérdida de un grupo fosfato, el cual es transferido a la adenosina 5' difosfato ADP (Muihead *et al.*, 1986; Waywood *et al.*, 1974). Esta reacción es el último paso de la vía glicolítica y es irreversible en condiciones fisiológicas. La enzima piruvato cinasa junto con la fosfofructocinasa (PKF), juega un papel central en la regulación de la vía glicolítica (Fraenkel, 1992). Finalmente, el piruvato también puede producirse a través de la vía de Entner-Doudoroff

(Fraenkel, 1987), o por la vía del metilglioxal (Cooper & Anderson, 1970).

En *E.coli*, a diferencia de otros procariotes y varios eucariotes, existen dos formas no interconvertibles de la piruvato cinasa, PykA y PykF codificadas por los genes *pykA* y *pykF*, respectivamente (Garrido-Pertierra & Cooper, 1983; Malcovat & Valentini, 1973; Waywood *et al.*, 1975). Ambas isoenzimas son activadas por el sustrato (PEP), pero difieren en la naturaleza de sus efectores alostéricos. La isoenzima PykF es activada por la fructosa-1-6-dP e inhibida por el ATP, mientras que la isoenzima PykA es activada por el AMP y los azúcares monofosforilados (ribosa-fosfato), e inhibida por PO_4^{-3} y SO_4^{-2} . La piruvato cinasa es única entre las cinasas en su requerimiento absoluto por el cation Mg^{2+} que participa en la coordinación de los sustratos en el sitio activo (Muirhead *et al.*, 1986). La enzima es un homotetrámero de 484 (PykA) o 522 (PykF) residuos de aminoácidos por subunidad. La secuencia de aminoácidos en estas enzimas está altamente conservada, sobretodo en las regiones centrales (Jetten *et al.*, 1994). Recientemente, se ha determinado la estructura tridimensional de la isoenzima PykF de *E. coli*. Cada subunidad del homotetrámero puede dividirse en 3 dominios; un dominio grande tipo barril (β/α)₈ (dominio A), un dominio pequeño tipo β barril (dominio B) y un dominio C-terminal con una topología α/β plegada (dominio C). El sitio de union del efector alostérico está localizado en la interfase entre los dominios A y C; mientras que el sitio activo se estructura en el espacio de interacción entre los dominios A y B (Mattevi *et al.*, 1995).

En la actualidad, se han clonado más de 30 genes estructurales de piruvato cinasa de diferentes fuentes. En muchos casos, estas enzimas han sido purificadas y se han determinado sus parámetros bioquímicos y cinéticos. La función de las piruvato cinasas parece ser universal, y en caso de no estar presente se ha comprobado que su papel puede ser cubierto al menos parcialmente por la piruvato fosfato dicinasa, enzima que cataliza la formación de ATP a partir de PEP mediante un mecanismo de doble fosforilación dependiente de Ppi y AMP (Reeves, 1968). Estas enzimas, además, en general, suelen tener otras funciones adicionales como una actividad de ATPasa dependiente de ATP y bicarbonato, la fosforilación de glicolato dependiente de ATP, la descarboxilación de oxaloacetato y la de proveer nucleótidos trifosfatos bajo ciertas condiciones anaeróbicas (Creighton & Rose, 1976; Kayne, 1973; Saeki *et al.*, 1974). Una fuente

de interés adicional para el estudio de las piruvato cinasas surge de su variabilidad en el eritrocito del humano (Kayne, 1973). Como podría esperarse de las enzimas con un papel clave en glicólisis, los cambios en su actividad catalítica provocan severos daños metabólicos. Así, la deficiencia de la piruvato cinasa en el eritrocito es la causa mas comun de la anemia hemolítica no esferocítica hereditaria (Baronciani, 1993).

El hecho de que las dos piruvato cinasas catalizen la misma reacción así como la multiplicidad de controles operativos que hay sobre estas enzimas han dado lugar al surgimiento de numerosas preguntas sobre su papel fisiológico y sus mecanismos de regulación (Waywood and Sanwal, 1974).

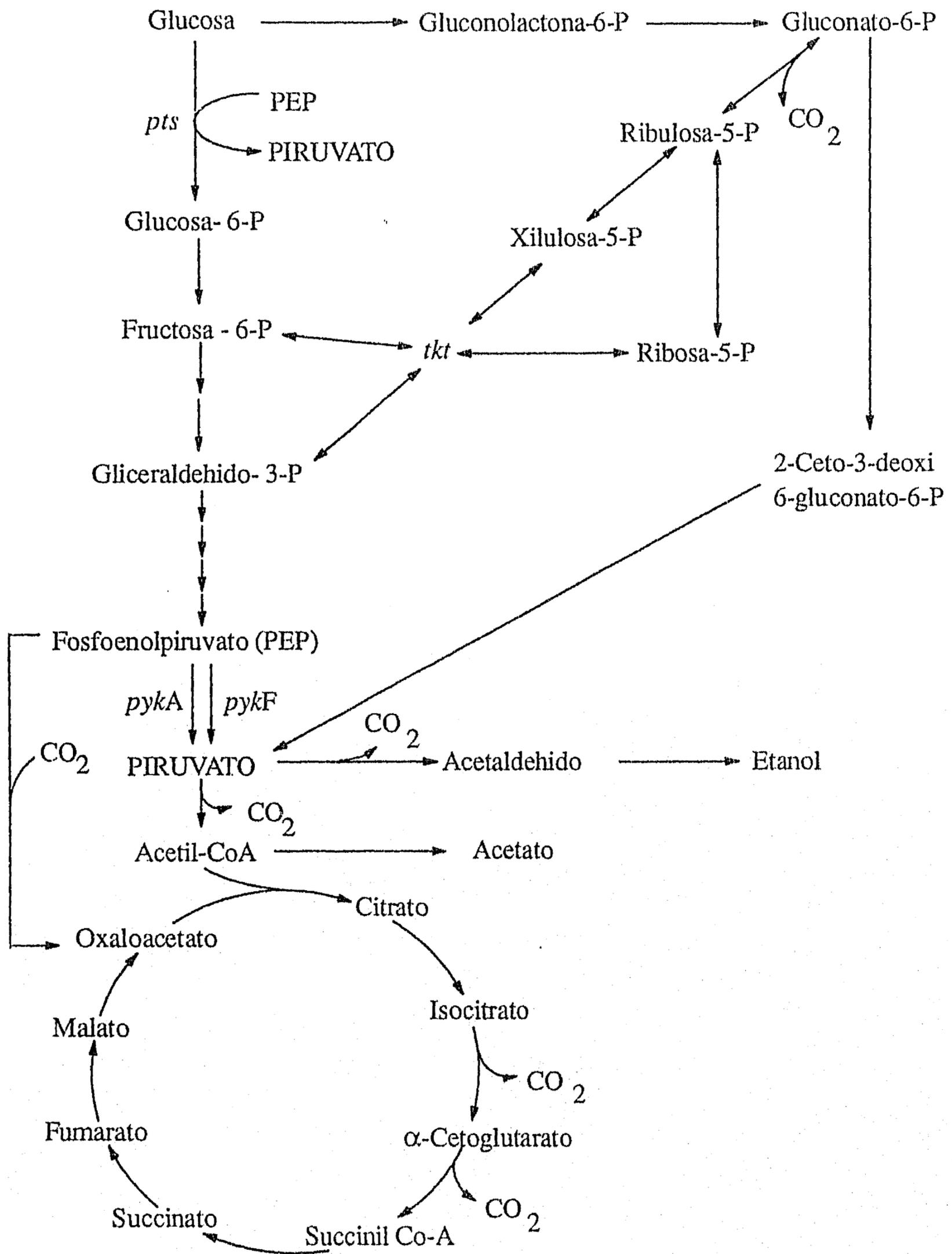


Fig. 1. Principales vías metabólicas del carbono en *Escherichia coli*.

IV. ANTECEDENTES

Aun cuando las secuencias de DNA de *pykA* y de *pykF* de *E. coli* se encuentran depositadas en el banco de datos, la secuencia de *pykF* se obtuvo por secuencia directa del DNA genómico (Ohara *et al*, 1989), mientras que la clonación de *pykA* no fué publicada. Debido a esto, los genes estructurales de las piruvato cinasas (*pykA* y *pykF*) de *E. coli* fueron clonados recientemente por nuestro grupo (Ponce, tesis de maestría) y éstas clonas sirvieron para construir cepas mutantes en uno o ambos genes (*pykA*, *pykF* y *pykA-pykF*) por medio de la interrupción de los genes *pyk* con genes de resistencia a antibióticos. Por otro lado, también se cuenta en el laboratorio con cepas que tienen deletado el sistema de la fosfotransferasa, pero que son capaces de crecer en glucosa como única fuente de carbono, así como con mutantes *pts* Glc⁺ con una de las dos piruvato cinasas mutadas (*pts-pykA* y *pts-pykF*). No se contaba, inicialmente, con una mutante que además de tener el sistema PT deletado tuviera ambos genes de piruvato cinasa mutados para poder llegar a un mejor entendimiento del papel fisiológico que juegan las piruvato cinasas en el metabolismo celular de *Escherichia coli* por lo que en este trabajo se llevó a cabo su construcción y posterior caracterización junto con las demás cepas construidas anteriormente.

Existen reportes en la literatura que señalan que *E. coli* es capaz de crecer normalmente en condiciones aeróbicas y en presencia de fuentes de carbono PTS aun en ausencia de las dos piruvato cinasas, debido al aporte de piruvato por el sistema PT (Garrido-Pertierra & Cooper, 1977). En el mismo reporte se menciona que la ausencia de la proteína PykA no afectaba el crecimiento en ninguna de las fuentes de carbono probadas, sin embargo el papel de PykA no fué definido claramente.

V. OBJETIVOS

El presente trabajo se planteó como objetivo general el estudiar el papel fisiológico de las isoenzimas de piruvato cinasa de *Escherichia coli* (PykA y PykF) en el metabolismo celular.

Para la realización de éste objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- . Construir la triple mutante (*pts-pykA-pykF*)
- . Caracterizar las cepas mutantes de la piruvato cinasa y en el sistema PT (*pykA*, *pykF*, *pykA-pykF*, *pts*, *pts-pykA* y *pts-pykF*), así como la triple mutante (*pts-pykA-pykF*) a través de:
 - Obtener las cinéticas de crecimiento y de consumo de glucosa
 - Obtener rendimientos y velocidades de consumo y producción de CO₂
 - Medir los metabolitos producidos a lo largo de las fermentaciones
 - Estimación de los balances de carbono
 - Medir la actividad enzimática específica de las piruvato cinasas PykA y PykF a lo largo de todo el ciclo del cultivo celular.
- . Crecer las cepas en medio sólido con diferentes fuentes de carbono (glicolíticas y gluconeogénicas).
- . Realizar y evaluar análisis radiorrespirométricos con las diferentes mutantes construidas.

VI. MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos usados en este estudio fueron las cepas, *E. coli* ATCC 47002, la cepa K-12 y las mutantes derivadas de ella (Tabla 1). Las células fueron crecidas rutinariamente a 37°C en medio mínimo M-9 suplementado con 2 g/L de glucosa con o sin casaminoácidos, dependiendo del experimento. Para la preparación de los inóculos, las cepas fueron crecidas en matraces con medio mínimo M-9 suplementados con casaminoácidos hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5. Las células fueron lavadas y utilizadas para inocular 2 litros de medio mínimo con glucosa en el fermentador. En todos los experimentos realizados, los fermentadores fueron inoculados con el mismo número de células.

Para el crecimiento de las mutantes en medio sólido con diferentes fuentes de carbono se utilizó medio mínimo M-9 pH 7.4 con 2 g/L de glucosa o gluconato, 2.4 g/L de ribosa o xilosa, 3 g/L de succinato y 4 g/L de piruvato, respectivamente. Las cajas fueron plaqueadas con cultivos diluidos para tener colonias aisladas e incubadas a 37°C hasta por 96 horas.

Construcción de la triple mutante (*pts-pykA-pykF*)

Para la construcción de la mutante que tuviera tanto la delección en el sistema PT como en ambas piruvato cinasas se construyeron tres plásmidos diferentes los cuales contenían el gene *pykF* interrumpido por tres genes de resistencia a antibióticos diferentes. Uno de los plásmidos construidos, llamado pBGS18-FAp, contiene al gene de *pykF* interrumpido en la parte media, por el gene de resistencia a ampicilina (Ap) que se obtuvo del plásmido pCLink-1. Para la construcción de este plásmido, la región estructural de *pykF* que se tenía clonado en un pUC19 tuvo que ser subclonada en el plásmido pBGS18, debido a que el pUC19 lleva el gene de resistencia a ampicilina y esto impediría la selección de la interrupción. El plásmido pBGS18 en cambio tiene un gene de resistencia a la kanamicina. El segundo plásmido construido se denominó pPykF-Gm y contiene al gene de *pykF* interrumpido por el gene de resistencia a la gentamicina (Gm), el cual proviene del plásmido pGMΩ1. Por último, se construyó el plásmido pPykF-Sm, que contiene al gene de *pykF* interrumpido por el gene de resistencia al antibiótico estreptomycinina (Sm), el cual proviene del plásmido pHP45Ω.

TABLA 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo o fenotipo relevante	Fuente
JM101	<i>supE thi (lac⁻ proAB)(F⁺ traD36 proAB lacI^{qZ} M15)</i>	Colección del laboratorio
ATCC 47002	F ⁻ <i>recB21 recC22 sbc15 leu-6 ara-14 his-4λ</i>	ATCC ^a
PB12	Como la JM101 pero <i>(ptsH-I-crr)::kan; Glc⁺</i>	Colección del laboratorio ^b
PB22	Como la JM101 pero <i>pykA::cam</i>	Colección del laboratorio
PB24	Como la JM101 pero <i>pykF::cam</i>	Colección del laboratorio
PB25	Como la JM101 pero <i>pykA::kan pykF::cam</i>	Colección del laboratorio
PB26	Como la PB12 pero <i>pykA::cam</i>	Colección del laboratorio
PB27	Como la PB12 pero <i>pykF::cam</i>	Colección del laboratorio
PB28	Como la PB12 pero <i>pykA::cat pykF::gen</i>	Este trabajo

^aAmerican Type Culture Collection, Rockville, Md.

^b Para la descripción y el análisis de esta cepa ver Flores et al, 1996

Los tres plásmidos construidos fueron linealizados y usados para transformar células competentes de la cepa ATCC 47002 para tratar de integrar al cromosoma las inserciones por un evento de doble recombinación homóloga (Oden *et al.*, 1990). Todas las transformantes fueron plaqueadas en cajas con medio Luria-Bertani con los antibióticos respectivos en concentraciones que permitieran la selección del gene de resistencia en monocopia. Para la selección de los genes de resistencia a antibióticos en multicopia se utilizaron concentraciones de 100 µg/ml de Sm, 15 µg/ml de Gm y 200 µg/ml de Ap, respectivamente. Para la selección de estos mismos genes, pero en monocopia, se usaron sólo 25 µg/ml de Sm, 5 µg/ml de Gm y 50µg/ml de Ap. Las interrupciones en el cromosoma fueron corroboradas por experimentos en los que se amplificaron regiones específicas del cromosoma mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente, se realizaron transducciones a las cepas de interés utilizando al fago P1 (Silhavi *et al.*, 1984).

Condiciones de fermentación

Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en un fermentador de 6 litros (LSL Biolafitte, New Jersey, USA) con un volumen de operación de 2 L y bajo condiciones controladas. Para todas las cepas examinadas, las fermentaciones fueron realizadas de 2 a 4 veces, con el fin de obtener datos estadísticamente reproducibles. El pH se mantuvo en 7.4 por medio de adiciones automáticas de NaOH 0.5 N. Las fermentaciones fueron realizadas a una velocidad constante de 600 rpm y con un flujo de aire de 1 volúmen de aire/minuto/volúmen de medio (vvm). El oxígeno disuelto se midió con un sensor de oxígeno polarográfico (Ingold Electrodes, Inc., Massachusetts, USA). En las condiciones experimentales utilizadas (concentración de glucosa, velocidades de aereación y de agitación), los niveles de oxígeno disuelto nunca fueron menores al 60% de saturación. El control de las variables de fermentación se obtuvo mediante un controlador automático (Maestro, LSL Biolafite). Los datos de las fermentaciones fueron capturados en una computadora IBM-compatible, utilizando un software comercial (Mentor, LSL Biolafite). El análisis de dióxido de carbono se llevó a cabo en línea utilizando el analizador de gases múltiple Perkin-Elmer (Mass spectrometer, MGA-1200, Pomina, CA).

Para evaluar el efecto fisiológico de las mutaciones en las cepas construidas, se calcularon los balances de materiales, mientras que para los cálculos de la velocidad de producción de dióxido

de carbono y de la cantidad total de CO₂ producido durante las fermentaciones, éstos se realizaron con los datos de CO₂ gaseoso.

METODOS ANALITICOS

Determinación de proteína.

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Sigma Co., St Louis, MO).

Determinaciones de glucosa.

Para determinar la concentración de glucosa en las muestras de las fermentaciones, éstas fueron centrifugadas por 5 minutos a 12000 x g. La glucosa remanente se determinó en el sobrenadante utilizando un analizador de glucosa (Modelo 2700, Yellow Springs Instruments, Yellow Spring OH).

Concentración celular.

La concentración celular se determinó midiendo la turbidez de los cultivos a 600 nm (DO₆₀₀) en un espectrofotómetro (Beckman DU-70, Fullerton, CA). Para presentar los datos como peso seco de células por litro de cultivo (cuando esto fue requerido), se realizó la conversión de los datos de densidad óptica (DO) a datos de peso seco de células por medio de una curva de calibración que obtenida previamente ($1 \text{ DO}_{600} = 0.37 \text{ g/L}$).

Evaluación de los parámetros cinéticos de las fermentaciones.

Para evaluar los efectos del fondo genético sobre los parámetros cinéticos de las fermentaciones, se utilizaron los datos comprendidos entre la fase de crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria, la cual coincide con la caída de la velocidad de producción de CO₂ como consecuencia de la utilización de la glucosa.

Velocidad específica de crecimiento.

La velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) se calculó a partir de la pendiente de la línea recta resultante al graficar los datos del logaritmo natural de la densidad óptica contra el tiempo.

Cálculos de los rendimientos y velocidades específicas

Los rendimientos globales (Y) comprenden la parte de sustrato transformado en biomasa (o en producto), o la relación entre la biomasa formada respecto a un determinado metabolito durante la etapa de crecimiento exponencial. Dichos rendimientos se calcularon de la siguiente manera:

$$Y_{X/S} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad [g_P/g_S] \quad (1)$$

$$Y_{Acet/S} = (Acet - Acet_0) / (S_0 - S) \quad [mol_{Acet} / mol_S] \quad (2)$$

$$Y_{Acet/X} = (Acet - Acet_0) / (X - X_0) \quad [g_{Acet}/g_P] \quad (3)$$

$$Y_{CO_2/S} = (CO_2 - CO_{2_0}) / (S_0 - S) \quad [mol_{CO_2} / mol_S] \quad (4)$$

$$Y_{X/CO_2} = (X - X_0) / (CO_2 - CO_{2_0}) \quad [g_P / mol_{CO_2}] \quad (5)$$

donde X denota la biomasa, S la glucosa, Acet. el acetato, CO₂ el bióxido de carbono y 0 el valor del parámetro al inicio de la etapa exponencial.

Las velocidades específicas de consumo de glucosa (Q_S) y de formación de bióxido de carbono (Q_{CO₂}) se calcularon dividiendo la velocidad específica de crecimiento entre el rendimiento respectivo. Para el cálculo de la velocidad específica de formación de acetato (Q_{Acet}) se dividió la velocidad específica de crecimiento entre el valor recíproco del rendimiento Y_{Acet/X}.

Estimación de la recuperación de carbono.

En virtud de que la glucosa consumida se convierte en biomasa (células), otros productos extracelulares (cómo el ácido acético), y bióxido de carbono, se puede establecer un balance de materiales para estimar la cantidad de carbono que se recupera (C_{rec}).

Los flujos (o velocidades específicas) pueden ser convertidos en flujos de carbono en base mol-C para cada una de las especies descritas en el párrafo anterior. De manera que el balance de carbono atómico está dado por:

$$\text{mol-C producido} = \text{mol-C consumido}$$

$$Q_X^c + Q_{Acet}^c + Q_{CO_2}^c = Q_S^c \quad (A)$$

donde Q_i^c representa el flujo de carbono en base mol-C para cada una de las especies citadas.

En consecuencia, la recuperación de carbono se obtiene dividiendo cada uno de los términos de la ecuación (A) entre Q_s^c :

$$C_{rec} (\%) = [Q_x^c/Q_s^c + Q_{Acet}^c/Q_s^c + Q_{CO_2}^c/Q_s^c] \times 100$$

El cálculo de Q_x^c se llevó a cabo considerando los gramos de proteína por gramo de peso seco de las células determinados experimentalmente y una composición elemental promedio de *E. coli* de $CH_2 O_{0.5} N_{0.25}$. De esta manera el peso molecular promedio de las células fue 25.5 (Andersen & Meyerburg, 1980).

El cálculo de Q_{Acet}^c , $Q_{CO_2}^c$ y Q_s^c se realizó conociendo los pesos moleculares de los compuestos en cuestión y las siguientes relaciones estequiométricas:

$$Q_{Acet}^c = 2 Q_{Acet} \quad (CH_2O) = C_2H_4O_2$$

$$Q_{CO_2}^c = 1 Q_{CO_2} \quad (CO_2) = CO_2$$

$$Q_s^c = 6 Q_s \quad (CH_2O) = C_6H_{12}O_6$$

Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos producidos en las fermentaciones.

Para determinar, identificar y cuantificar la formación de productos de fermentación ácido-mixta en las diferentes fermentaciones se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los sobrenadantes provenientes de los cultivos de las fermentaciones se centrifugaron durante 15 minutos a 12,000 x g y se pasaron por una pre-columna empacada con un soporte C-18 (Waters) para luego poder inyectarlas en las columnas. Los sobrenadantes obtenidos se diluyeron e inyectaron automáticamente por medio de una bomba programable (modelo 2150, LKB BROMMA), y un calentador de columna controlado por un refractómetro diferencial (Waters 410). El sistema fue controlado mediante el software para cromatografía Waters Maxima 820. El sistema de separación consistió de una columna de exclusión Aminex HPX-87H Iron (7.8 x 300 mm, BIORAD) protegida por una columna Micro-guard (Catio H Cartridge), ambas empacadas con un soporte de estireno divinilbenceno en su forma ácida. La elución se llevó a cabo isocráticamente usando H_2SO_4 0.0025 N (filtrado a través de un filtro de 0.45 μm y desgasado con helio) como fase móvil a 60°C y a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. La

columna fue calibrada con estándares de ácidos orgánicos preparados con reactivos grado analítico (Merk, Co.) e inyectados en las mismas condiciones que las muestras de fermentación. Los compuestos se detectaron con un refractómetro diferencial (Waters 410) a una sensibilidad de 16.

Análisis enzimático

Para el análisis de actividad de piruvato cinasa, las células se crecieron en medio mínimo suplementado con 2 g/L de glucosa (Sambrook et al, 1989) hasta la fase logarítmica tardía y se cosecharon por centrifugación. Los paquetes celulares fueron lavados con un amortiguador fosfatos sodio-potasio 5mM y EDTA 1mM (pH 7.5). Las células fueron lisadas por sonicación y centrifugadas a 23,000 x g a 0°C por 20 minutos y coleccionar el sobrenadante. La actividad de piruvato cinasa se midió a 25°C acoplado la formación de piruvato a la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa, esencialmente como se reporta en Malcovati *et al.* (1982). La desaparición de NADH de la reacción fue monitoreada espectrofotométricamente a 340 nm. La actividad se reporta como unidades internacionales (U.I.) de enzima por miligramo de proteína (U.I./mg). Una unidad internacional de piruvato cinasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de piruvato por minuto por miligramo de proteína.

Análisis radiorrespirométricos

Para la realización de los análisis radiorrespirométricos se diseñó un reactor con una columna de vidrio pequeña, la cual tiene una chaqueta que permite mantener la columna a una temperatura constante de 37°C por medio de un circulador termostático de agua (2219 Multitemp II). Para la agitación de las células en el reactor se inyectó un flujo de aire constante (220 ml/min). El aire de entrada fue burbujeadado a través de una solución de KOH 0.1 N antes de entrar al reactor para eliminar el CO₂ del aire de entrada. A la salida se instaló una trampa con hielo seco para eliminar la humedad del aire y después burbujearlo a un matraz conteniendo 50 ml de KOH 0.1 N, donde quedó atrapado el CO₂ producido por las células durante el experimento. Para la preparación del inóculo se tomó una colonia y se creció por toda la noche en un matraz con 10 ml de medio mínimo M-9 pH 7.4 con 2g/L de glucosa, suplementado con casaaminoácidos. De éste matraz se tomaron 2 ml para inocularlos en un matraz de 500 ml con 40 ml del mismo medio anterior.

Las células fueron crecidas hasta una densidad óptica de 0.5, la cual se midió por medio de un espectrofotómetro (Beckman DU-70, Fullerton, CA) a DO_{600} . Las células fueron centrifugadas a 10,000 x g por 15 segundos, lavadas con M-9 y resuspendidas en medio mínimo pH 7.0 sin glucosa, para tener una concentración final de células de 2 g/L. Para la reacción se tomaron 4 ml de medio mínimo pH 7.0, 2 ml de células, 0.4 g de glucosa no marcada y 0.8 μ Ci de glucosa marcada en el carbono 1 con carbono-14 (Dupont, NEN. USA). Antes de comenzar la reacción, se tomó una muestra de 20 μ l para cuantificar la cantidad exacta de marca radioactiva al inicio del experimento. Una vez iniciado el experimento, se tomaron muestras de 200 μ l cada 15 minutos durante 6 horas (400 minutos). El KOH fué adicionado a viales con 2 ml de liquido de centelleo (EcoLite, ICN). Las muestras fueron agitadas y cuantificadas durante 3 minutos por medio de un contador de centelleo (Beckman modelo LS 6000IC, Fullerton, CA). Los experimentos de control indicaron que no hay liberación no-biológica de ^{14}C . El tratamiento de los datos se llevó a cabo unicamente con los datos obtenidos en los primeros 300 minutos de la reacción. Para poder hacer comparaciones entre las distintas cepas todos los datos que se presentan se normalizaron en base a la concentración inicial de glucosa marcada. A partir de los porcentajes de recuperación relativa de $^{14}\text{CO}_2$, se realizaron ajustes polinomiales de quinto orden. Dichas ecuaciones se derivaron para calcular la velocidad relativa de recuperación de $^{14}\text{CO}_2$. En base a las cinéticas de velocidad y de porcentaje de recuperación de $^{14}\text{CO}_2$, se determinó la aportación de $^{14}\text{CO}_2$ por la vía de las pentosas al catabolizar (1- ^{14}C)glucosa.

VII. RESULTADOS

Construcción de la triple mutante (*pts-pykA-pykF*)

Debido a que la mayor aportación de piruvato en la célula proviene del transporte y fosforilación de fuentes de carbono por el sistema PT, como la glucosa, usando PEP como donador del grupo fosfato, y a que otra parte importante del piruvato se forma a través de la acción de los productos de los genes de la piruvato cinasa, el estudio de las mutantes con las que ya se cuenta (Tabla 1), así como la construcción y estudio de la triple mutante (*pts-pkA-pykF*), resultan de gran relevancia para entender mejor el papel de estos genes y de las enzimas para las que codifican, en el metabolismo bacteriano.

Para la construcción de la triple mutante se requirió contar con un tercer marcador de resistencia, ya que la mutante en *pts* tiene resistencia al antibiótico kanamicina y las mutantes en piruvato cinasa tienen resistencia al cloranfenicol o a la kanamicina (Tabla 1). Debido a que ya se tenía el gene *pykA* interrumpido con 2 marcadores diferentes (Cm y Km), se decidió trabajar en la construcción de una nueva interrupción de *pykF* ya que éste sólo se tenía interrumpido por el gene de resistencia a Cm.

Se realizaron diferentes construcciones en las que el gene *pykF* quedó interrumpido por uno de los tres genes de resistencia a los antibióticos ampicilina, gentamicina o estreptomina (Fig. 2a-c). De las colonias obtenidas al hacer la transformación de los plásmidos (pPykF-Gm, pGgS18-FAp y pPykF-Sm) linealizados en la cepa ATCC 47002, en los tres casos se obtuvieron colonias resistentes a los antibióticos respectivos. Sin embargo, al hacer experimentos PCR para corroborar las interrupciones se observó que sólo se tenía la interrupción de *pykF* con el gene de resistencia a gentamicina. Esta mutación en *pykF* fue transducida de la cepa de ATCC 47002 a la mutante *pts pykA*, dando lugar a la triple mutante: *pts-pykA-pykF*, que se denominó PB28 (Fig. 3 y Tabla 1).

El hecho de que no se pudiera realizar la integración en cromosoma del gene *pykF* interrumpido con los genes de resistencia a ampicilina o a estreptomina en la cepa ATCC 47002 podría deberse a diferentes causas. Se sabe que algunos genes de resistencia a antibióticos funcionan bien mientras se encuentren en plásmidos multicopia pero no así estando en monocopia.

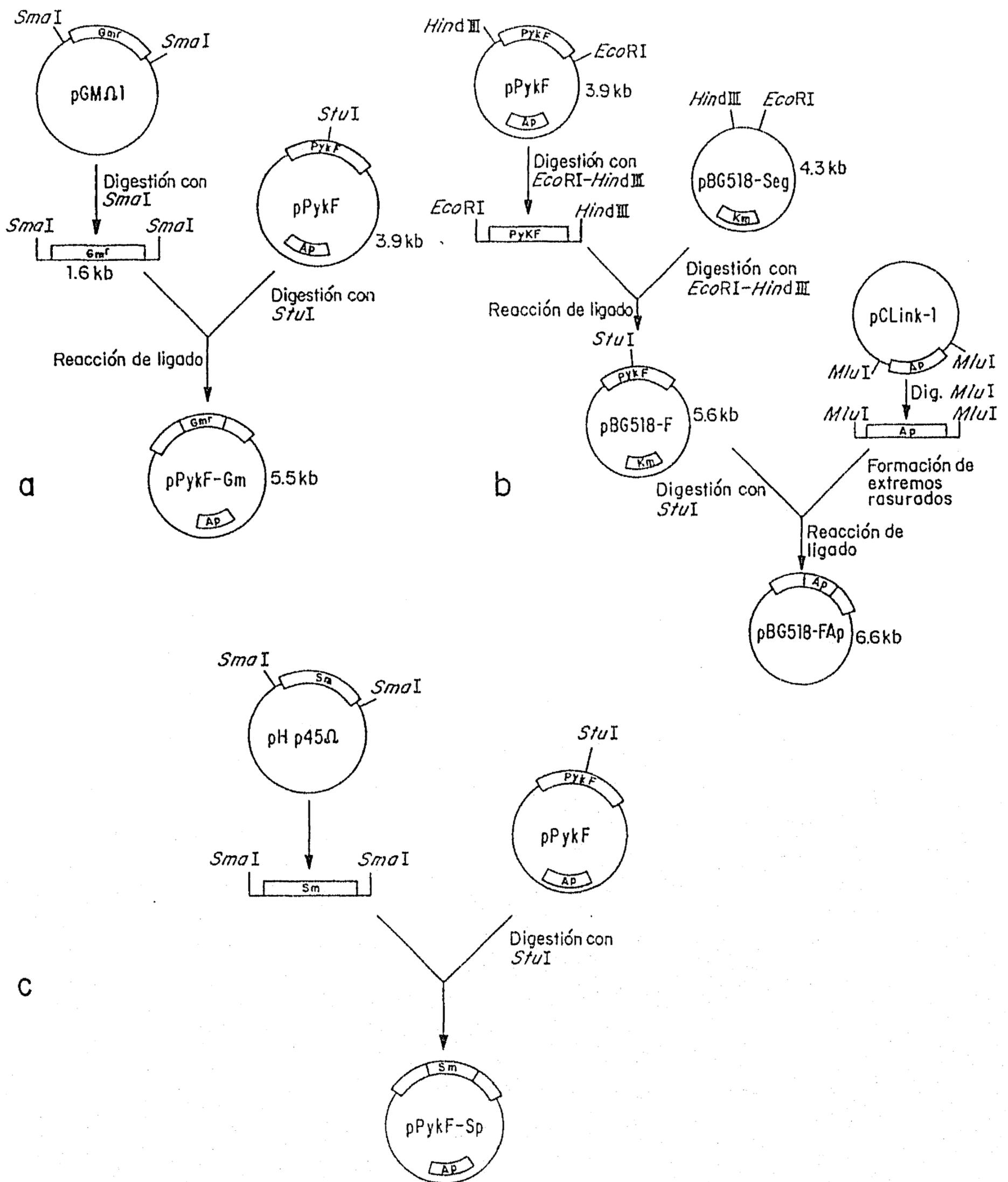


Fig. 2. Construcción de los vectores para integrar al cromosoma el gene *pykF* interrumpido por uno de los genes de resistencia a antibióticos: a) Gentamicina, b) Ampicilina y c) Estreptomicina, y así lograr la construcción de la triple mutante (*pts pykA pykF*) a partir de la mutante *pts pykA*.

Esto puede deberse a que los antibióticos como la estreptomocina actúan a nivel ribosoma por lo que para obtener la resistencia éste antibiótico podría requerirse que este se encuentre en multicopia y no en monocopia. Asimismo, debido a que para la selección de los genes de resistencia en monocopia se utilizan cantidades muy pequeñas de antibióticos, en algunos casos es difícil distinguir entre las resistencias que forman parte del fondo genético de la cepa y las colonias que llevan el gene de resistencia. Este podría ser probablemente el caso del antibiótico ampicilina que muestra cierta resistencia natural al antibiótico. En otros casos, el hecho de que los genes de resistencia provengan de transposones deja la posibilidad de que éstos tengan secuencias de inserción (IS) que hagan que el marcador se pierda o quede en otro sitio del cromosoma diferente al original por lo que aunque se tiene la resistencia al antibiótico, éste no se encuentra en el gene de interés.

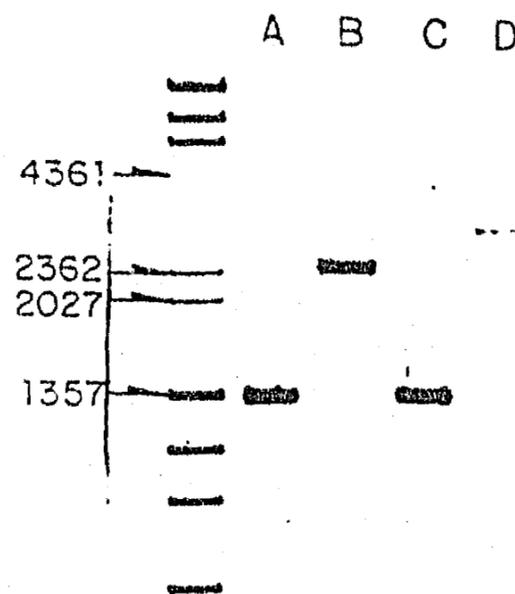


Fig. 3. Comprobación por PCR de la interrupción por inserción de los genes *pykA* y *pykF* de la cepa PB28 de *Escherichia coli*. A) Gene *pykA* silvestre, B) Gene *pykA* interrumpido por el gene que codifica para la acetil-transferasa de cloranfenicol (*cat*) de 1 Kb, C) Gene *pykF* silvestre, D) Gene *pykF* interrumpido en el gene de resistencia a gentamicina (1.6 Kb).

Efecto de las mutaciones en los genes *pyk* y *pts* sobre el crecimiento y la utilización de la glucosa.

Para entender el papel relativo de cada uno de los genes *pyk* en el metabolismo celular, se realizaron varias fermentaciones a nivel de 2 L (de 2 a 4 fermentaciones para cada cepa), tanto con la cepa silvestre como con las mutantes en piruvato cinasa en un fondo silvestre o en un fondo carente del sistema PT. Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, ya que aun las cepas con el sistema PT deletado son capaces de crecer en glucosa al ser ésta transportada a través de la permeasa de la galactosa (*GalP*) (Flores *et al.*, 1996).

Como se observa en la Fig. 4, todas las cepas alcanzaron una densidad óptica final similar; sin embargo, las cepas que llevan las mutaciones en los genes *pyk* y/o *pts* mostraron velocidades de crecimiento diferentes, las cuales se presentan en la tabla 2 como el tiempo de duplicación (t_D) obtenido durante la fase de crecimiento exponencial. Las mutantes *pykA* o *pykF* en un fondo genético silvestre (*pts*⁺), mostraron un ligero incremento en los tiempos de duplicación en comparación con la cepa parental. La doble mutante en piruvato cinasa (*pykA-pykF*) mostró un t_D 40% mayor al mostrado por la cepa silvestre. Esto se reflejó en el aumento del tiempo requerido para alcanzar la máxima densidad celular (7 h de la cepa silvestre vs. 10 h de la doble mutante).

La cepa PB12, carente del sistema PT, pero capaz de crecer en glucosa como fuente de carbono (*pts*⁻*Glc*⁺), mostró un t_D 80% mayor que el t_D mostrado por la cepa silvestre y 40% mayor que la doble mutante en piruvato cinasa. La mutante *pts-pykA* mostró un t_D similar al observado por la cepa que tiene el sistema PT deletado y por lo tanto requirió el mismo tiempo que la *pts* para llegar a la fase estacionaria. El mayor efecto sobre el crecimiento se observó con la introducción de la mutación *pykF* en el fondo *pts* *Glc*⁺. Esta mutante mostró un incremento en el t_D del 140% con respecto al mostrado por la cepa silvestre, llevándola a alcanzar la máxima densidad celular hasta después de 15 horas de la fermentación (Fig. 4 y Tabla 2). No se llevaron a cabo fermentaciones con glucosa para la triple mutante (*pts-pykA-pykF*) debido a que esta mutante es incapaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono (Tabla 6).

Se hicieron las mediciones de la glucosa del mismo grupo de experimentos reportados en la Fig.

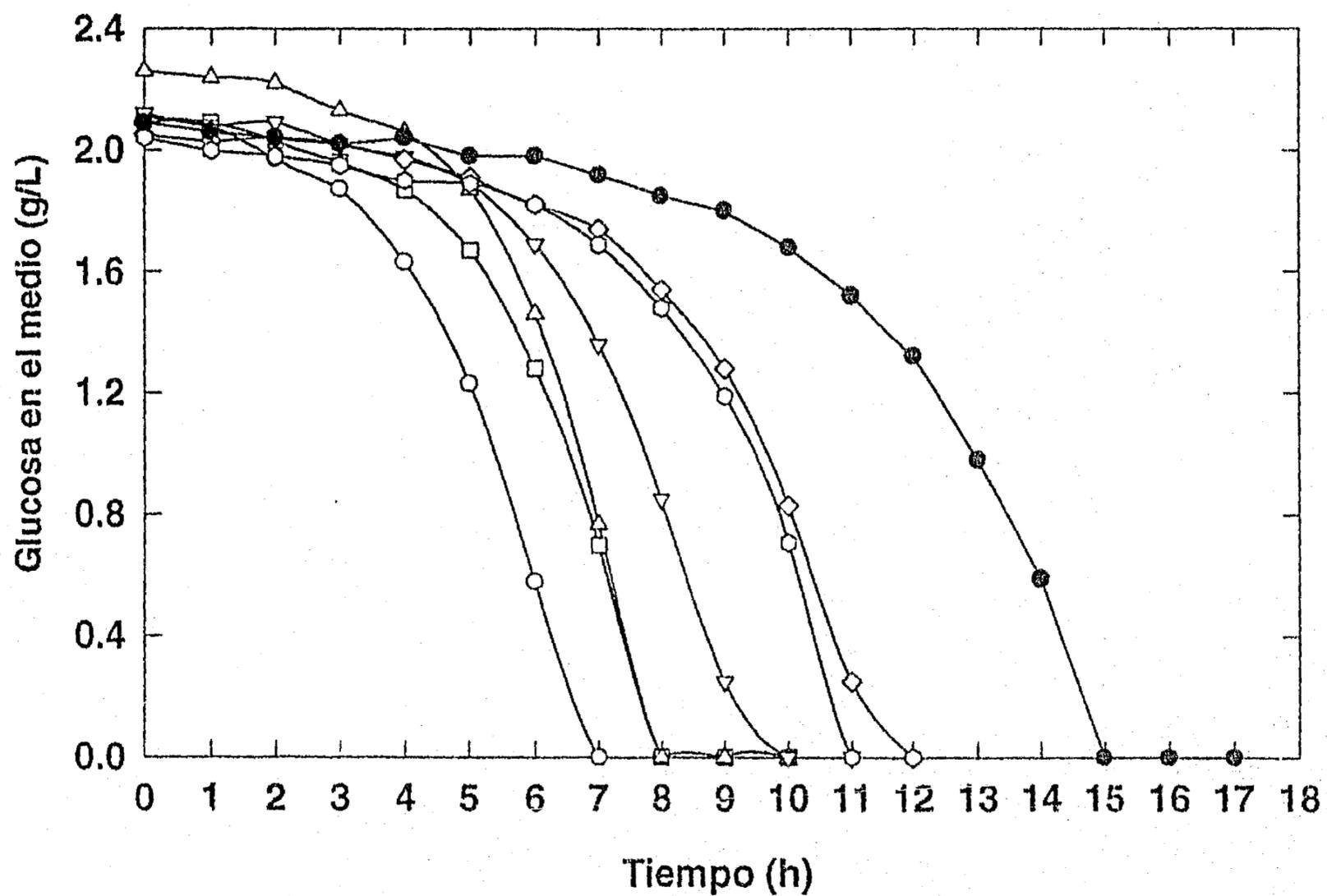
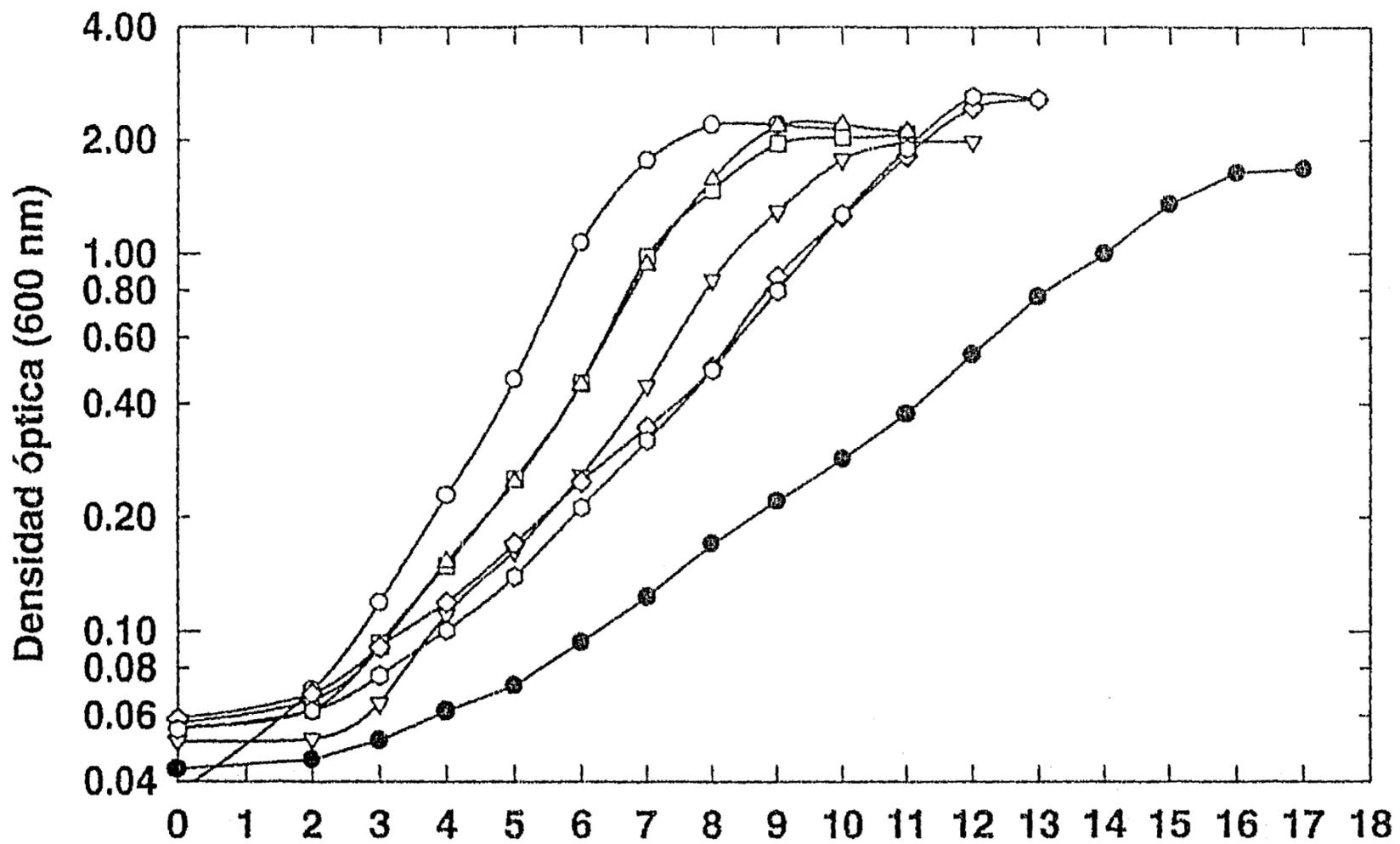
4. Los resultados mostraron que existe una correlación entre la cantidad de biomasa formada y la cantidad de glucosa consumida, por lo que en todas las mutantes analizadas, la entrada a la fase estacionaria coincide con la terminación de la glucosa del medio de cultivo (Fig. 5).

Tabla 2. Tiempos de duplicación (t_D) obtenidos para la cepa silvestre y mutantes en *pts* y *pyk*

Strain	$t_D(\text{min})^a$ (promedio \pm SD)	% Incremento ^b
JM101 (WT)	58.8 \pm 2.10	0
PB22 (<i>pykA</i>)	69.3 \pm 3.95	17.9
PB24 (<i>pykF</i>)	69.4 \pm 1.72	18.0
PB25 (<i>pykA-pykF</i>)	82.2 \pm 0.60	39.8
PB12 (<i>pts</i>) Glc ⁺	106.4 \pm 2.79	80.9
PB26 (<i>pts-pykA</i>)	98.5 \pm 1.62	67.6
PB27 (<i>pts-pykF</i>)	141.0 \pm 0.06	139.8

^a Los datos se presentan como el promedio de 2 a 4 mediciones independientes.

^b Calculado de las diferencias entre el t_D de las cepas silvestre y mutantes.



Figs. 4 y 5. Cinéticas de crecimiento y curvas de consumo de glucosa de las cepas silvestre y las diferentes mutantes *pyk* y *pts* en medio M-9 con glucosa.
 ○ Wt, □ *pykA*, △ *pykF*, ▽ *pykA pykF*, ◇ *pts*, ○ *pts pykA* y ● *pts pykF*.

Evaluación de los parámetros cinéticos de las fermentaciones.

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

Con el objeto de determinar la eficiencia de las mutantes *pyk* y *pts* para dirigir la glucosa a proteína se obtuvieron los rendimientos de biomasa utilizando glucosa como sustrato limitante. Como se observa en la Tabla 3, la interrupción de uno o ambos genes provocó un ligero decremento en el rendimiento de proteína. Las mutantes en *pts* y *pts-pykA*, en cambio, canalizaron la glucosa a proteína con una eficiencia 35% mayor que la cepa silvestre. Por otro lado, la introducción de la mutación *pykF* en una cepa carente del sistema PT, no mostró diferencias significativas en los rendimientos proteína-glucosa comparados con los mostrados por la cepa silvestre.

Velocidad específica de consumo de sustrato (Q_s).

Se calculó también la velocidad de consumo de glucosa para todas las mutantes *pyk* y *pts*. Los resultados mostraron que la velocidad específica del consumo de glucosa en las mutantes sencillas en piruvato cinasa, fue muy similar al mostrado por la cepa silvestre (Tabla 4). La doble mutante en la piruvato cinasa, en cambio, mostró un ligero decremento en el Q_s con respecto a la cepa silvestre y a las mutantes en uno de los dos genes *pyk*. Es interesante que las mutantes en *pts* y *pts-pyk* mostraron un decremento significativo en la velocidad específica de consumo de glucosa en comparación con la obtenida en la cepa silvestre (Tabla 4). Estas mutantes consumieron glucosa a una velocidad 45% menor que la mostrada por la cepa silvestre y las mutantes en una de las dos piruvato cinasas. No se observaron sin embargo, diferencias significativas en los valores de Q_s entre la mutante *pts* y las *pts-pyk*.

Rendimiento biomasa-CO₂ (Y_{x/CO_2}).

Debido a que en el catabolismo de la glucosa existen puntos específicos de producción de CO₂, la medición de esta molécula en las diferentes cepas, puede aportar cierta información acerca de las vías metabólicas que pueden estar siendo utilizadas para el catabolismo de la glucosa.

Los rendimientos biomasa-CO₂ obtenidos para las distintas cepas mostraron que la cepa silvestre sintetizó más gramos de proteína por mol de CO₂ que todas las mutantes *pyk* y *pts* (Tabla 3).

Cepa	$Y_{X/S}$ (g _p /g _s)	$Y_{CO_2/S}$ (molCO ₂ /mol _s)	Y_{X/CO_2} (g _p /molCO ₂)	$Y_{Acet/S}$ (mol _{Acet.} /mol _s)
Wt	$0.26 \pm 1.5e^{-3}$	1.55 ± 0.07	28.6 ± 1.17	0.45 ± 0.02
<i>pykA</i>	0.22 ± 0.02	1.66 ± 0.39	24.2 ± 1.73	0.52
<i>pykF</i>	$0.20 \pm 6.0e^{-4}$	1.81 ± 0.13	21.5 ± 2.05	0.47 ± 0.09
<i>pykA-pykF</i>	$0.22 \pm 4.5e^{-3}$	1.59 ± 0.20	23.2 ± 3.85	0.35
<i>pts Glc⁺</i>	0.35 ± 0.02	2.36 ± 0.20	22.2 ± 0.82	0
<i>pts-pykA</i>	0.33 ± 0.02	2.45 ± 0.03	23.4 ± 2.3	0
<i>pts-pykF</i>	0.26 ± 0.01	2.02 ± 0.02	22.8 ± 2.77	0

Tabla 3. Rendimientos con base en glucosa y en CO₂ obtenidos para las distintas mutantes *pyk* y/o *pts*.

Cepa	Q_s (g _s /g _p .h)	Q_{CO_2} (mmolCO ₂ /g _p .h)	$Q_{Acet.}$ (g _{Acet.} /g _p .h)
Wt	2.72 ± 0.08	21.66 ± 1.82	$0.4 \pm 4e^{-3}$
<i>pykA</i>	2.65 ± 0.22	19.01 ± 2.17	0.5
<i>pykF</i>	2.73 ± 0.23	19.95 ± 1.57	0.43 ± 0.06
<i>pykA-pykF</i>	2.34 ± 0.03	16.96 ± 0.24	0.27
<i>pts Glc⁺</i>	1.12 ± 0.07	15.00 ± 0.52	0
<i>pts-pykA</i>	1.29 ± 0.02	13.40 ± 1.0	0
<i>pts-pykF</i>	1.13 ± 0.04	12.54 ± 2.17	0

Tabla 4. Obtención de velocidades de consumo de glucosa (Q_s) y de producción de CO₂ (Q_{CO_2}) y acetato ($Q_{Acet.}$) en las distintas mutantes *pyk* y/o *pts*.

Velocidad específica de producción de CO₂ (Q_{CO₂}).

Este parámetro fue calculado en base a los datos de rendimiento biomasa-CO₂ con el objeto de determinar si existen diferencias en cuanto a la velocidad con la que el CO₂ es producido en las diferentes mutantes *pyk* y *pts*. Aunque los rendimientos biomasa-CO₂ fueron muy similares en todas las mutantes, los resultados mostraron que la cepa silvestre produjo el CO₂ a una mayor velocidad en comparación con las demás cepas (Tabla 4). En las demás cepas se observó una disminución gradual en los valores del Q_{CO₂} conforme se le introdujeron las mutaciones en *pyk* y/o *pts*. Las mutantes en una de las dos piruvato cinasas mostraron sólo una ligera disminución en el Q_{CO₂} con respecto a la cepa silvestre. A su vez, la doble mutante en la piruvato cinasa mostró un pequeño decremento en los valores de Q_{CO₂} en comparación con las mutantes sencillas y una disminución más importante con respecto a la cepa silvestre. La cepa *pts* mostró un Q_{CO₂} aun menor al mostrado por la doble mutante en la piruvato cinasa, mientras que la cepa *pts-pykF* fue la que mostró el menor valor de Q_{CO₂} de todas las mutantes.

Rendimiento CO₂-sustrato (Y_{CO₂S}).

Con el objeto de determinar el efecto de las mutaciones el *pts* y *pyk* en la producción de CO₂ con base en la glucosa utilizada, se obtuvieron los rendimientos CO₂-sustrato. Los resultados mostraron que los rendimientos CO₂-sustrato fueron muy similares entre la cepa silvestre y las mutantes en uno o ambos genes *pyk*, ya que éstos fluctuaron entre 1.55 y 1.81 moles de CO₂/mol de glucosa consumida (Tabla 3). Sin embargo, las mutantes *pts* y *pts-pykA* formaron un mol mas de CO₂ por mol de glucosa consumida que las otras cepas. En la mutante *pts-pykF* los rendimientos CO₂/glucosa también fueron mayores a los obtenidos por las cepas silvestre y mutantes *pyk*; sin embargo, fueron menores a los obtenidos por las otras mutantes en *pts*.

Identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos producidos en las fermentaciones.

Para evaluar la presencia de uno o algunos de los productos de fermentación ácido-mixta en los sobrenadantes obtenidos de las fermentaciones (Ver materiales y métodos), se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De los análisis realizados para todas las mutantes sólo se detectó acetato. Este compuesto, sin embargo, solo fué detectado en la cepa silvestre y en las mutantes *pyk* y no así en las mutantes *pts* o *pts-pyk*.

Rendimientos acetato-sustrato ($Y_{P/S}$).

Para determinar si las mutaciones realizadas en *pyk* y *pts* tienen un efecto en la producción de acetato, se obtuvieron los rendimientos acetato-glucosa. La cepa silvestre y la mutante *pykF* mostraron rendimientos muy similares de síntesis de acetato a partir de glucosa (Tabla 3). La mutante *pykA* por su parte, mostró un incremento del 10% en la formación de acetato con respecto a la cepa silvestre, mientras que la doble mutante en la piruvato cinasa produjo 20% menos acetato.

Velocidades específicas de producción de acetato (Q_{Acet}).

Este parámetro fue calculado con el objeto de determinar si existen diferencias en la velocidad con la que el acetato es producido en las distintas mutantes *pyk* y *pts* construidas. Los resultados mostraron que la mutante *pykA* es la cepa que produce acetato a una mayor velocidad con respecto a la proteína formada (Tabla 4). En este caso, a diferencia del Q_{Acet} obtenido con base en glucosa, la cepa silvestre produjo acetato a una menor velocidad respecto a la proteína formada que las mutantes *pykA* o *pykF*. Sin embargo, continúa siendo 30% mayor al mostrado por la doble mutante *pykA-pykF*, que produjo 0.27 g de acetato/g proteína.h.

Estimación de la recuperación de carbono.

Con el objeto de cuantificar la cantidad de glucosa que se había utilizado para la formación de CO₂, de peso seco o de acetato, se realizó un balance de carbono. Los resultados mostraron que en la cepa silvestre y en las mutantes en *pts* y *pts-pykA*, todo el carbono inicial fue recuperado en peso seco, CO₂ o en acetato (en el caso de la cepa silvestre), obteniéndose valores muy cercanos al 100% de recuperación del carbono (Tabla 5). Estas dos últimas cepas fueron además las que canalizaron más glucosa hacia la formación de biomasa y produjeron más CO₂ (conjuntamente con la cepa *pts-pykF*) que todas las demás cepas analizadas (Tablas 3 y 5). Por otro lado, en las mutantes en uno o ambos genes de la piruvato cinasa, así como en la mutante *pts-pykF*, estos productos cuantificados sólo lograron sumar porcentajes de recuperación de carbono de alrededor del 80-85%, siendo que las mutantes en una de los dos genes *pyk* al igual que la cepa silvestre, canalizaron alrededor del 15% del carbono a la formación de acetato a diferencia de la doble mutante en piruvato cinasa en la que el % de recuperación fue del 11% o de las mutantes en *pts* en las que no se detectó formación de acetato.

Cepa	Peso seco ^a	CO ₂ ^b	Acetato ^c	%TOTAL
Wt	57.9	23.9	14.8	96.5
<i>pykA</i>	50.7	17.9	17.3	85.9
<i>pykF</i>	44.2	24.3	14.8	83.3
<i>pykA-pykF</i>	45.7	21.7	11.4	78.8
<i>pts</i>	76.0	39.9	-	115.9
<i>pts-pykA</i>	64.3	31.3	-	97.6
<i>pts-pykF</i>	48.4	33.1	-	81.5

Tabla 5. Balance de carbono con base en la formación de peso seco^a, CO₂^b y acetato^c.

Datos expresados como porcentaje de recuperación de carbono.

Crecimiento de las diferentes cepas en medio sólido con diferentes fuentes de carbono

Debido a que existen otras rutas metabólicas capaces de sintetizar piruvato en ausencia de glucosa, se investigó el efecto de la utilización de otras fuentes de carbono (en especial fuentes de carbono no-PTS, como las pentosas y el gluconato) en el crecimiento de las mutantes en cajas con medio mínimo mas una de las fuentes de carbono.

Los resultados presentados en las Tabla 6a-d muestran que en la cepa silvestre, a diferencia de las demás mutantes, se detectó la presencia de colonias pequeñas en todas las fuentes de carbono probadas, desde las 24 horas de incubación, aunque en succinato y piruvato fueron más pequeñas. Las mutantes en uno de los dos genes *pyk* mostraron un crecimiento ligeramente menor al de las colonias de la cepa silvestre en glucosa, gluconato y pentosas a este mismo tiempo. Sin embargo, no se observó el crecimiento de ninguna colonia en succinato o piruvato sino hasta las 48 horas de incubación (Tabla 6a-b). La cepa *pykA-pykF* mostró un tamaño de colonia muy parecido al de las mutantes sencillas usando glucosa como fuente de carbono; sin embargo, a este tiempo las colonias crecidas en gluconato fueron de menor tamaño que en las mutantes sencillas, mientras que en succinato y piruvato las colonias sólo fueron observables hasta las 48 horas de incubación. Sin embargo, esta mutante no fue capaz de crecer en ninguna de las dos pentosas probadas (ribosa o succinato) ni aun después de 96 horas de incubación (Tabla 6d). Por otro lado, en las cepas con el sistema PT deletado (*pts*, *pts-pykA* y *pts-pykF*), el tamaño de las colonias obtenido en glucosa fue menor a las de la cepa silvestre o en mutantes en una o ambas piruvato cinasas a las 24 horas de incubación. En gluconato el tamaño de las colonias fue muy parecido al de las mutantes *pyk* a este mismo tiempo. En ribosa las colonias fueron apenas detectables a las 24 horas, pero para las 72 horas éstas llegaron a tener el mismo tamaño que las crecidas en glucosa. En xilosa en cambio, no se observó crecimiento de colonias en estas mutantes sino hasta las 48 horas, donde las colonias de la mutante *pts-pykF* mostraron ser más grandes que las obtenidas por las mutantes *pts* y *pts-pykA* a ese mismo tiempo. Estas diferencias continuaron para las 72 horas y no fue sino hasta las 96 horas de cultivo que todas tuvieron el mismo tamaño tanto entre sí como con respecto a las crecidas en glucosa (Tabla 6a-d). En succinato el crecimiento de las mutantes *pts* se observó hasta las 72 horas de incubación, por lo que para las 96 horas no se logró obtener el mismo tamaño de colonias que con las otras fuentes de carbono, incluyendo al piruvato. La triple mutante (*pts-pykA-pykF*) como era de esperarse, no creció en glucosa como

única fuente de carbono y al igual que con la doble mutante en piruvato cinasa, no creció tampoco en fuentes de carbono de la vía de las pentosas (ribosa y xilosa). Esta mutante sin embargo, fue capaz de crecer en gluconato, así como en piruvato y succinato, aunque el tamaño de las colonias fue menor al mostrado por las demás mutantes en estas mismas fuentes de carbono a las 96 horas de incubación, a excepción de las crecidas en succinato que fueron muy similares a las de las otras mutantes *pts* a este mismo tiempo.

a) 24 horas de incubación

	GLUCOSA	GLUCONATO	RIBOSA	XILOSA	SUCCINATO	PIRUVATO
Wt	++	+±	+±	+	±	±
<i>pykA</i>	+±	+	+	±	-	-
<i>pykF</i>	+±	+	+	±	-	-
<i>pykA-pykF</i>	+±	±	-	-	-	-
<i>pts</i>	+	+	±	-	-	-
<i>pts-pykA</i>	+	+	±	-	-	-
<i>pts-pykF</i>	+	±	±	-	-	-
<i>pts-pykA-pykF</i>	-	-	-	-	-	-

b) 48 horas de incubación

	GLUCOSA	GLUCONATO	RIBOSA	XILOSA	SUCCINATO	PIRUVATO
Wt	+++	+++	+++	++	+	++
<i>pykA</i>	+++	++	++	+	+	+±
<i>pykF</i>	+++	++	++	+	+	+±
<i>pykA-pykF</i>	+++±	+	-	-	+	+±
<i>pts</i>	++	++	+	+	-	+±
<i>pts-pykA</i>	++	++	+	+	-	+±
<i>pts-pykF</i>	+±	+±	+	+	-	+±
<i>pts-pykA-pykF</i>	-	-	-	-	-	±

c) 72 horas de incubación

	GLUCOSA	GLUCONATO	RIBOSA	XILOSA	SUCCINATO	PIRUVATO
Wt	+++	+++	+++	++±	++	++±
<i>pykA</i>	+++	+++	+++	++	++	++±
<i>pykF</i>	+++	+++	+++	++	++	++±
<i>pykA-pykF</i>	+++	+++	-	-	++	++±
<i>pts</i>	+++	+++	+++	+	+	++
<i>pts-pykA</i>	+++	+++	+++	++	+	++
<i>pts-pykF</i>	+++	++	+++	++	+±	++
<i>pts-pykA-pykF</i>	-	±	-	-	+	+

d) 96 horas de incubación

	GLUCOSA	GLUCONATO	RIBOSA	XILOSA	SUCCINATO	PIRUVATO
Wt	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>pykA</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>pykF</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>pykA-pykF</i>	+++	+++	-	-	+++	+++
<i>pts</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>pts-pykA</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>pts-pykF</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>pts-pykA-pykF</i>	-	+	-	-	++	++

Tabla 6. Crecimiento de colonias en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono.

Análisis enzimáticos.

Con el objeto de tener un mejor entendimiento del papel relativo de cada una de las dos piruvato cinasas de *E. coli*, se midieron las actividades enzimáticas tanto de la isoenzima activada por AMP como de la activada por fructosa 1,6-difosfato (Ver materiales y métodos). Las mediciones se llevaron a cabo en el mismo grupo de experimentos presentados en la Fig. 4. Las actividades específicas se obtuvieron a partir de extractos obtenidos a lo largo de todo el ciclo de crecimiento de las cepas. Como se presenta en la Fig. 6, en todos los puntos muestreados se detectó actividad enzimática, tanto para PykA como para PykF. Estas actividades mostraron además valores muy similares a lo largo de toda la curva. En las condiciones analizadas, la actividad específica obtenida para la enzima PykF de la cepa silvestre fue sin embargo, 15 veces mayor que la obtenida para la isoenzima PykA (Tabla 7). Por otro lado, se observó que en la ausencia de uno de los dos genes de la piruvato cinasa, el nivel enzimático de la enzima funcional tuvo sólo un ligero incremento por lo que la enzima funcional no fue capaz de compensar la falta de la otra enzima.

Los datos de la actividad específica (Tabla 7) mostraron diferencias significativas en las actividades de PykA y PykF entre las cepas con un fondo genético PTS⁻ y las obtenidas en las cepas silvestre y mutantes en una de las dos piruvato cinasas. La actividad específica de la enzima PykF disminuyó en un 40% en las cepas *pts* en comparación con las de la cepa silvestre (0.42 UI/mg de proteína en la cepa silvestre vs. 0.25 UI/mg de proteína en las cepas *pts* y *pts-pykA*). La actividad específica de PykA en las mutantes con el sistema *pts* deletado fueron del 30 al 40% mayores a las obtenidas por la cepa silvestre (Tabla 7).

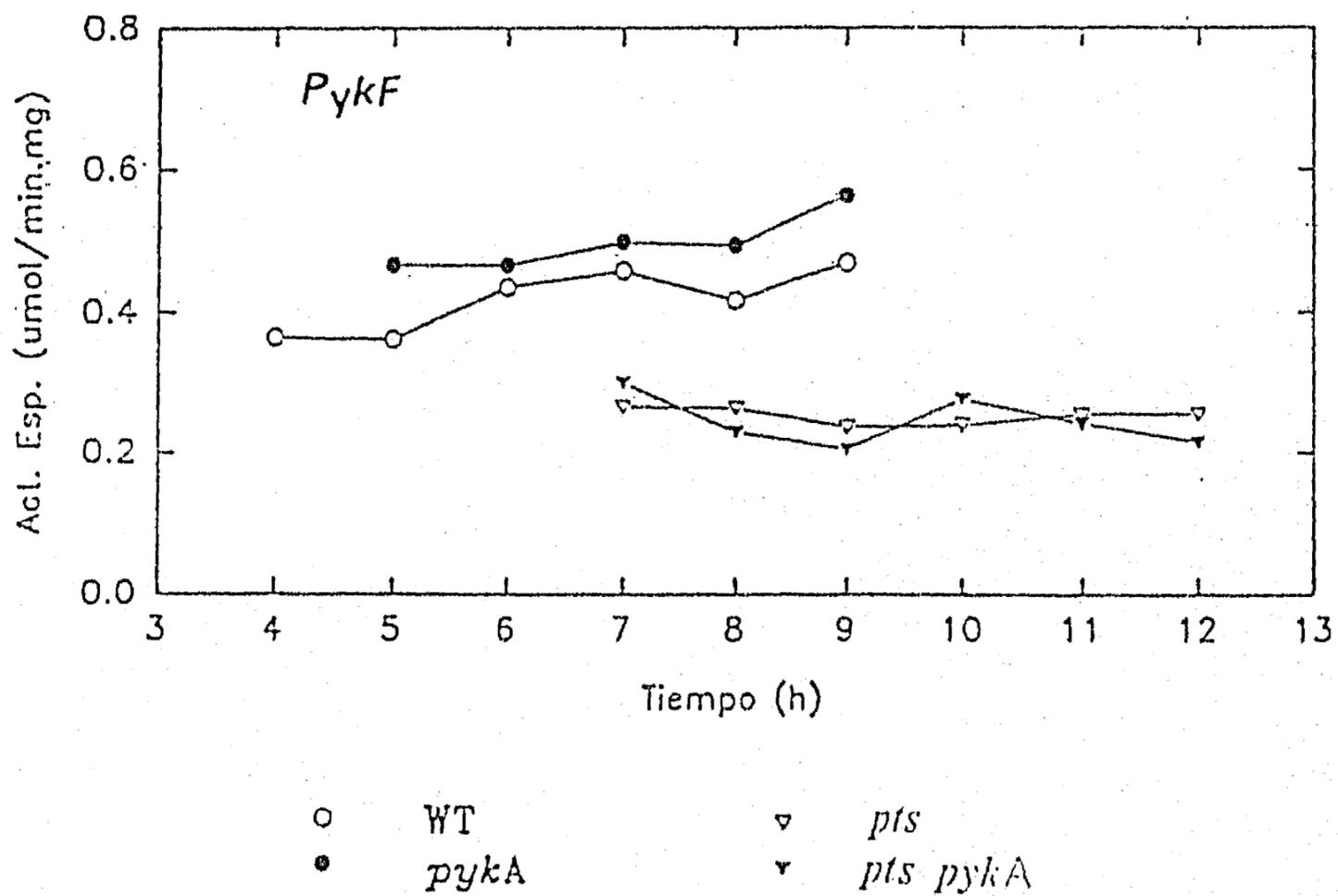
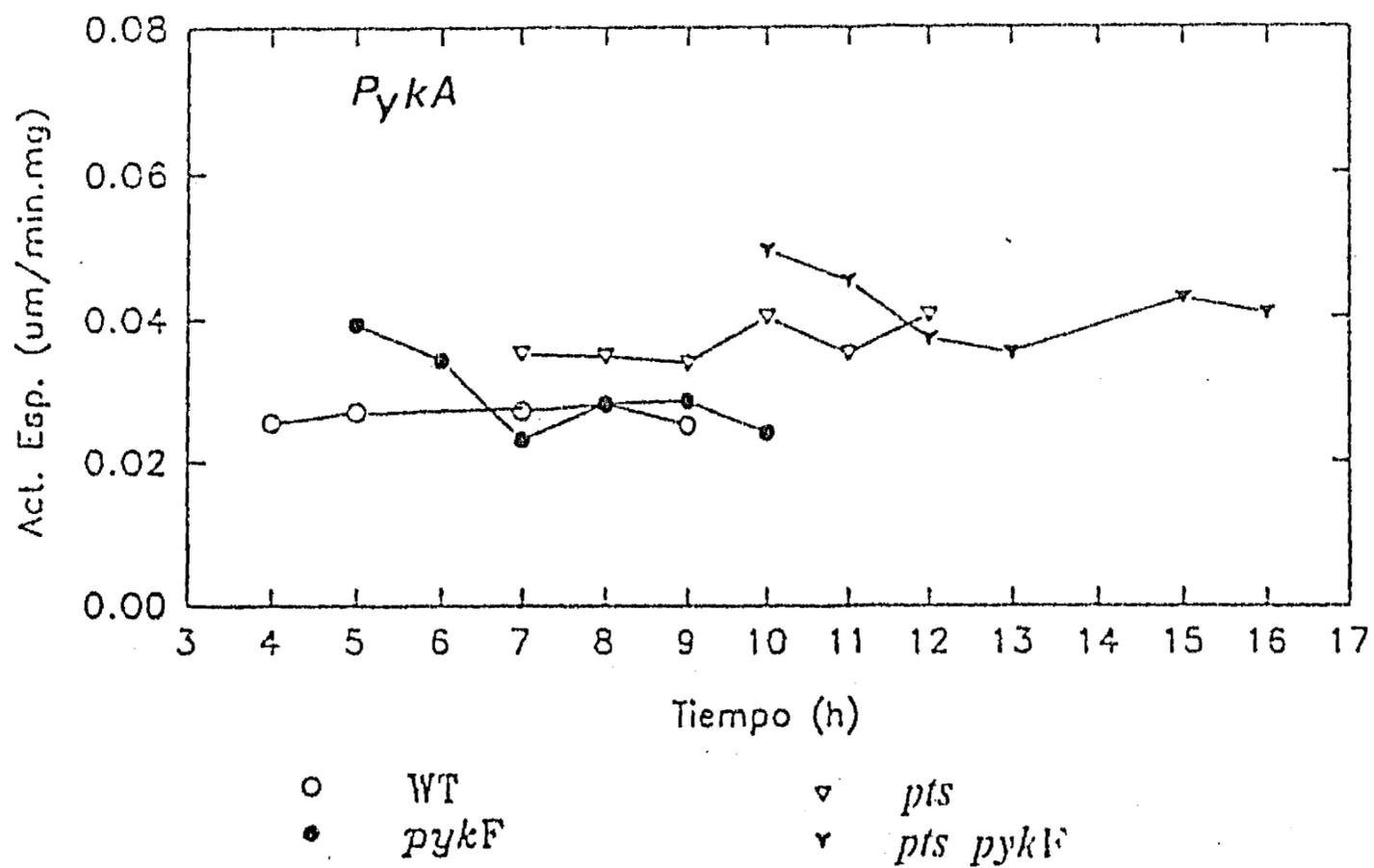


Fig. 6 Actividades específicas de *PykA* y *PykF* a lo largo de todo el ciclo de vida de *E. coli*.

Cepa	Actividad específica (UI/mg proteína)	
	PykF	PykA
Wt	0.42 ± 0.03	0.026 ± 0.002
<i>pykA</i>	0.50 ± 0.04	ND
<i>pykF</i>	ND	0.029 ± 0.003
<i>pykA-pykF</i>	ND	ND
<i>pts-Glc⁺</i>	0.25 ± 0.02	0.037 ± 0.003
<i>pts-pykA</i>	0.25 ± 0.03	ND
<i>pts-pykF</i>	ND	0.042 ± 0.004
<i>pts-pykA-pykF</i>	ND	ND

Tabla. 7. Actividades específicas de las isoenzimas de piruvato cinasa (PykF y PykA) en glucosa. ND-No detectado.

Análisis radiorrespirométricos.

La cuantificación de compuestos radioactivos (como el $^{14}\text{CO}_2$) puede proporcionar información acerca del grado de participación de una vía, en particular en el catabolismo del carbono; por ello se llevó a cabo el diseño y montaje de un sistema para evaluar el $^{14}\text{CO}_2$ formado como producto del catabolismo de glucosa marcada en uno de sus carbonos con C-14. De los diferentes compuestos marcados con C-14, que se encuentran disponibles comercialmente, se decidió trabajar con la glucosa marcada en el carbono 1, debido a que con la glucosa marcada en el carbono 1 es posible medir el CO_2 que es producido por la vía de las pentosas, así como una parte del CO_2 producido en el ciclo de Krebs (Wang *et al.*, 1958).

Los análisis radiorrespirométricos realizados para las diferentes mutantes se presentan en la Fig. 7. La curva de recuperación relativa de $^{14}\text{CO}_2$ así como la gráfica de velocidad de recuperación de $^{14}\text{CO}_2$ obtenidas para la cepa silvestre resultaron ser muy similares a las gráficas reportadas para *E. coli* por el grupo de Wang *et al.* (1958). En la curva de recuperación relativa de $^{14}\text{CO}_2$ para la cepa silvestre (Fig. 7a) se observan claramente dos pendientes, que corresponden a las dos máximos mostrados en la gráficas de velocidad de recuperación de $^{14}\text{CO}_2$. Debido a que se utilizó

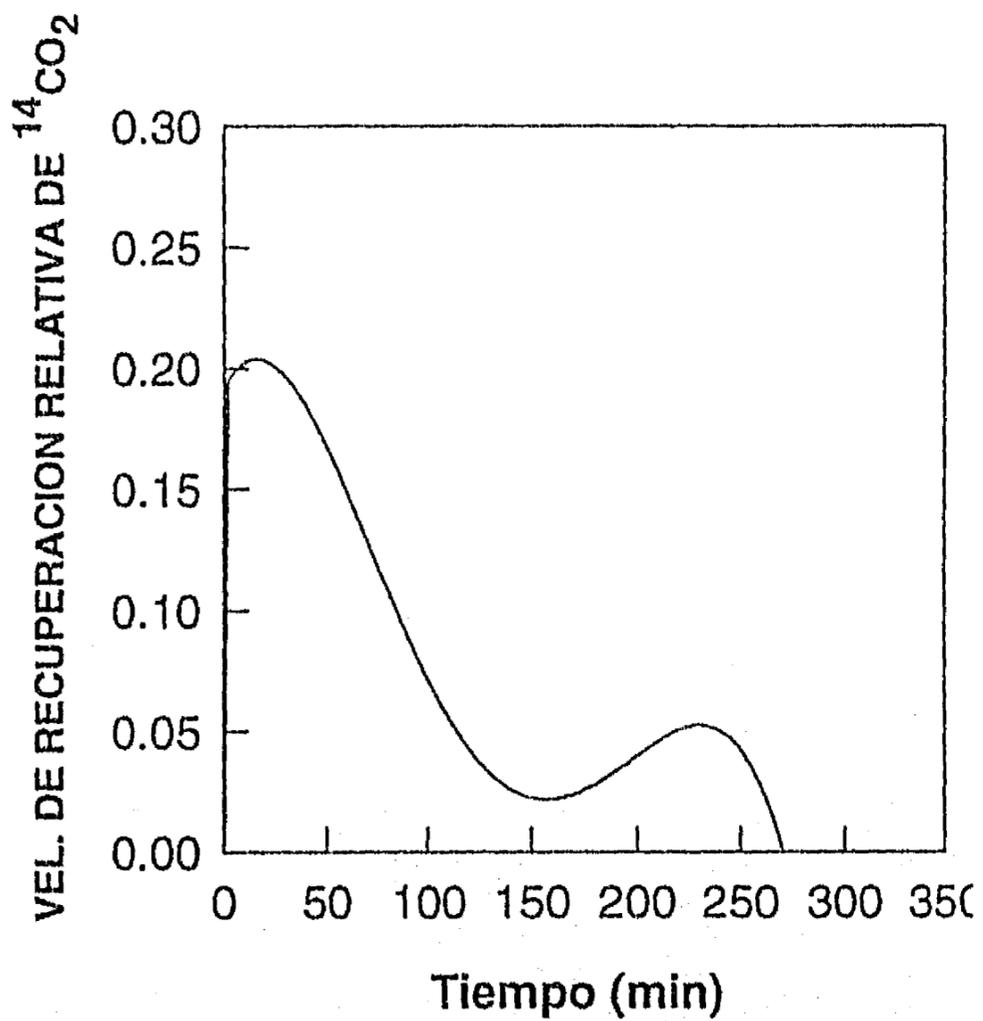
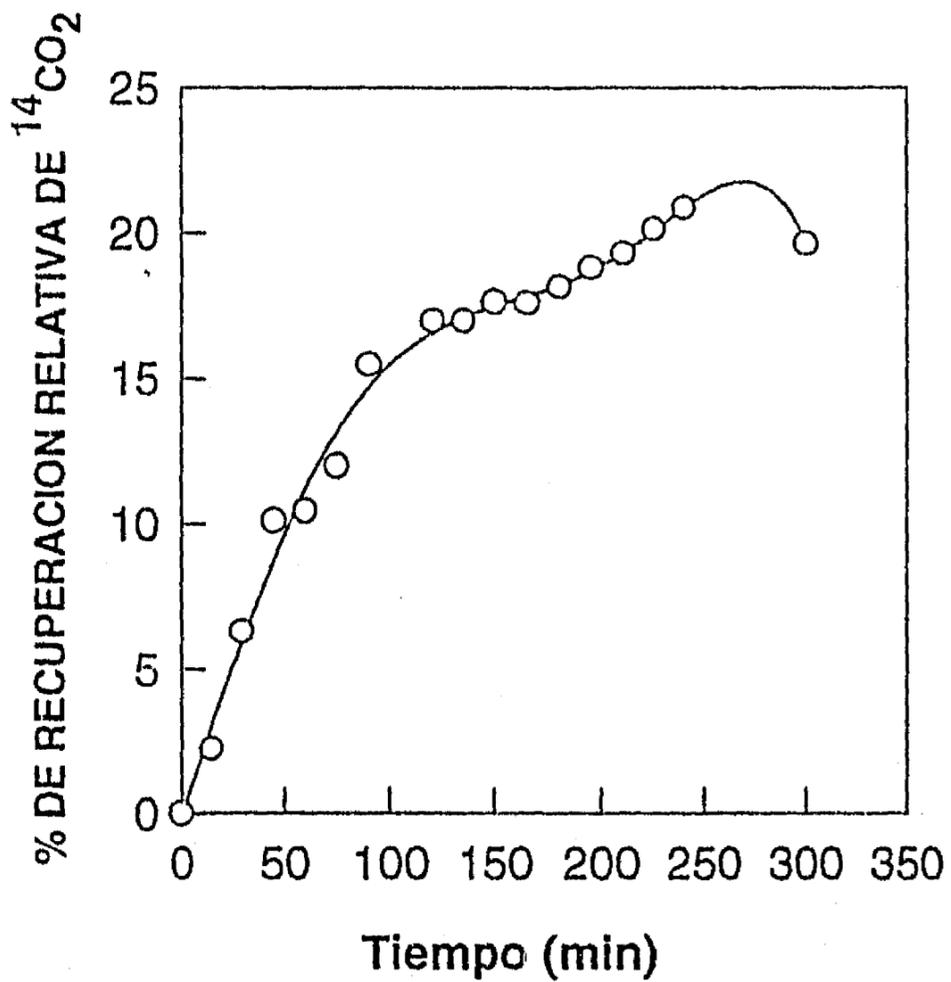
glucosa marcada en el carbono en posición 1, se sabe que el área bajo la curva correspondiente al primer máximo corresponde al CO₂ producido por la vía de las pentosas, mientras que el área del segundo máximo corresponde al CO₂ formado en el ciclo de Krebs (Wang *et al.*, 1958). Las pendientes observadas para las mutantes en una de las dos piruvato cinasas fueron menos evidentes que en la cepa silvestre. En estas mutantes, la recuperación máxima fue obtenida a tiempos más cortos que en la cepa silvestre. Asimismo, en la mutante *pykF* se observó una disminución en el CO₂ producido en el ciclo de Krebs, en comparación al producido por la cepa silvestre. Aunque la presencia del segundo máximo no pareció ser muy claro para el caso de la mutante en *pykA*, se observó que tanto la cepa silvestre como las mutantes en *pykA* y *pykF* dejaron de producir CO₂ alrededor de los 270 minutos, a diferencia de las demás mutantes (*pykA-pykF*, *pts*, *pts-pykA* y *pts-pykF*) que solo mostraron el primer máximo y en las que el CO₂ se dejó de producir alrededor de los 125-150 minutos de la reacción (Figs. 7d-g).

Al comparar los porcentajes de recuperación relativa del ¹⁴CO₂ proveniente de la vía de las pentosas entre las diferentes mutantes (Tabla 8), se observó que las mutantes en uno de los dos genes de piruvato cinasa tuvieron un porcentaje de recuperación de ¹⁴CO₂ muy semejante al obtenido por la cepa silvestre. La doble mutante de la piruvato cinasa, así como la mutante *pts-pykF* produjeron un poco más de ¹⁴CO₂ por la vía de las pentosas que la cepa silvestre. Sin embargo, las mutantes *pts* y *pts-pykA* fueron las que produjeron la mayor cantidad de ¹⁴CO₂ por esta vía.

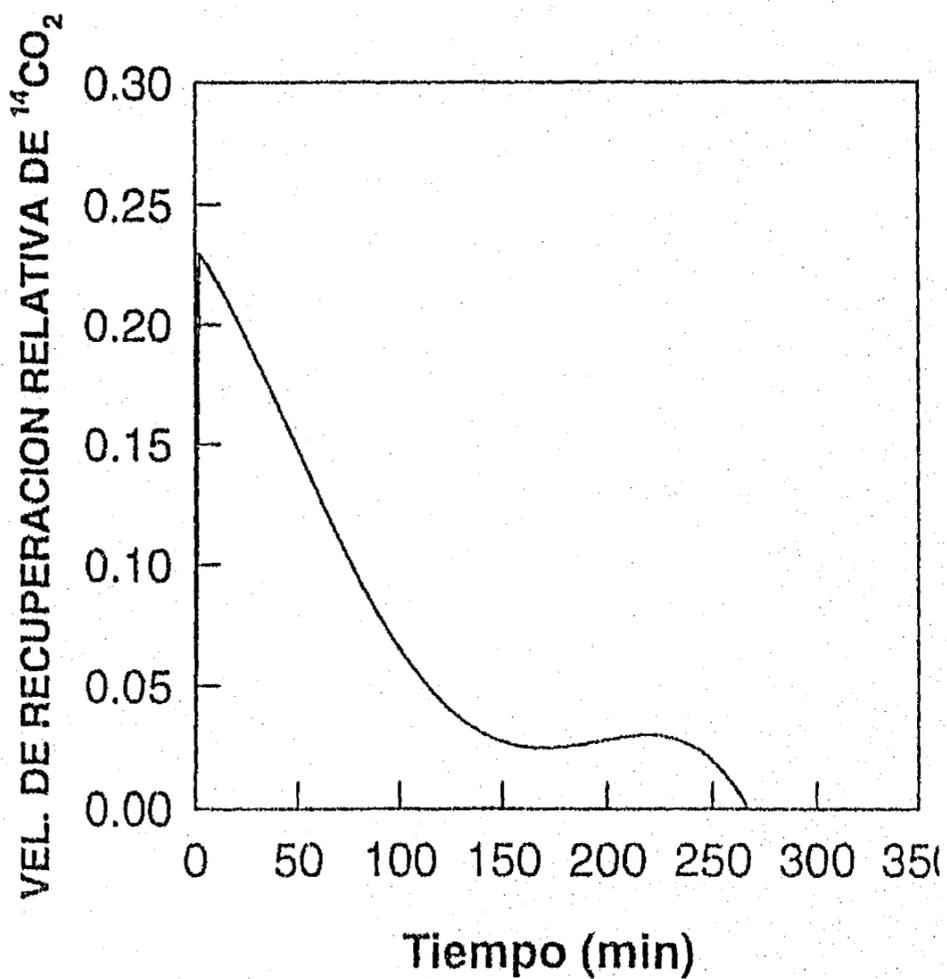
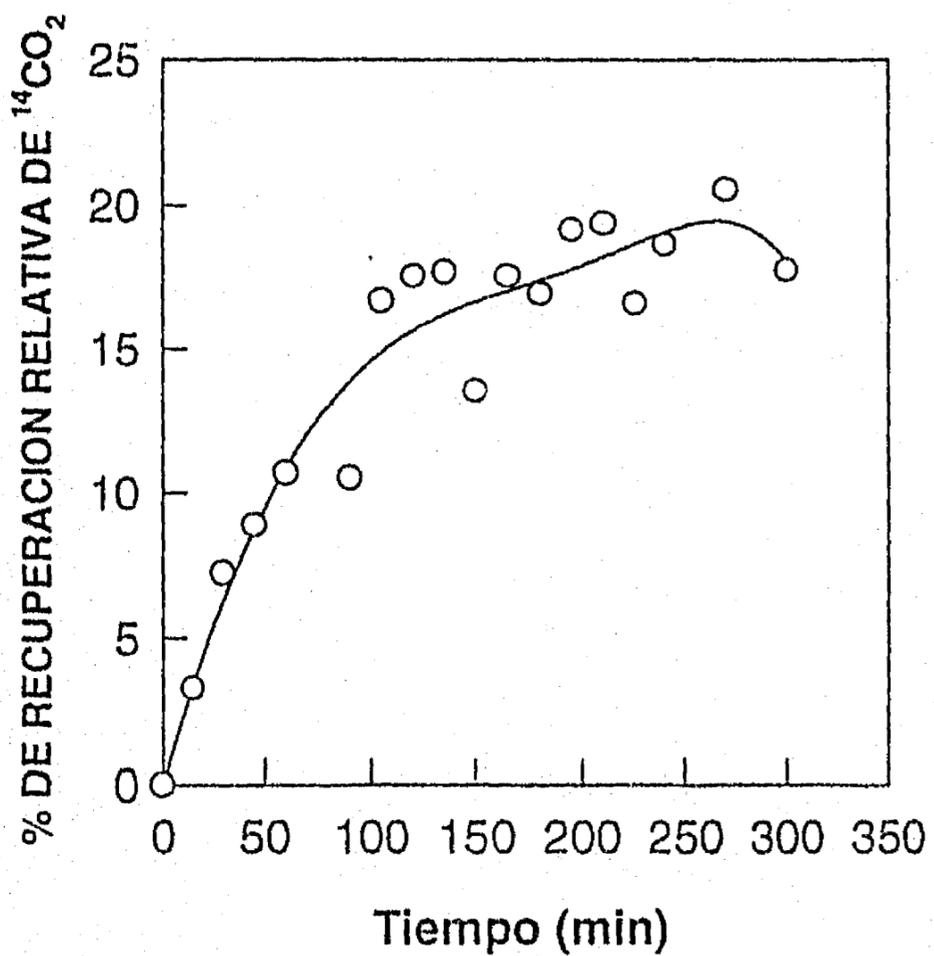
Cepa	% Rec. Rel. ¹⁴ CO ₂ por la vía de las pentosas
Wt	16.98
<i>pykA</i>	16.31
<i>pykF</i>	16.25
<i>pykA-pykF</i>	17.85
<i>pts</i> Glc ⁺	21.46
<i>pts-pykA</i>	21.30
<i>pts-pykF</i>	18.12

Tabla 8. Porcentajes de recuperación relativa de ¹⁴CO₂ por vía de pentosas en mutantes *pyk* y/o *pts*.

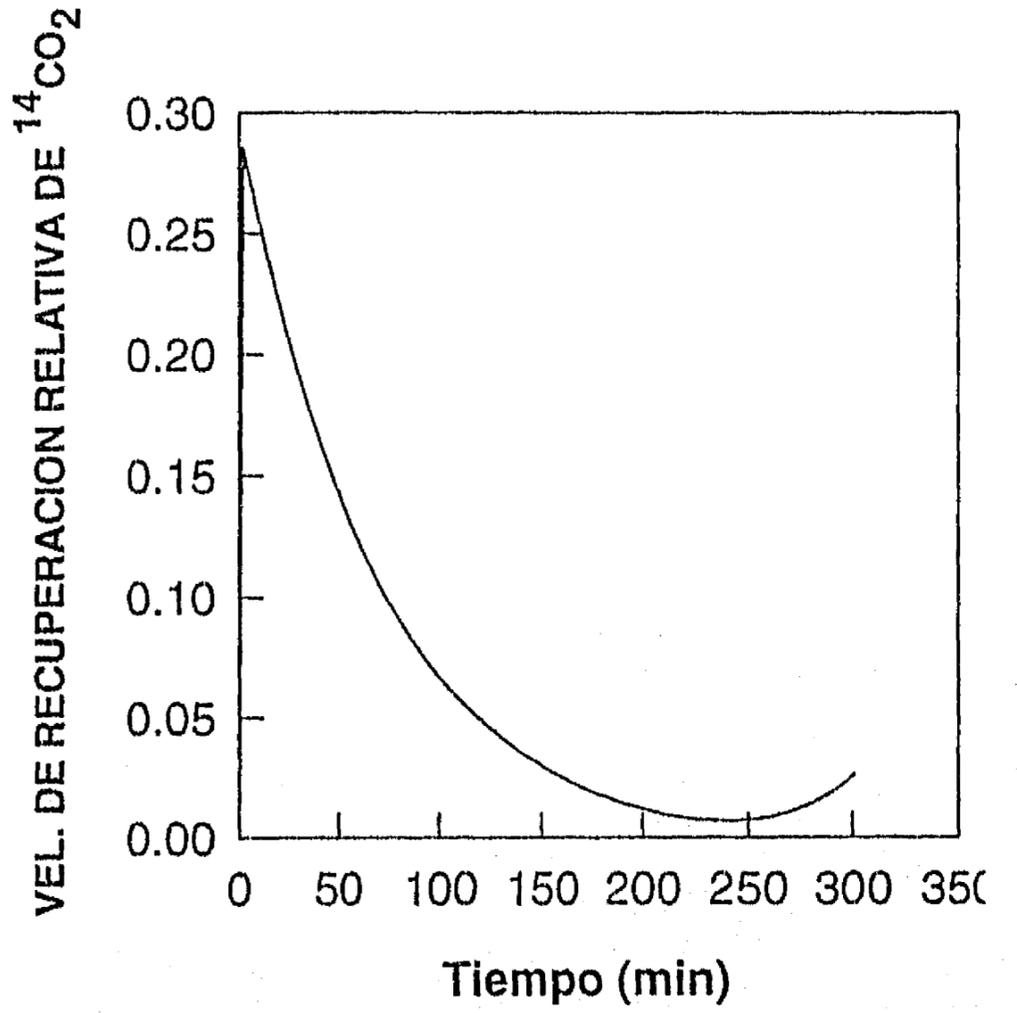
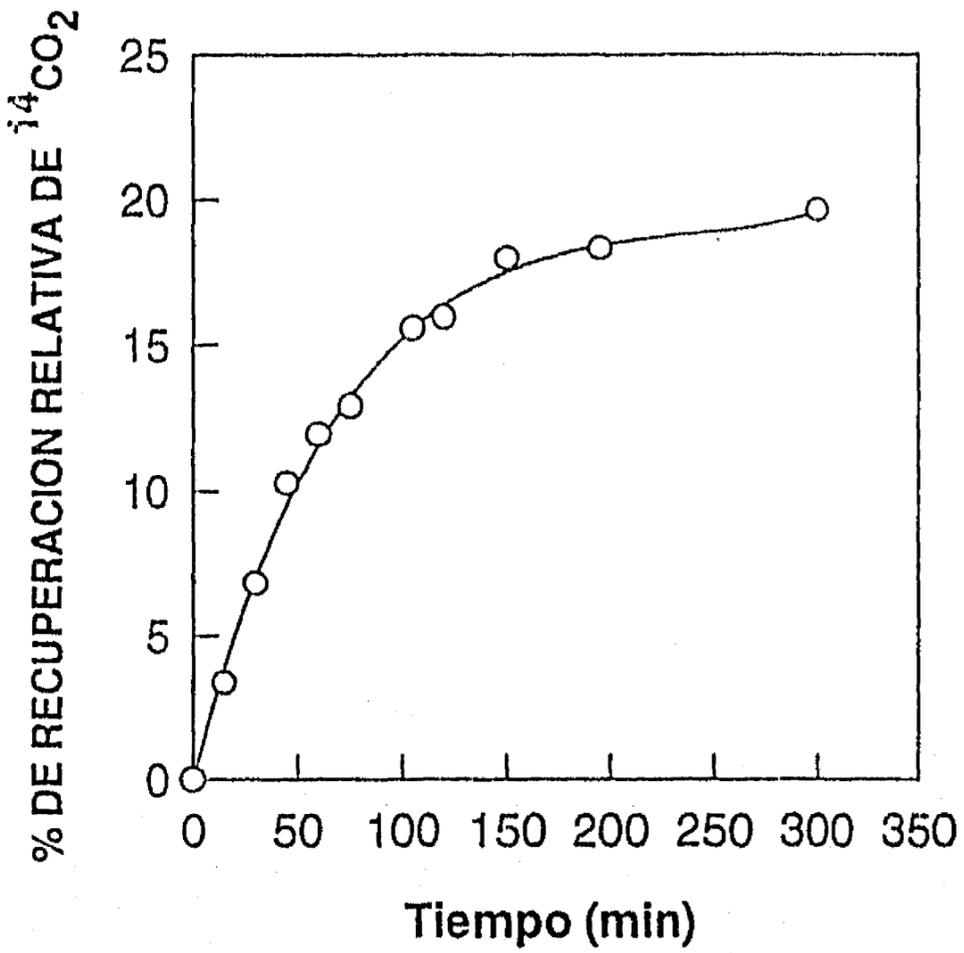
a) Cepa silvestre



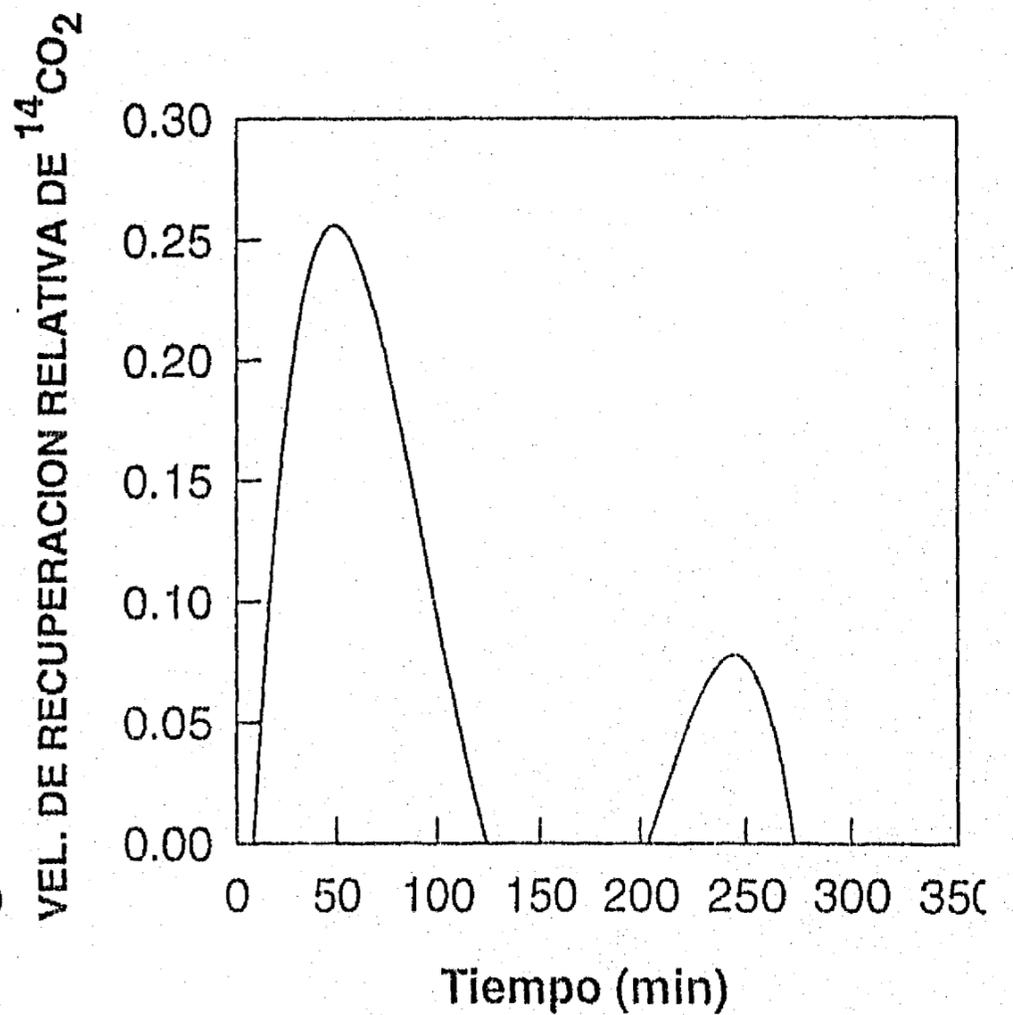
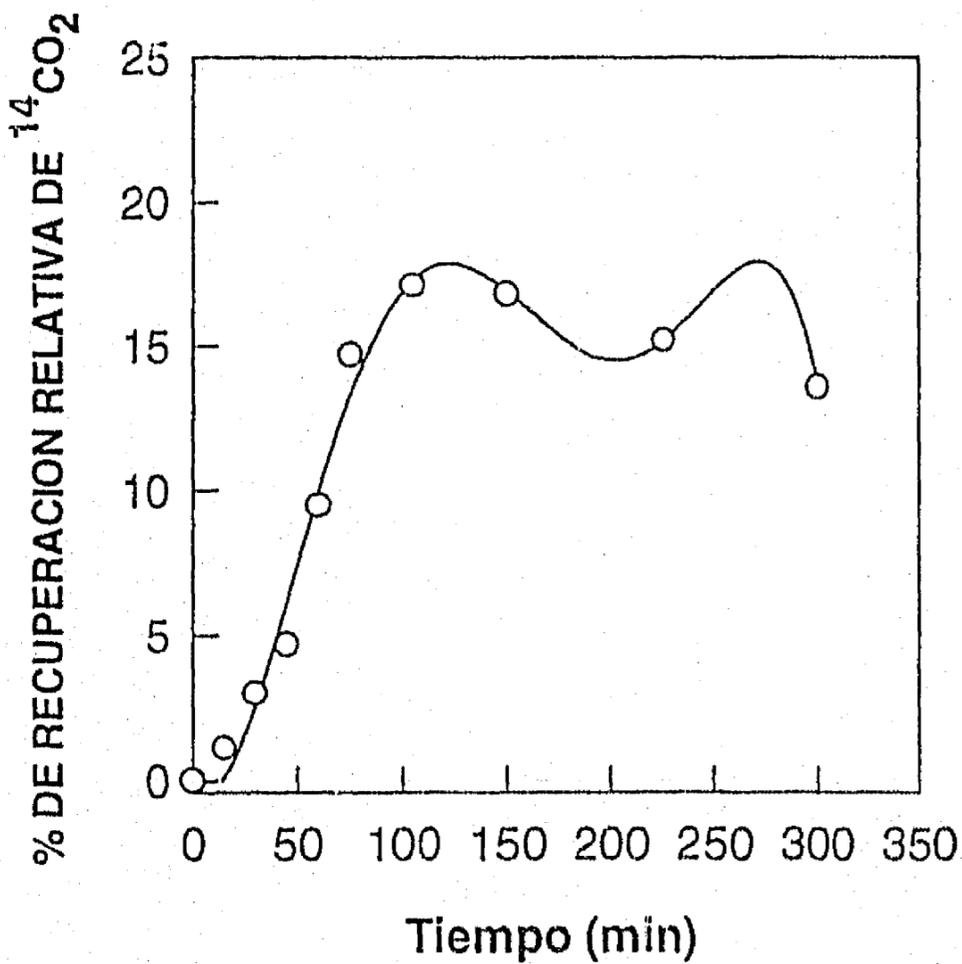
b) Mutante *pykA*



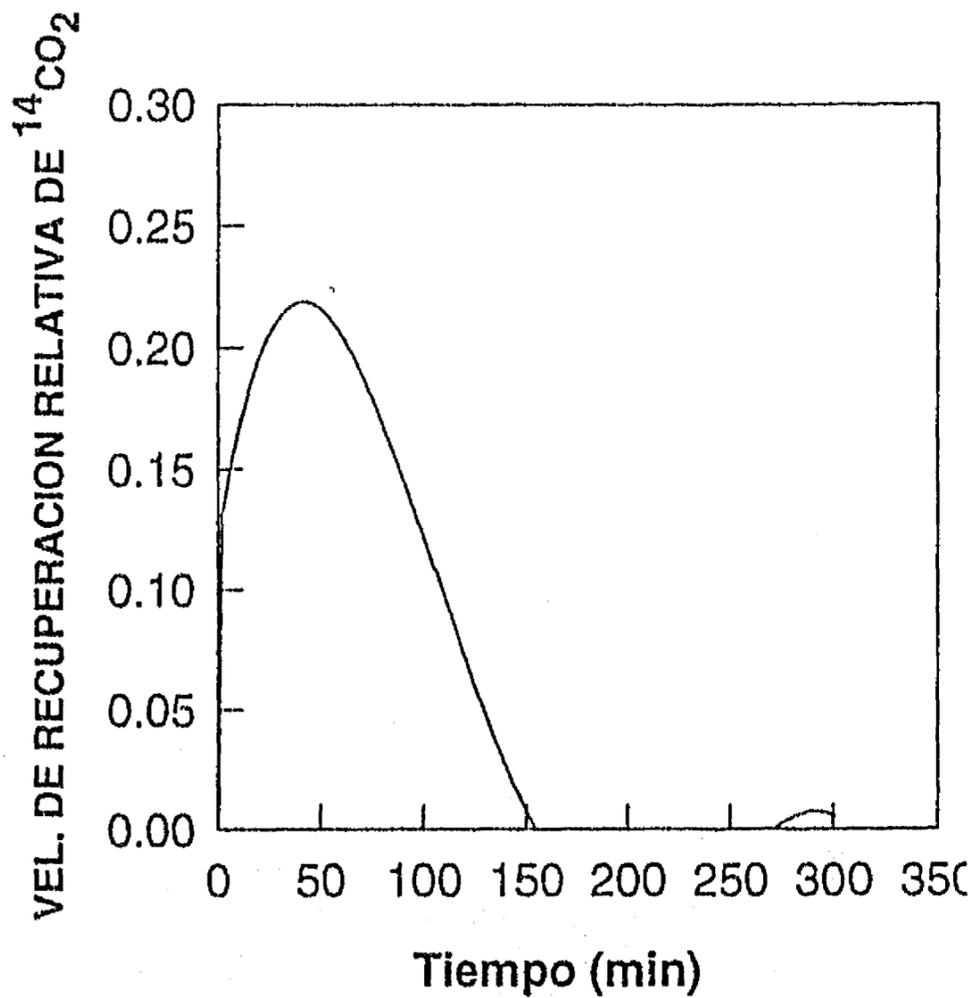
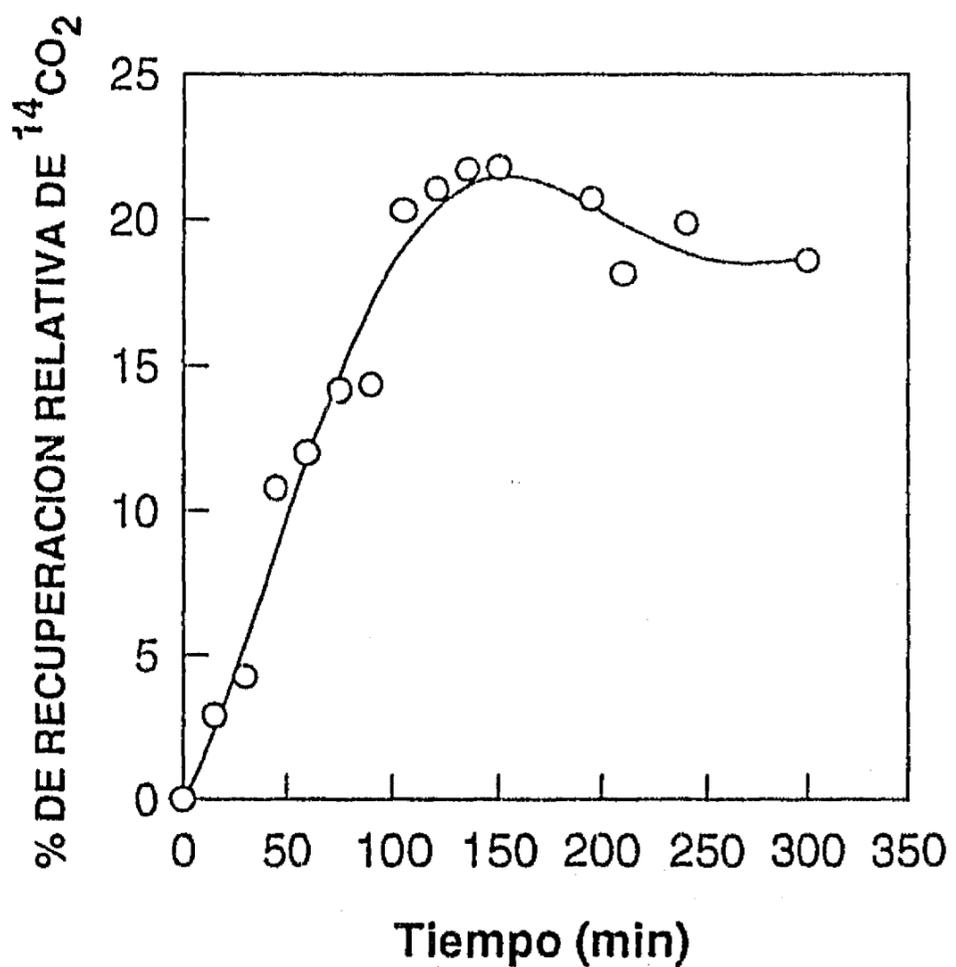
c) Mutante *pykF*



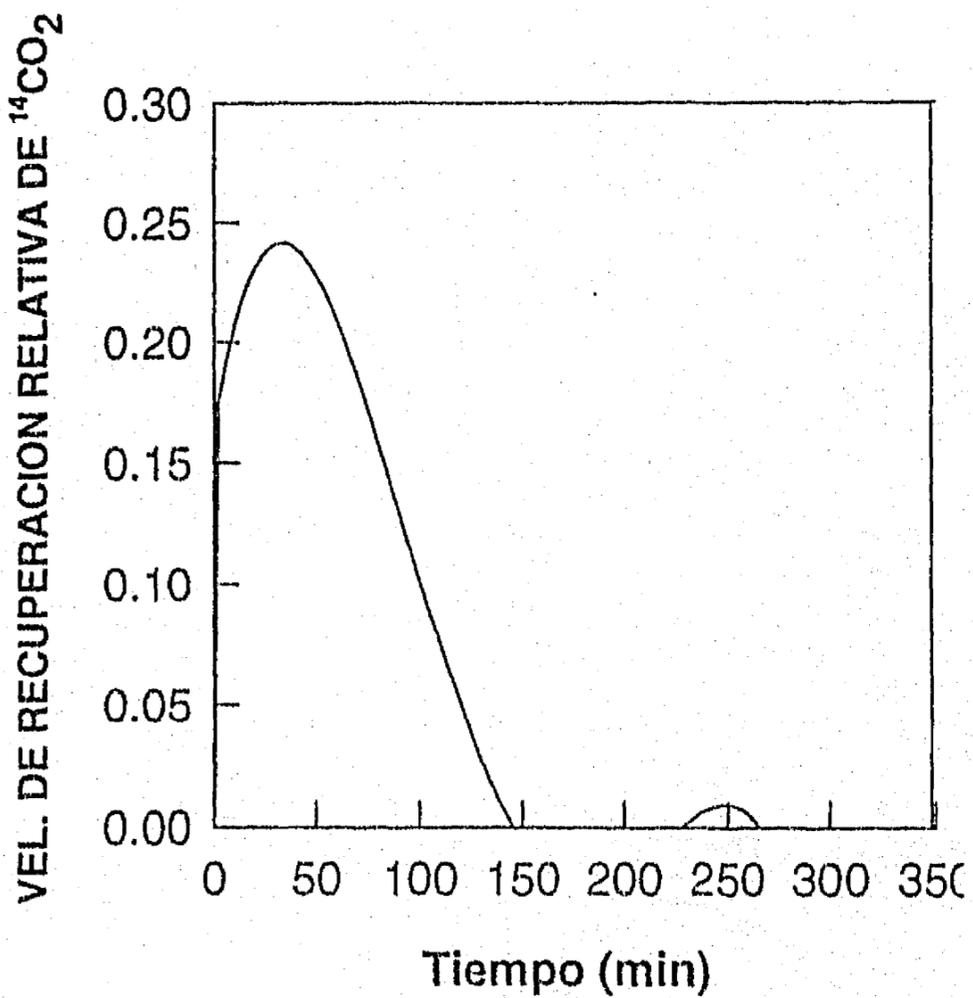
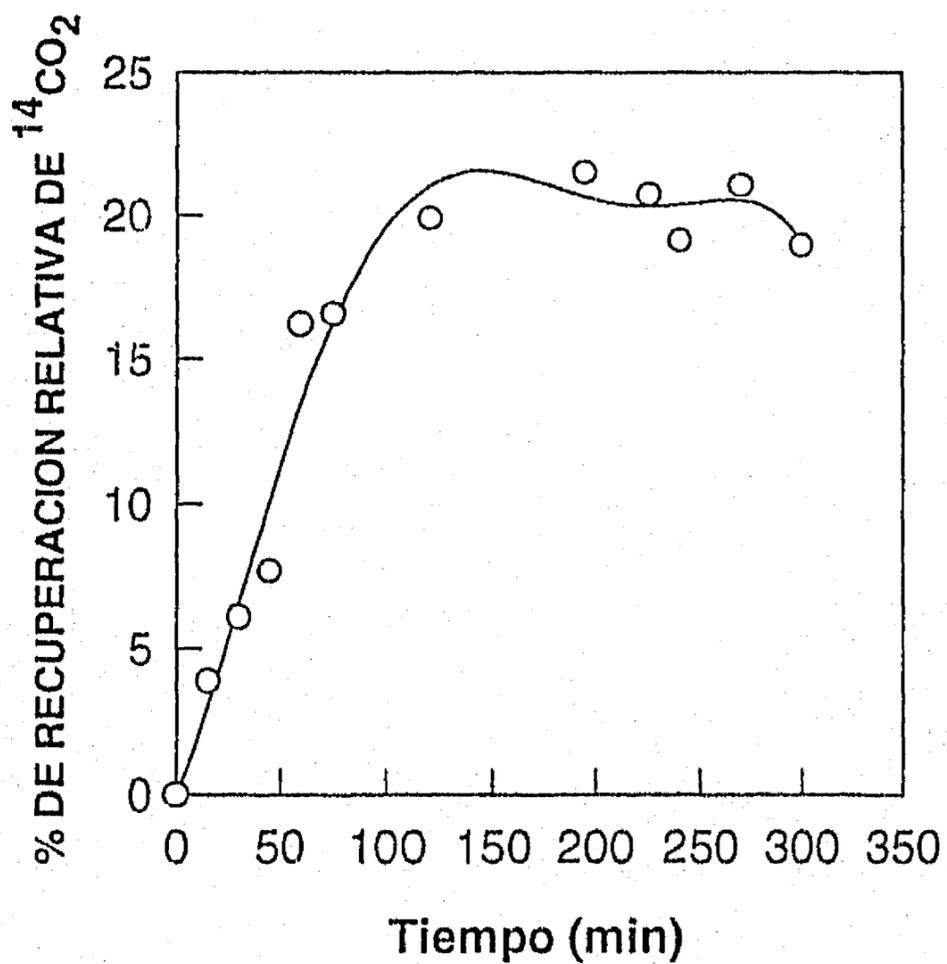
d) Mutante *pykA pykF*



e) Mutante *pts*



f) Mutante *pts pykA*



g) Mutante *pts pykF*

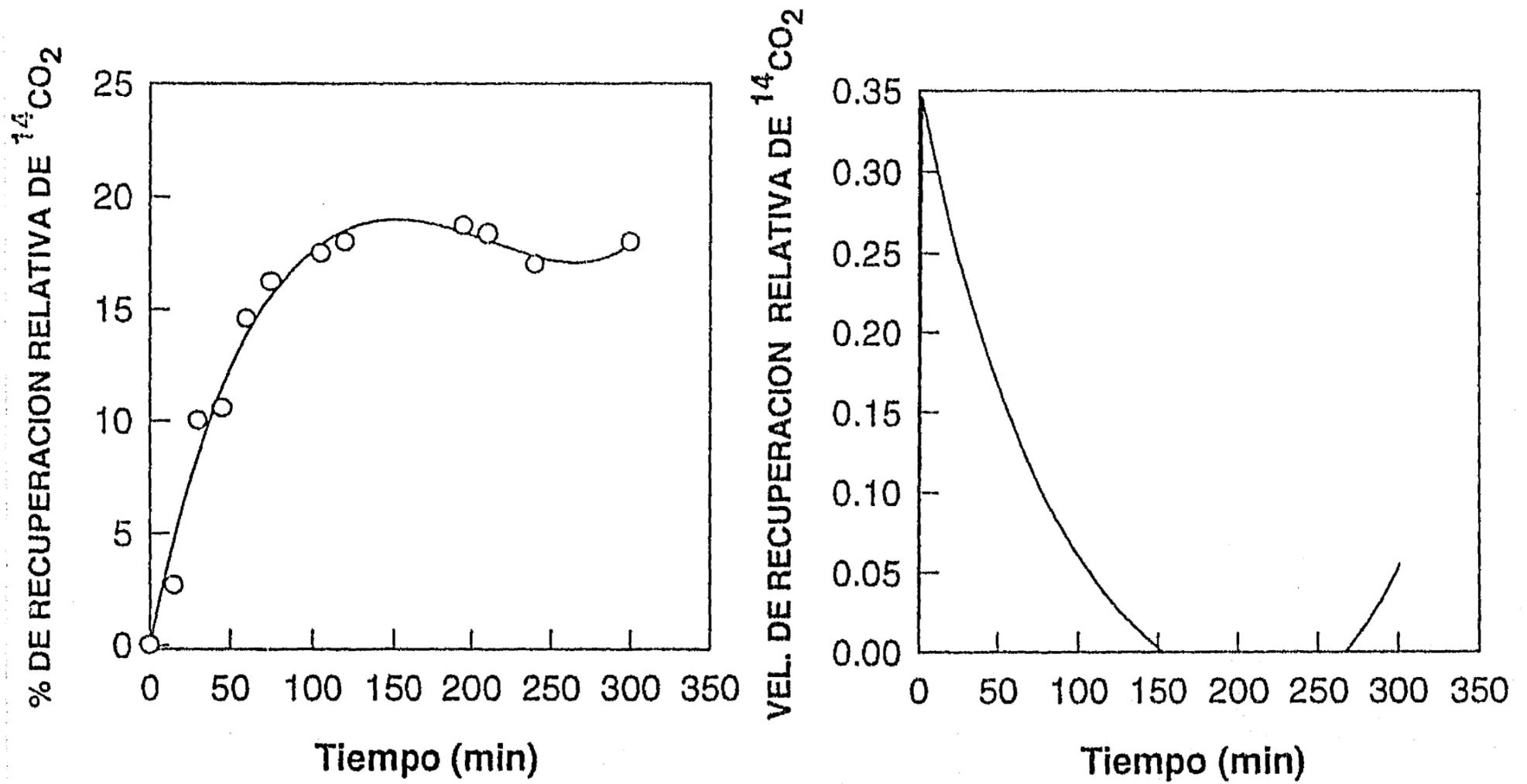


Fig. 7. Gráficas de formación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de (1- ^{14}C)glucosa en diferentes cepas.

VIII. DISCUSION

Uno de los nodos mas importantes involucrados en la distribución de carbono es el nodo PEP-Piruvato, siendo el sistema de la fosfotransferasa el mayor consumidor de PEP y principal productor de piruvato en la célula. Las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) y piruvato cinasa (Pyk) consumen el 16.2% y 14.5% del PEP, respectivamente mientras que sólo el 3.3% del PEP es canalizado hacia la síntesis de compuestos aromáticos (Holms, 1986).

Existen reportes en la literatura que señalan que cepas de *E. coli* carentes de PykA fueron capaces de crecer normalmente en todas las fuentes de carbono probadas, mientras que las mutantes en ambas piruvato cinasas sólo crecieron normalmente en la presencia de fuentes de carbono PTS (Garrido-Pertierra and Cooper, 1977).

Los resultados presentados en el presente trabajo demuestran sin embargo, que bajo las condiciones de crecimiento examinadas en las que se utilizó glucosa como la única fuente de carbono, las mutaciones en uno o ambos genes en cepas con un sistema PT funcional, afectaron las cinéticas de crecimiento. Estos efectos fueron más evidentes en la doble mutante de la enzima piruvato cinasa. El estudio de la triple mutante (*pts-pykA-pykF*) resultó ser de gran importancia para el estudio del papel de las piruvato cinasas, ya que al no contar con los dos aportes principales de piruvato (sistema PT y piruvato cinasas) esta cepa no fue capaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono, no obstante ser cepas Glc^+ . En cambio, las cepas carentes del sistema PT pero con una de las dos piruvato cinasas funcionales fueron capaces de crecer en todas las fuentes de carbono probadas, incluyendo glucosa (Ver más adelante). Es importante señalar que la medición de algunos intermediarios podría aportar datos importantes que ayuden a entender los cambios metabólicos producidos en las mutantes *pyk* y/o *pts*.

Las cinéticas de crecimiento mostraron que la cepa silvestre de *E. coli* requiere de ambas piruvato cinasas para alcanzar las máximas velocidades de crecimiento, por lo que ambas enzimas parecen jugar un papel importante en el metabolismo del carbono.

No obstante las diferencias en las velocidades de crecimiento entre las diferentes mutantes *pyk* y *pts*, todas las cepas alcanzaron una densidad óptica final similar (Fig. 4 y Tabla 2). Una explicación para estos resultados podría ser que el sistema PT y las dos enzimas de piruvato cinasa estén coordinados con el fin de mantener el PEP a niveles bajos ya que el PEP es un intermediario clave en la biosíntesis de piruvato y glucosa 6-P, capaz de regular la actividad de varias de las enzimas del metabolismo del carbono.

Los resultados obtenidos muestran además que existe una correlación entre la cantidad de biomasa formada por las mutantes y la cantidad de glucosa consumida durante el crecimiento (Fig. 5). Así, mientras que las mutantes en una de las dos piruvato cinasas consumieron la glucosa a una velocidad muy semejante a la cepa silvestre, la doble mutante en *pyk* mostró una disminución significativa en la velocidad de consumo de glucosa. Sin embargo, las mutantes *pts* con velocidades específicas de crecimiento menores, consumieron la glucosa a una velocidad 45% menor a la mostrada por la cepa silvestre. Las mutantes en *pts* (en especial la *pts* y la *pts-pykA*) canalizaron la glucosa a biomasa de una forma más eficiente que la cepa silvestre y las otras mutantes analizadas ya que mostraron más de un 30% de incremento en los rendimientos biomasa-sustrato en comparación con los de la cepa silvestre (Tabla 3). Las mutantes en una o ambos genes de piruvato cinasa canalizaron la glucosa a biomasa menos eficientemente que la cepa silvestre.

Por otro lado, los rendimientos CO_2 -sustrato mostraron que las mutantes *pts*, que produjeron el CO_2 a una velocidad menor y produjeron mas moles de CO_2 por mol de glucosa en comparación con la cepa silvestre. El hecho de que las mutantes *pts*, y en especial la *pts* y *pts-pykA* produzcan casi una mol mas de CO_2 por mol de glucosa consumida que la cepa silvestre sugiere una mayor participación de la vía de las pentosas fosfato para la utilización de glucosa ya que esta vía se distingue por la liberación temprana del C-1 de la glucosa como CO_2 (Fig. 10). Estos datos se refuerzan por los resultados obtenidos en los análisis radiorrespirométricos para medir tanto el CO_2 producido por la vía de las pentosas (en el paso de gluconato 6-P a ribulosa 5-P), como el producido en el ciclo de Krebs.

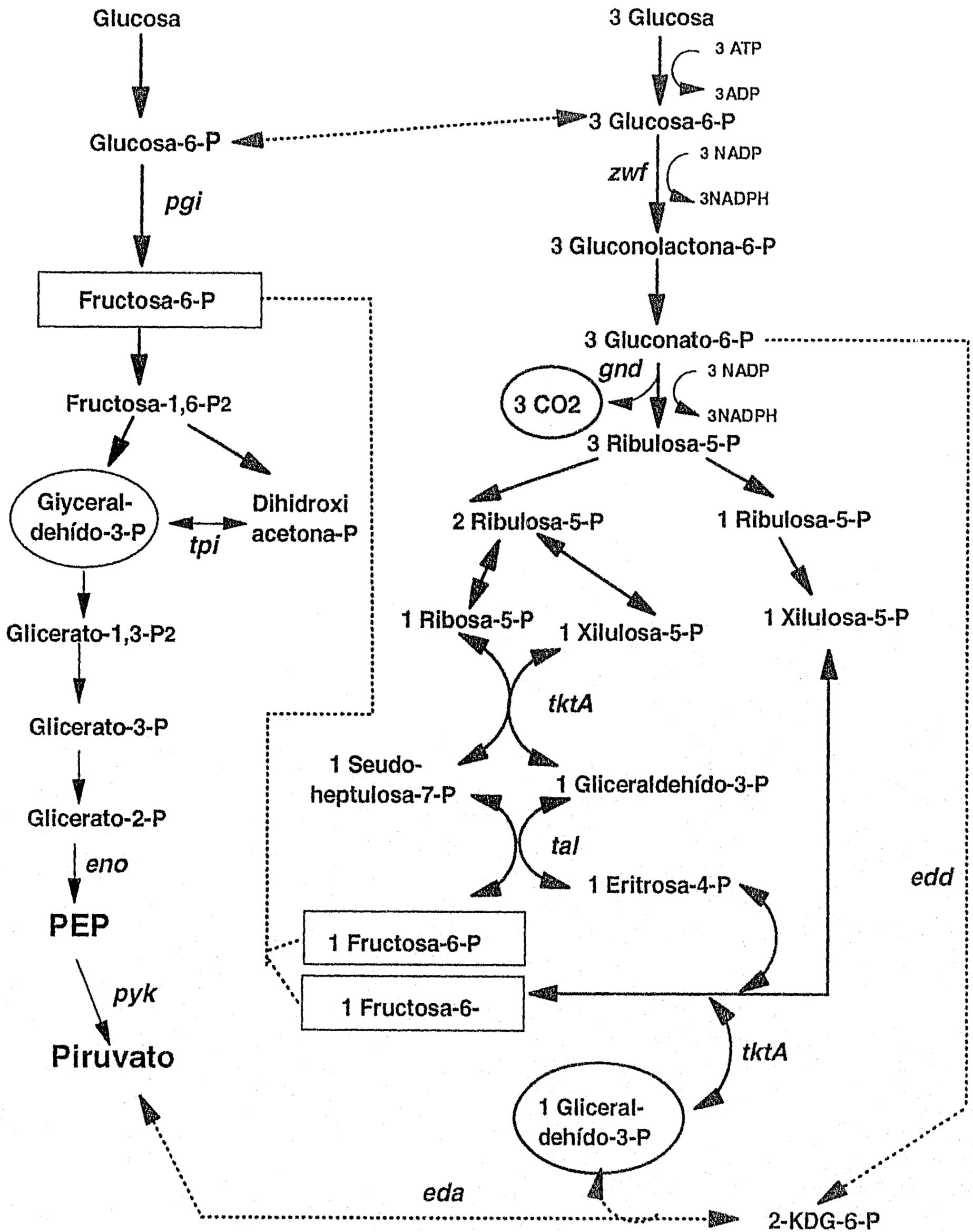


Fig. 10. Interacción de la vía glicolítica con la vía de las pentosas.

Los resultados de recuperación de CO₂ mostraron que la mutante *pykA-pykF* y las mutantes de las *pts*, no producen ¹⁴CO₂ por la vía de los ácidos tricarboxílicos al utilizar glucosa marcada en el carbono 1, y en cambio producen un mayor porcentaje de ¹⁴CO₂ por la vía de pentosas, siendo más evidente el aumento en las mutantes *pts* y *pts pykA*, que son las cepas en donde se produjeron mas moles de CO₂ por mol de glucosa en los datos de las fermentaciones (Tabla 8). La vía de las pentosas fosfato oxida glucosa a CO₂ y gliceraldehido 3-P, el cual a su vez es catabolizado por las enzimas glicolíticas para llegar hasta el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, vía piruvato. En condiciones normales, la vía de las pentosas fosfato de *E. coli* juega un papel menor que el de la vía glicolítica, al proveer NADPH y precursores para la síntesis de nucleótidos y de compuestos aromáticos, consumiendo por ello sólo alrededor del 30% de la glucosa 6-P (Holms, 1986). Sin embargo, existen reportes en donde la vía de las pentosas fosfato es esencial para el crecimiento en glucosa de una mutante en fosfoglucosa isomerasa (*pgi*) debido a que la vía glicolítica queda bloqueada en una etapa inicial (Mascarenhas et al, 1991). En nuestro caso, el hecho de tener mutantes que no utilizan el PEP como sustrato, puede provocar un incremento en los niveles del PEP disponible en la célula. El PEP es un metabolito clave en el metabolismo del carbono, ya que regula la actividad de algunas enzimas glicolíticas como la fosfofructocinasa, la cual cataliza la fosforilación de fructosa 6-P a fructosa-1,6-bifosfato. Esta es una enzima alostérica activada por nucleósidos difosfatos e inhibida por PEP (Bangly *et al.*, 1968). La inhibición de ésta enzima bloquearía la vía glicolítica en una etapa inicial, dando lugar a un incremento en los niveles de glucosa 6-P y gluconato 6-P, los cuales pueden ser catabolizados por la vía de las pentosas o la vía de Entner-Doudoroff (Fraenkel, 1987). Aunque la vía de Entner-Doudoroff sintetiza piruvato como uno de los metabolitos finales, aun no está claro si esta vía pudiera estar siendo utilizada por algunas de las mutantes.

Por otro lado, las mediciones de las actividades enzimáticas de las piruvato cinasas en glucosa como la única fuente de carbono, mostraron que ambas piruvato cinasas son importantes a lo largo de todo el ciclo de vida del organismo (Fig. 6), siendo *PykF* la enzima que contribuye en una mayor proporción (cerca de 15 veces más) a la actividad específica total de piruvato cinasa en comparación con la enzima *PykA* (Tabla 7). Estos resultados coinciden con los presentados por Malcovati *et al* (1973). Por otro lado, se tenía interés en entender si la ausencia

de una de las piruvato cinasas podría ser compensada por la actividad de la piruvato cinasa funcional, proporcionándole cantidades adecuadas de piruvato para mantener velocidades de crecimiento normales; sin embargo, como se observa en la Tabla 7, aun cuando la cepa que lleva la mutación *pykA* mostró un incremento aparente del 20% en la actividad de PykF, este incremento no parece ser suficiente para compensar la ausencia de PykA y alcanzar la misma velocidad de crecimiento que la cepa silvestre. Sin embargo, debido a que el sistema PT puede proveer grandes cantidades de piruvato, las velocidades de crecimiento para los cultivos de las mutantes en una de las dos piruvato cinasas continuaron siendo relativamente altas.

Por otro lado, la delección del sistema PT provocó una disminución del 40% en la actividad específica de PykF en comparación con la actividad obtenida en la cepa silvestre, mientras que la actividad específica de PykA en este mismo fondo genético aumentó aproximadamente en ese mismo porcentaje. No obstante la disminución de la actividad específica de PykF en un fondo genético *pts*, la actividad de esta enzima continuó siendo 8 veces superior a la mostrada por PykA.

La proposición de que la isoenzima PykF pudiera ser el principal proveedor de piruvato en condiciones en donde la glucosa es la única fuente de carbono y el sistema PT no es funcional, coincide con los reportes de la literatura en donde se menciona que la enzima PykF es activada por la fructosa 1,6 bifosfato, un intermediario de la vía glicolítica, mientras que PykA responde a la presencia de AMP y pentosas fosfato (Waywood & Sanwal, 1974). Por otro lado, el hecho de observar una disminución tan significativa en la actividad específica de la isoenzima PykF en las mutantes *pts* podría explicarse con base en los reportes de la literatura que mencionan que la velocidad de síntesis de la proteína piruvato cinasa F es proporcional a μ^2 (Pedersen *et al.*, 1978; Smith & Neidhart, 1983), ya que en estas mutantes la velocidad de crecimiento disminuyó de forma importante en comparación con la velocidad de crecimiento obtenida en la cepa silvestre.

Es importante notar que cuando se utiliza ribosa o xilosa como las únicas fuentes de carbono, las mutantes en una de las dos piruvato cinasas son capaces de crecer en estas fuentes de carbono (Tabla. 6). Sin embargo, la mutante en ambas piruvato cinasas no es capaz de crecer en ninguna

de las dos pentosas, pero sí en gluconato, ya que éste puede ser catabolizado por la vía de Entner-Doudoroff para formar el piruvato que se requiere para crecer (Fig. 11). Por tanto, la doble mutante *pykA-pykF* no puede crecer en pentosas debido a la incapacidad de producir piruvato, ya que son fuentes de carbono no-PTS. En las mutantes sencillas, en cambio, las cepas pueden crecer en piruvato debido a que la piruvato cinasa funcional sintetiza piruvato a partir de PEP. La triple mutante (*pts-pykA-pykF*), sin embargo, tuvo un crecimiento más pobre en gluconato que la doble mutante (*pykA-pykF*) y no fue capaz de crecer en glucosa aun después de 96 hrs de incubación, a diferencia de las mutantes *pts-pykA* o *pts-pykF* que llegaron a formar colonias grandes en todas las fuentes de carbono, incluyendo gluconato y pentosas. Estos datos refuerzan la hipótesis de que ambas piruvato cinasas son importantes en el metabolismo del carbono y que la presencia de por lo menos una de ellas permite la formación de piruvato y con ello el crecimiento de las cepas aun en fuentes de carbono no-PTS (Tabla 6). Es importante señalar que en las mutantes en piruvato cinasa aisladas de otros organismos como *Brevibacterium flavum* y *Corinebacterium glutamicum* éstas no fueron capaces de crecer ni en ribosa ni en gluconato como únicas fuentes de carbono a menos que se adicione piruvato al medio de cultivo. Esto sugiere que en estas bacterias la única enzima de la piruvato cinasa es esencial para su crecimiento en estas dos fuentes de carbono, y que la vía de Enter-Doudoroff no parece operar en forma significativa (Mori & Shio, 1987; Gubler *et al.*, 1994).

Debido a que el piruvato es un intermediario clave en el metabolismo celular, es importante que la bacteria pueda contar con varias vías alternativas para su síntesis. Estos mecanismos podrían estar siendo regulados diferencialmente con el objeto de responder adecuadamente a los cambios medioambientales. Sin embargo, en fondos genéticos en donde una o más de estas vías alternativas han sido modificadas o no existen, la célula podría modificar aquellas con las que cuenta para tener mas oportunidades de sobrevivencia.

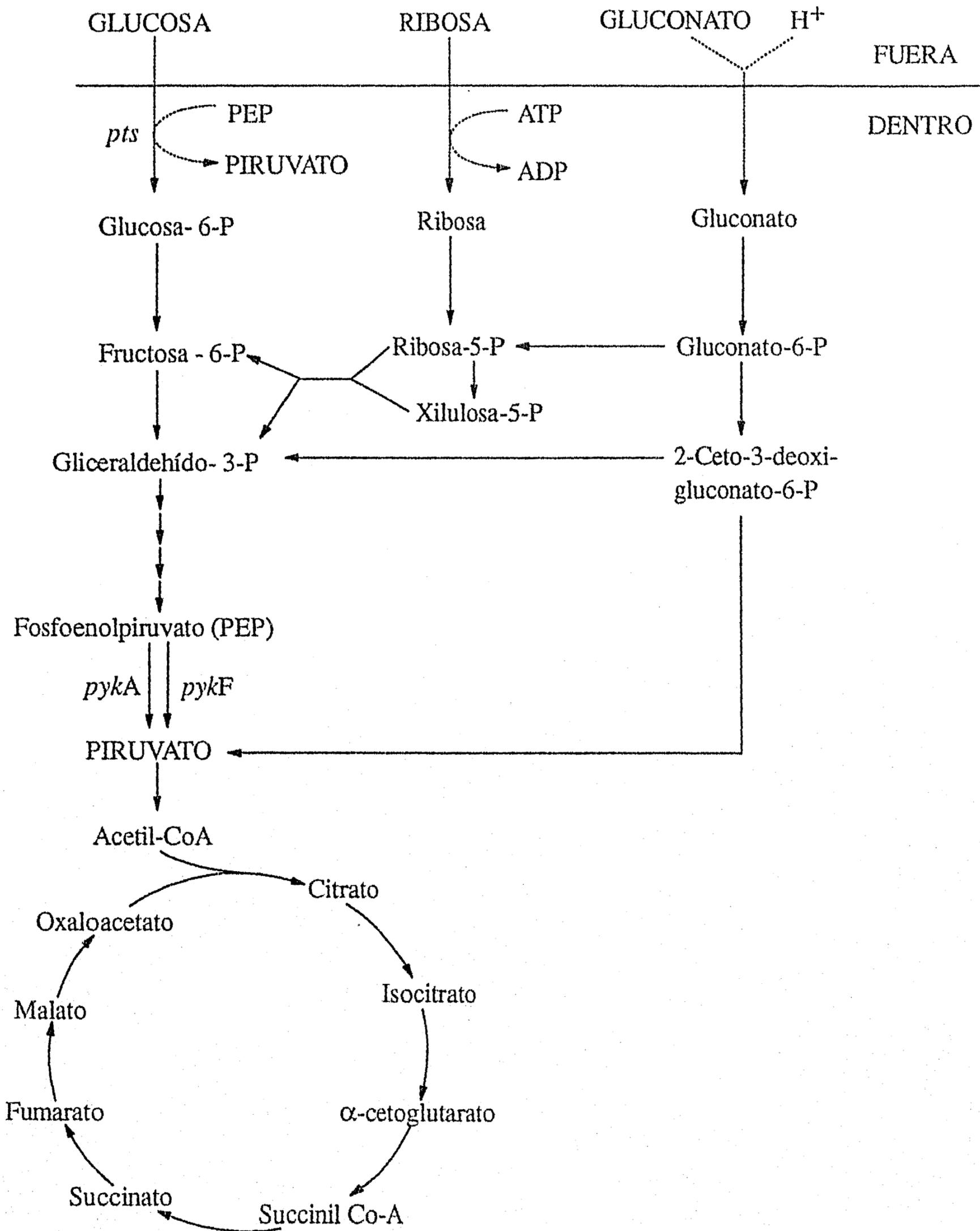


Fig. 11. Rutas metabólicas que permiten la síntesis del piruvato a partir de diferentes fuentes de carbono. CoA, coenzima A; glucosa-6-P, glucosa 6-fosfato.

Además de los resultados anteriores se pudo observar también que mientras que en las mutantes en una de las dos *pyk* se produjo incluso un poco más de acetato y a una velocidad ligeramente mayor a la de la cepa silvestre, en la doble mutante en piruvato cinasa, donde el aporte de piruvato depende exclusivamente del PTS, se observó una disminución importante tanto en el rendimiento de acetato a partir de glucosa, como en la velocidad de producción de éste. En el caso de las mutantes en *pts*, en cambio, no se detectó la formación de acetato, ni de ningún producto de fermentación ácido-mixta en ninguna de las fases de la fermentación (Tabla 3). Los datos obtenidos sugieren entonces que en las mutantes *pts*, en donde la glucosa entra por el poro de permeasa de galactosa (Gal P) (Flores *et al.*, 1996) sin formación de piruvato como por el sistema PT, la glucosa es catabolizada más eficientemente que en la cepa silvestre. Estos datos coinciden con el aumento obtenido en los rendimientos biomasa-sustrato en las mutantes *pts*, así como con la disminución observada en los valores del Q_s y del Q_{CO_2} en comparación con la cepa silvestre. Esto sugiere que el poco piruvato que está siendo sintetizado en estas cepas es canalizado hacia la formación de aminoácidos, intermediarios y energía y no hacia la formación de productos de fermentación ácido mixta como ocurre en las cepas con el sistema PT funcional. Así es posible que para el caso de las mutantes *pts* y *pts-pykA* todo el carbono adicionado como glucosa fuera recuperado en biomasa y CO_2 , a diferencia de la cepa silvestre en la que parte del carbono se canalizó hacia la síntesis de acetato. El hecho de que en las mutantes sencillas y mas evidentemente en la doble mutante de la piruvato cinasa se hayan obtenido porcentajes de recuperación de carbono hasta en un 17% menores a los mostrados por la cepa silvestre sugieren que en estas cepas al igual que en la mutante *pts-pykF*, parte del carbono está siendo dirigido hacia la formación de otro producto diferente de las proteínas, CO_2 o acetato. Se ha reportado que cuando las células crecen en condiciones en donde el catabolismo del carbono excede la capacidad de las vías metabólicas centrales, éste puede ser compensado disipando el exceso de carbono hacia la producción de CO_2 y calor, o también hacia la excreción de productos de bajo peso molecular al medio. Sin embargo, también existe la posibilidad de que los intermediarios metabólicos en exceso sean canalizados hacia la formación de polímeros de almacenamiento (El-Mansi & Holms, 1989). Esta última posibilidad podría ser factible para el caso de las mutantes presentadas en este trabajo, ya que los polímeros pueden ser acumulados en altas concentraciones sin tener efectos negativos en la viabilidad de las células (Dedhia *et al.*, 1994).

La glucosa 6-P así como otras hexosas fosfato que pudieran estar en cantidades mayores a las normales como resultado de la inhibición de la fosfofructocinasa por el PEP, podrían estar siendo convertidas en glucosa-1-fosfato y en glucógeno, un polímero no tóxico y osmóticamente inactivo.

Debido a que se sabe que los cultivos de *Escherichia coli* pueden ser mejorados en forma significativa por la reducción de la acumulación de acetato, ya que este es un potente inhibidor del crecimiento celular de *E.coli*, es que se han realizado diversos esfuerzos encaminados a disminuir la producción de este compuesto en estas cepas. Entre estos esfuerzos destacan:

- a) la manipulación genética para sobreproducir glucógeno en lugar de acetato (Dedhia *et al.*, 1994),
- b) la clonación de genes heterólogos que catalicen la conversión del piruvato hacia formas no ácidas y compuestos menos tóxicos (Aristidou *et al.*, 1994),
- c) el empleo de estrategias complicadas de control para evitar tener glucosa en exceso o impedir que el cultivo entre en la fase de anaerobiosis (Konstantinov *et al.*, 1990).

El hecho de que las mutantes *pts* no produzcan acetato ni ningún otro compuesto de fermentación ácido mixta como resultado de la delección de algunos de los genes del sistema PT (*ptsH-I-cir*) las hace ser cepas interesantes desde el punto de vista de la producción, ya que además estas cepas (y en especial la *pts* y la *pts-pykA*) canalizan la glucosa a biomasa de una forma más eficiente que la propia cepa silvestre y las mutantes de la piruvato cinasa. En estas mutantes además existe una mayor disponibilidad de PEP, ya que éste no está siendo utilizado para la fosforilación de la glucosa o para la formación de piruvato por la acción de las piruvato cinasas. Este PEP por tanto podría ser canalizado hacia la formación de compuestos de interés, como los compuestos aromáticos que utilizan PEP y eritrosa 4-P como sustrato.

IX. CONCLUSIONES GENERALES

- *Escherichia coli* requiere de ambas piruvato cinasas para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento.
- Las mutantes *pts* (en especial las cepas *pts* y la *pts-pykA*) canalizan la glucosa hacia las proteínas más eficientemente que las mutantes de la piruvato cinasa y que la cepa silvestre, además de consumir la glucosa y producir CO₂ a una menor velocidad.
- La doble mutante de la piruvato cinasa redujo la velocidad de formación de ácido acético en un 45% en comparación a la cepa silvestre, mientras que en las mutantes *pts* no se detectó la presencia de este compuesto ni de ningún otro producto de la fermentación ácido-mixta.
- El balance de carbono realizado con base en la biomasa, CO₂ y acetato para las mutantes *pykA*, *pykF*, *pykA-pykF* y *pts-pykF* sugiere que parte del carbono está siendo canalizado hacia la formación de polímeros de almacenamiento o algún otro producto aun no determinado.
- Ambas piruvato cinasas de *E. coli* (*PykA* y *PykF*) juegan un papel activo en la biosíntesis de piruvato a lo largo de todo el ciclo de vida de la bacteria. Sin embargo, la isoenzima *PykF* contribuye en mayor proporción a la formación de piruvato que *PykA*, al menos cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono.
- La ausencia de una de las dos piruvato cinasas en un fondo silvestre, no puede ser compensada por la actividad de la otra piruvato cinasa que permanece funcional.
- La fuerte disminución de la actividad enzimática de *PykF* en las mutantes *pts*, en comparación con las obtenidas por la cepa silvestre, podría deberse a la baja velocidad de crecimiento mostrada por estas mutantes, ya que se ha reportado que la velocidad absoluta de síntesis de *PykF* es proporcional a μ^2 .

- El hecho de que las mutantes *pykA-pykF* y *pts-pykA-pykF* sean capaces crecer en fuentes de carbono como el gluconato pero no en ribosa o xilosa sugiere la participación de vías alternativas de utilización carbono como la vía de Entner-Doudoroff, lo cual difiere de mutantes en piruvato cinasa de organismos como *Brevibacterium flavum* y *Corynebacterium glutamicum*, en donde la vía de Entner-Doudoroff no parece operar en forma significativa.

- Los datos de rendimientos CO₂-sustrato, así como los datos de los análisis radiorrespirométricos sugieren una mayor participación de la vía de pentosas en cepas como la *pts* y la *pts-pykA*. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de la participación de la vía de Entner-Doudoroff en algunas de las mutantes analizadas.

X. PERSPECTIVAS

Debido al papel central que tienen las isoenzimas de piruvato cinasa en la vía glicolítica y por tanto en el metabolismo del carbono, resulta ser de gran interés para nuestro grupo el continuar el estudio de estas enzimas así como de los genes que las codifican ya que todavía son muchas las preguntas que continúan por ser resueltas tanto con respecto a su papel fisiológico como a sus mecanismo de regulación.

El hecho de que existan dos isoenzimas de piruvato cinasa en *E. coli* reguladas de forma diferente, hace interesante el realizar otra serie de fermentaciones en donde se utilicen condiciones medioambientales diferentes. Entre las condiciones a probar podrían estar la utilización de otras fuentes de carbono tanto glicolíticas como gluconeogénicas, el uso de diferentes condiciones de aereación etc.

Otro de los aspectos que requiere ser dilucidado es la posible participación de la vía de Enter-Doudoroff para el catabolismo de la glucosa en mutantes como la *pts-pykF*. Aunque ésta es una vía inducible por gluconato, el hecho de que esta mutante no cuente con las dos vías principales de aporte de piruvato (sistema PT y *pyk*) podría ser una presión lo suficientemente fuerte como para inducir la y proporcionarle el piruvato que requiere para crecer.

La medición de los niveles de algunos intermediarios como los fosfatos de hexosa, el ATP, ADP, AMP, PEP y piruvato así como la medición del transporte de la glucosa podría contribuir al mejor entendimiento de los cambios metabólicos producidos por la introducción de las mutaciones en los genes de piruvato cinasa así como en el sistema PT.

Existe asimismo muy poca información en la literatura con respecto al estudio de las regiones de control de genes de piruvato cinasa así como sobre como están regulados estos genes. En este sentido, contamos ya en el laboratorio con el gene de *pykA* clonado junto con sus regiones de regulación tanto hacia el extremo 5' como 3', así como con varios plásmidos recombinantes que contienen hasta 1700 pb de la región de control del gene *pykF*, que se obtuvieron utilizando una metodología reportada por el grupo de Sakar *et al.* (1993), que permite clonar regiones de DNA no conocidas continuas a una región de secuencia conocida. Ambas clonas nos van a servir para delimitar las regiones de control de estos genes así como estudiar su regulación. La construcción de fusiones transcripcionales podría ser una herramienta importante para medir la expresión de

los genes de piruvato cinasa en diferentes condiciones (diferentes fuentes de carbono, baja concentración de oxígeno, diferentes fases de crecimiento, etc.).

El hecho de contar con los genes de las piruvato cinasas clonados con sus regiones reguladoras y con las mutantes en uno o ambos genes abre la posibilidad de resolver preguntas que aun no han sido resueltas tales como: ¿qué reguladores globales afectan la expresión de los genes de la piruvato cinasa? ¿cómo afectan los cambios medioambientales su expresión?, ¿cómo afectan estas mutaciones los patrones globales de expresión genética? etc.

XI. BIBLIOGRAFIA

-Andersen, K. B., and K. Meyerburg (1980). Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? J. Bacteriol. 144(1):114-123.

-Aristidou, A. A., K. San, and G. N. Bennett. 1994. Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. Biotech. Bioeng. 44:944-951.

-Baroncini, L. and E. Beutler. 1993. Analysis of pyruvate kinase-deficiency mutations that produce nonsperocitic hemolytic anemia. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 4324-4327.

-Blangy, D., H. Buc, and J. Monod. 1968. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 31:13-35.

-Cooper, R. A. and A. Anderson. 1970. The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 11(4):273-276.

-Creighton, D. J. and I. A. Rose. 1976. Oxalacetate decarboxylase activity in muscle is due to pyruvate kinase. J. Biol. Chem. 251(1):69-72.

-Dedhia, N. N., T. Hottiger, and J. E. Baley. 1994. Overproduction of glycogen in *Escherichia coli* blocked in the acetate pathway improves cell growth. Biotechnol. Bioeng. 44:132-139.

-El-Mansi, E. M. and W. H. Holms. 1989. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. J. Gen. Microbiol. 135:2875-2883.

-Flores, N., A. Berry, F. Bolívar and F. Valle. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. Nature Biotechnology. In press.

- Fraenkel, D. G. 1987. Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Doudoroff pathway. p. 142-149. *In* F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, B. Magasanik et al. (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C. USA.
- Fraenkel, D.G. 1992. Genetics and intermediary metabolism. *Annu. Rev. Genet.* 26: 159-177.
- Garrido-Pertierra, A., and R. A. Cooper. 1977. Pyruvate formation during the catabolism of simple hexose sugars by *Escherichia coli*: studies with pyruvate kinase-negative mutants. *J. Bacteriol.* 129:1208-1214.
- Garrido-Pertierra, A. and R. A. Cooper. 1983. Evidence for two distinct pyruvate kinase genes in *Escherichia coli* K-12. *FEBS LETT.* 162(2):420-422.
- Gubler, M., M. Jetten, S.H. Lee and A. Sinskey. 1994. Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium lactofermentum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. and Environ. Microbiol.* 60(7):2494-2500.
- Holms, W. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationships between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate., p. 69-105. *In*: Current Topics in Cellular Regulation. Horecker, B.L. and Stadtman, E.R. (eds.). Academic Press, N.Y. USA.
- Jetten, M. S. M., M. E. Gumbler, S. H. Lee, and A. J. Sinskey. 1994. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2501-2507.
- Kayne, F. 1973. Pyruvate kinase. *In*: The Enzymes. (Boyer, P.D., ed), pp. 353-382. 3rd. Ed. Academic Press Inc. New York. USA.

-Konstantinov, K., M. Kishimoto, T. Seki, and T. Yoshida. 1990. A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* 36:750-758.

-Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

-Malcovati, M., G. Valentini, and H. L. Kornberg. 1973. Two forms of pyruvate kinase in *Escherichia coli*: their properties and regulation. *Acta Vitamin. Enzymol.* 27:96-111.

-Malcovati, M., and G. Valentini. 1982. AMP - and fructose 1,6-bisphosphate - activate pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 90:170-179.

-Mascarenhas, D., D. J. Ashworth, and C. S. Chen. 1991. Deletion of *pgi* alters tryptophan biosynthesis in a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(10):2995-2999.

-Mattevi, A., G. Valentini, M. Rizzi, M. L. Speranza, M. Bolognesi, and A. Coda. 1995. Crystal structure of pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Structure.* 3(7):729-741.

-Mori, M. and I. Shio. 1987. Pyruvate formation and sugar metabolism in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 51(1):129-138.

-Muirhead, H., D. A. Clayden, D. Barford, C. G. Lorimer, L.A. Fothergill-Gilmore, E. Schiltz and W. Schmitt. 1986. The structure of cat muscle pyruvate kinase. *EMBO J.* 5(3):475-481

- Neidhardt, F. C, J. L. Ingraham, M. Schaechter. 1990. *Physiology of the bacterial cell. A molecular approach.* pp. 133-136. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. U. S. A.

- Oden, K. L., L. C. DeVeaux, C. R. T. Vibat, J. E. Cronan Jr., and R. B. Gennis. 1990. Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid DNA. *Gene*. 96:29-36.
- Ohara, O., R. L. Dorit and W. Gilbert. 1989. Direct genomic sequencing of bacterial DNA: the pyruvate kinase I gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6883-6887.
- Pedersen, S., P. L. Bloch, S. Reeh, and F. C. Neidhardt. 1978. Patterns of protein synthesis in *Escherichia coli*: a catalog of the amount of 140 individual proteins at different growth rates. *Cell*. 14:179-190.
- Ponce, E. 1994. Papel de los genes de piruvato cinasa y sus productos en la formación de piruvato en *Escherichia coli*. Tesis Maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Mor. México.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:543-594.
- Reeves, R. E. 1968. A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase. *J. Biol. chem.* 243:3202-3204.
- Saeki, T., M. Hori, and H. Umezawa. 1974. Pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Its role in supplying nucleoside triphosphates in cells under anaerobic conditions. *J. Biochem.* 76(3):631-637.
- Saier, M. H., Jr., and A. M. Chin. 1990. Energetics of bacterial phosphotransferase system in sugar transport and the regulation of carbon metabolism. *In: The bacteria*. Vol. XII. Academic Press, Inc. N.Y. USA.

- Sakar, G., R. T. Turner, and M. E. Bolander. 1993. Restriction-site PCR: a direct method of unknown sequence retrieval adjacent to known locus by using universal primers. *PCR Methods. Applic.* 2:318-322.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. USA.

- Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist. 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor, N. Y. USA.

- Smith, M. W., and F. C. Neidhardt. 1983. Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 154:336-343.

- Wang, C. H., I. Stern, C. M. Gilmour, S. Klungsoyr, D. J. Reed, J.J. Bialy, B. E. Christensen, and V. H. Cheldelin. 1958. Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method. *J. Bacteriol.* 76:207-216.

- Waywood, E. B., and B. D. Sanwal. 1974. The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. I. Physicochemical and regulatory properties of the enzyme activated by fructose 1,6-diphosphate. *J. Biol. Chem.* 249:265-274.

- Waywood, E. B., M. K. Raymon, and B. D. Sanwal. 1975. The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli* II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate. *Can. J. Chem.* 53:444-454.

- Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. *In*: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman and K. Struhl (eds.), *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, U.S.A.

XII. ANEXO

ARTICULO PUBLICADO

Cloning of the Two Pyruvate Kinase Isoenzyme Structural Genes from *Escherichia coli*: the Relative Roles of These Enzymes in Pyruvate Biosynthesis

ELIZABETH PONCE, NOEMÍ FLORES, ALFREDO MARTINEZ, FERNANDO VALLE,
AND FRANCISCO BOLÍVAR*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

Received 12 May 1995 Accepted 20 July 1995

We report the cloning of the *pykA* and *pykF* genes from *Escherichia coli*, which code for the two pyruvate kinase isoenzymes (ATP:pyruvate 2-O-phosphotransferases; EC 2.7.1.40) in this microorganism. These genes were insertionally inactivated with antibiotic resistance markers and utilized to interrupt one or both *pyk* genes in the *E. coli* chromosome. With these constructions, we were able to study the role of these isoenzymes in pyruvate biosynthesis.

Pyruvate is a key intermediate in catabolic and biosynthetic reactions, and this is the reason why there are several metabolic routes that can deliver this compound (Fig. 1). *Escherichia coli*, when growing on glucose as the only carbon source, synthesizes most of its pyruvate through the coupled mechanism of glucose transport by the phosphotransferase transport system (PTS or PT system) (5). During this process, the phosphate group from phosphoenolpyruvate (PEP) is transferred to glucose, generating pyruvate and glucose-6-phosphate (9, 10). Pyruvate can also be synthesized from gluconate through the Entner-Doudoroff pathway (3). Another mechanism to synthesize pyruvate is through the action of pyruvate kinase (ATP:pyruvate 2-O-phosphotransferase; EC 2.7.1.40), which catalyzes the conversion of PEP and ADP into pyruvate and ATP, at the final stage of the glycolytic pathway. In *E. coli*, there are two pyruvate kinase isoenzymes, PykF and PykA, encoded by the *pykF* and *pykA* genes, respectively.

Garrido-Pertierra and Cooper have reported that in *E. coli*, under aerobic conditions and in the absence of pyruvate kinase activities, a functioning PT system can provide enough pyruvate to sustain wild-type normal growth rates. In the same report, it was mentioned that the absence of PykA did not seem to affect growth on any of many carbon sources; therefore, in that study, the role of PykA was not clearly defined (4).

We report here the cloning of both *pykA* and *pykF* structural genes from *E. coli* and the construction and analysis of strain derivatives in which the chromosomal copy of one or both genes was interrupted by antibiotic resistance markers. We present data on cell growth effects of these mutations, in the wild-type background and in strains that lack the PT system but are capable of glucose transport by using the galactose permease (GalP) (2). Results obtained strongly suggest that, at least under conditions where glucose is the only carbon source, both pyruvate kinase isoenzymes have an active role in pyruvate biosynthesis, but it appears that the PykF isoenzyme contributes to a greater extent. As expected, a double *pykA pykF* mutant is capable of growing on glucose and on gluconate but

incapable of growing on ribose as the only carbon source, and the triple *pts pykA pykF* mutant is capable of growing on gluconate but incapable of growing on glucose or ribose.

Cloning and sequencing of the *E. coli pykA* and *pykF* structural genes. Using PCR standard techniques and primers specific for both of the two pyruvate kinase genes, we cloned these two structural genes into plasmids. The nucleotide sequences of both genes were obtained and were found to be almost identical to the deposited sequences (GenBank release 86.0) (data not shown).

Generation of *pykA* and *pykF* insertional inactivation mutants. *E. coli* mutants altered in one or both *pyk* genes were isolated after insertional mutagenesis of the *pykA* or *pykF* gene. This was performed by using antibiotic resistance cassettes (Table 1). These insertional mutations were separately integrated into the chromosome of *E. coli* ATCC 47002 (F^- *recB21 recC22 sbc-15 leu-6 ara-14 his-4 λ^-*) (S) and subsequently transduced into strain JM101 [*supE thi Δ (lac-proAB)* (F' *naD36 proAB lacI^qZ Δ M15*)] or PB12 [same as JM101 but Δ (*ptsH-1-crr*):*kan*; Glc⁻]. Chromosomal gene interruptions were confirmed, in all cases, by Southern hybridization (data not shown).

Effect of *pyk* and *pts* mutations on cell growth on glucose as the only carbon source. To study the relative roles of the two *pyk* genes and their products in cell metabolism, one or both genes were interrupted in the bacterial chromosome. Also, because the PT system is the major source of pyruvate in *E. coli* (5), we isolated a mutant capable of glucose transportation through the GalP permease (2), in a background strain that carries a deletion of the PT system (a deletion mutant lacking *ptsH*, *ptsI*, and *crr* genes) (6). Using this *pts* Glc⁻ mutant PB12, we separately incorporated each or both of the *pyk* mutations in this background. When these strains were grown in a 6-liter fermentor with M9 medium supplemented with glucose and Casamino Acids (11), no differences in growth patterns were observed for any of them: all grew as well as the parental strain JM101 (data not shown). However, if the M9 medium used did not contain Casamino Acids, interesting differences were observed. In this type of medium, all cultures of mutants and parental strains reached the same final optical density (data not shown). However, strains carrying *pyk* or *pts* mutations presented different growth rates, reported here as the generation time (t_D) obtained during the exponential growth phase

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México. Phone and fax: (52) (75) 17-23-99. Electronic mail address: valle@pbr522.ceingebi.unam.mx.

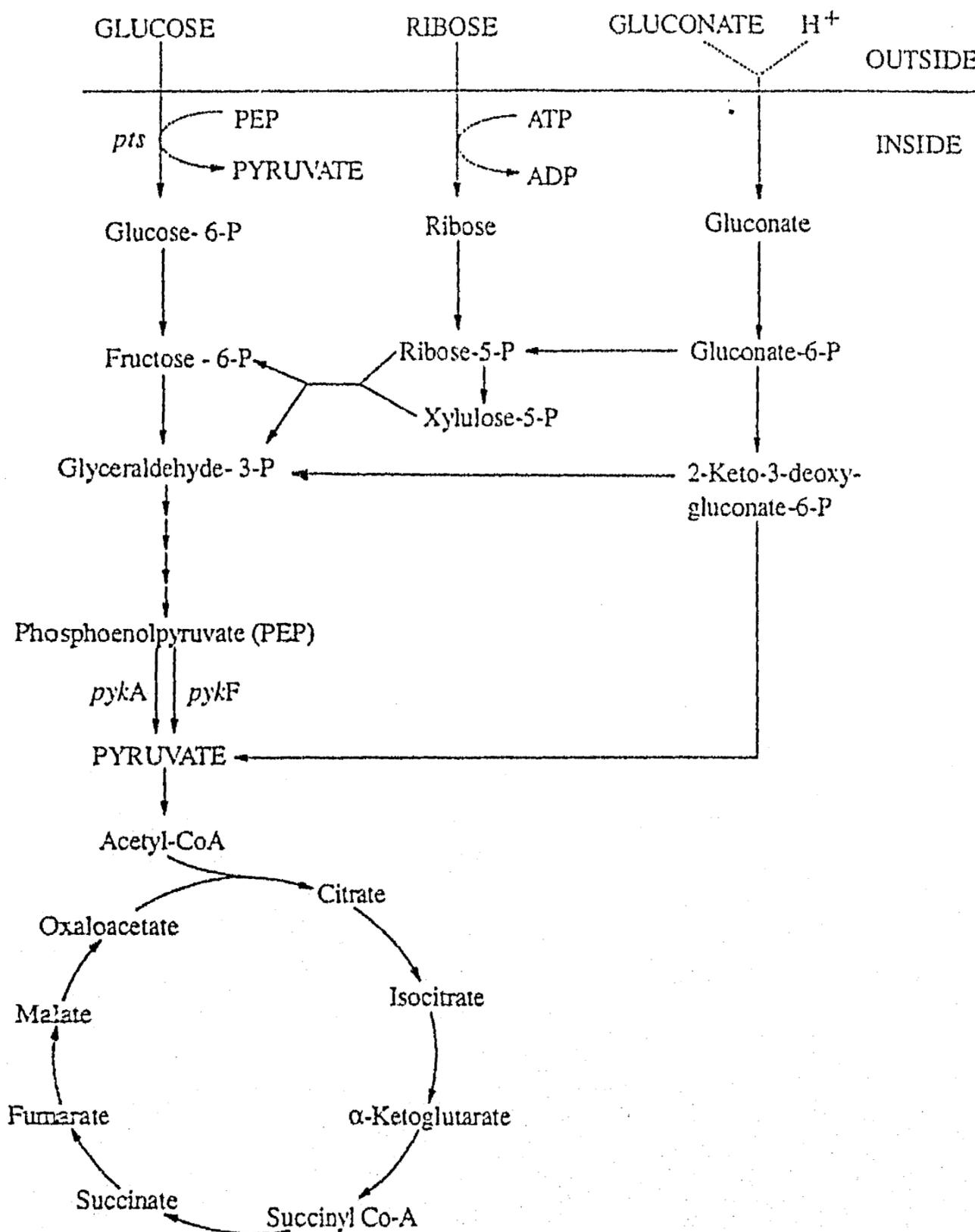


FIG. 1. Metabolic routes in *E. coli* that allow the synthesis of pyruvate from different carbon sources. CoA, coenzyme A; Glucose-6-P, glucose 6-phosphate.

(Table 1). Strains carrying the single *pykA* or *pykF* mutations, in a wild-type (*Pts*⁻) background, showed a slight increase in their t_D in comparison with the parental strain. The strain carrying the double *pykA pykF* mutation showed a t_D 40% higher than that observed for JM101 (Table 1). The wild-type strain and the single *pyk* mutants needed 7 and 8 h, respectively, to reach maximum cell density (data not shown). PB12 (*pts Glc*⁻) showed a t_D of 106.4 min (80% higher than the t_D obtained for the wild-type strain and 40% higher than that for the strain carrying the *pykA pykF* double mutation). The t_D obtained for the *pts pykA* mutant (98.5 min) was similar to the t_D of the strain carrying only the *pts* deletion, and this double mutant also took the same time to reach stationary phase. However, the introduction of the *pykF* mutation into the *pts*

(*Glc*⁻) background had the strongest effect in slowing cell growth. This strain showed a t_D of 141 min (an increase of almost 140% over the t_D shown by the wild-type strain). Finally, as expected, the triple *pts pykA pykF* mutant was incapable of growing on glucose as the only carbon source (Table 1).

Measurements of the two pyruvate kinase specific activities in the *pyk* and *pts* mutants on glucose as the only carbon source. The specific activities of both pyruvate isoenzymes were measured for the wild type and the *pyk* and *pts* mutants in the same set of experiments as those described above, by the method reported by Malcovati and Valentini (7). The results presented in Table 1 show that under these conditions, in the wild-type strain the specific activity of the PykF enzyme was

TABLE 1. t_D s, pyruvate kinase specific activities, and comparative growth on different carbon sources for the wild type and strains carrying the *pyk* and *pts* mutations

Strain (description)	t_D (min) ^a	Sp act (IU/mg of protein) ^a		Comparative growth on carbon source ^b :		
		PykF	PykA	Glucose	Ribose	Gluconate
JM101 (wild type)	58.8 ± 2.10	0.42 ± 0.03	0.026 ± 0.002	+++++	+++++	+++++
PB22 (same as JM101 but <i>pykA::cat</i> ^c)	69.3 ± 3.95	0.50 ± 0.04	ND	---++	+++++	+++++
PB24 (same as JM101 but <i>pykF::cat</i>)	69.4 ± 1.72	ND	0.029 ± 0.003	---++	+++	+++
PB25 (same as JM101 but <i>pykA::kan</i> ^d <i>pykF::cat</i>)	82.2 ± 0.60	ND	ND	---	-	++
PB12 ^e [same as JM101 but Δ (<i>ptsH-I-crr</i>):: <i>kan</i> : Glc ⁻]	106.4 ± 2.79	0.25 ± 0.02	0.037 ± 0.003	---+	++	+++++
PB26 (same as PB12 but <i>pykA::cat</i>)	98.5 ± 1.62	0.25 ± 0.03	ND	---+	++	+++
PB27 (same as PB12 but <i>pykF::cat</i>)	141.0 ± 0.06	ND	0.042 ± 0.004	--	+	++
PB28 (same as PB12 but <i>pykA::cat pykF::gen</i> ^f)		ND	ND	-	-	+

^a Data are presented as the average of two to four independent measurements. Cultures were grown aerobically in a 6-liter fermentor in M9 medium supplemented with glucose as the only carbon source. ND, not detected.

^b The growth response was observed after 48 h of cultivation at 37°C on minimal medium plates supplemented with either glucose (10 mM), ribose (15 mM), or gluconate (10 mM) as the only carbon source.

^c The chloramphenicol resistance gene was obtained, as a *Sma*I fragment, from plasmid PCAT19 (1).

^d The kanamycin resistance gene was obtained, as a *Bam*HI fragment, from plasmid pNKS62 (13).

^e An article giving a description and analysis of this strain is in preparation (2).

^f The gentamycin resistance gene was obtained, as a *Sma*I fragment, from plasmid pGM01 (12).

more than 15 times higher than that of the PykA isoenzyme. When one of the two *pyk* genes was interrupted, the enzymatic level of the remaining pyruvate kinase was slightly increased. Interestingly, strains with the *pts* background showed differences in both pyruvate kinase specific activities in comparison with those in the parental and single *pyk* backgrounds. In the *pts* background, the PykF specific activity decreased from 0.42 IU/mg of protein (in the parental strain) to 0.25 IU/mg of protein. On the other hand, the PykA specific activity in the *pts* background increased slightly over the level in the wild-type strain (Table 1).

The results presented thus far demonstrate that under the growth conditions tested, with glucose as the only carbon source, mutations in one or both *pyk* genes did affect cell growth kinetics in strains with a functional PT system. These effects were most obvious in the *pykF pykA* double mutant.

These results are in agreement with the proposition that *E. coli* in fact needs both pyruvate kinases to reach maximal growth rates (Table 1). However, cultures of the *pyk* mutants finally reached the same final optical density as did those of the parental strain JM101 (data not shown). One explanation for these results could be that the PT system and the two pyruvate kinase enzymes are coordinated in order to maintain a very low level of PEP, an allosteric regulator of several glycolytic enzymes and therefore a key intermediate in the biosynthesis of pyruvate and glucose 6-phosphate.

A deletion of the PT system, on the other hand, caused a strong increase in the generation time in comparison with that of the parental strain. Interestingly, the PykF specific activity decreased 40% in the *pts* background compared with the activity in the wild-type strain, while in the same background the PykA specific activity increased approximately by the same percentage. Nevertheless, in the *pts* mutant, under these conditions, the PykA specific activity was still eight times superior to that of PykA.

In addition, it was observed that both pyruvate kinase isoenzymes maintained the same specific activities throughout the exponential and stationary phases in each particular strain (data not shown). These results suggest that both Pyk enzymes are important throughout the life cycle of the organism and not only in a particular phase.

Effects of *pyk* and *pts* mutations on cell growth on other carbon sources. When ribose, a non-PT system sugar, was used

as the only carbon source (Table 1), single *pykA* or *pykF* mutants were capable of growing on this sugar. However, the strain carrying the double *pykA pykF* mutation was unable to grow on ribose but capable of growing on gluconate, which is catabolized through the Entner-Doudoroff pathway to yield pyruvate (3). The double *pykA pykF* mutant did not grow on ribose because it lacks the ability to produce pyruvate. However, if the *E. coli* strain carries only one of the *pyk* mutations, the strain is capable of growing on ribose because pyruvate is synthesized via the remaining pyruvate kinase (Fig. 1). Finally, it is important to notice that a *pykA* strain grew better than a *pykF* strain with ribose as the only carbon source (Table 1).

Taken together, these results suggest that both pyruvate kinase isoenzymes have active roles in pyruvate biosynthesis, but it appears that the PykF enzyme contributes to a greater extent. Since pyruvate is a key intermediate in cell metabolism, it is important for the bacterial cell to have several alternatives to allow its synthesis. These different mechanisms are probably differentially regulated in order to have adequate responses to environmental changes.

We thank Paul Gaytán and Eugenio López for oligonucleotide synthesis and Alan Berry for a critical review of the manuscript.

This work was supported by grants 2031-N9302 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, PNUD-MEX.93.019 from Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, and Genencor International.

REFERENCES

1. Clairborne, W. F. 1992. An improved chloramphenicol resistance gene cassette for site-directed marker replacement mutagenesis. *BioTechniques* 12: 223-225.
2. Flores, N., et al. Unpublished data.
3. Fraenkel, D. G. 1987. Glycolysis, pentose phosphate pathway, and Entner-Doudoroff pathway, p. 142-149. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Garrido-Perterra, A., and R. A. Cooper. 1977. Pyruvate formation during the catabolism of simple hexose sugars by *Escherichia coli*: studies with pyruvate kinase-negative mutants. *J. Bacteriol.* 129:1208-1214.
5. Holms, W. H. 1986. The central metabolic pathway of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate, p. 69-105. In B. L. Horecker and E. R. Stadtman (ed.), *Current topics in cell regulation*. Academic Press, Inc., New York.
6. Lévy, S., G.-Q. Zeng, and A. Danchin. 1990. Cyclic AMP synthesis in *Esch-*

- erichia coli* strains bearing known deletions of the *pts* phosphotransferase operon. *Gene* 86:27-33.
7. Malcovati, M., and G. Valentini. 1982. AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 90:170-179.
 8. Oden, K. L., L. C. DeVeaux, C. R. T. Vibat, J. E. Cronan, Jr., and R. B. Gennis. 1990. Genomic replacement in *Escherichia coli* K-12 using covalently closed circular plasmid DNA. *Gene* 96:29-36.
 9. Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:543-594.
 10. Saier, M. H., Jr., and A. M. Chin. 1990. Energetics of bacterial phosphotransferase system in sugar transport and the regulation of carbon metabolism. p. 273-299. In T. A. Krulwich (ed.), *The bacteria: a treatise on structure and function*, vol. XII. Bacterial energetics. Academic Press, Inc., New York.
 11. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 12. Schweizer, H. P. 1993. Small broad-host-range gentamycin resistance gene cassettes for site-specific insertion and deletion mutagenesis. *BioTechniques* 15:831-833.
 13. Way, J. C., M. A. Davies, D. Morisato, D. E. Roberts, and N. Klecner. 1984. New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene* 32:369-379.