



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

299990

**CARACTERIZACIÓN Y
MANIPULACIÓN DEL
TRANSPORTE DE AZÚCARES EN
CEPAS DE Escherichia coli
DEFICIENTES DEL SISTEMA DE LA
FOSFOTRANSFERASA (PTS)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A
VERÓNICA HERNÁNDEZ MONTALVO

CUERNAVACA, MORELOS

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

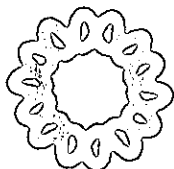


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

CARACTERIZACIÓN Y MANIPULACIÓN DEL
TRANSPORTE DE AZÚCARES EN CEPAS DE
Escherichia coli DEFICIENTES DEL
SISTEMA DE LA FOSFOTRANSFERASA (PTS)

TESIS

Que para obtener el título de:

DOCTOR EN CIENCIAS.

Presenta:

VERÓNICA HERNÁNDEZ MONTALVO

Cuernavaca, Morclos

2001

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría y supervisión de los Dres. Guillermo Gosset Lagarda y Fernando Valle Baheza.

Miembros del Jurado:

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| Presidente: | Dr. Edmundo Calva Mercado |
| Secretario: | Dr. Guillermo Gosset Lagarda |
| Vocal: | Dr. Miguel Lara Flores |
| Vocal: | Dr. Agustín López-Munquía Canales |
| Vocal: | Dr. Mario Soberón Chávez |
| Suplente: | Dra. Alejandra Bravo de la Parra |
| Suplente: | Dr. David Romero Camarena |

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| I. RESUMEN | 1 |
| I.1. RESUMEN EN ESPAÑOL | 2 |
| I.2. ABSTRAC | 4 |
| II. INTRODUCCIÓN | 6 |
| II.1. METABOLISMO CENTRAL | 7 |
| II.2. LA IMPORTANCIA DEL SISTEMA DE LA FOSFOTRANSFERASA (PTS) | 10 |
| II.3 INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS. | 13 |
| III. ANTECEDENTES | 16 |
| III.1. EL NODO DE FOSFOENOLPIRUVATO | 17 |
| III.2. PARTICIPACIÓN DE PTS EN LA REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS | 20 |
| III.3. JUSTIFICACIÓN | 21 |
| III.4. HIPÓTESIS | 23 |
| IV. OBJETIVOS | 24 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| V.1. CEPAS BACTERIANAS, VECTORES Y MEDIOS | 29 |
| V.2. PROCEDIMIENTOS GENÉTICOS Y TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE | 35 |
| V.3. CONDICIONES DE CULTIVO | 37 |
| V.4. MÉTODOS ANALÍTICOS | 39 |
| V.5. MEDICIONES DE TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS | 40 |

| | |
|---|-----------|
| VI. RESULTADOS | 42 |
| VI.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS | 43 |
| VI.2. PRIMERA SECCIÓN: CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES PTS⁻ GLUCOSA⁺ GENERADAS POR FLORES <i>ET AL.</i> (1996). | 44 |
| VI.2.1. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PTS⁺ Y PTS⁻ GLUCOSA⁺ UTILIZANDO COMO FUENTE DE CARBONO GLUCOSA, ARABINOSA O XILOSA | 44 |
| VI.2.2. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PTS⁺ Y PTS⁻ GLUCOSA⁺ EN PRESENCIA DE MEZCLAS DOBLES DE AZÚCARES: GLUCOSA-ARABINOSA Y GLUCOSA-XILOSA | 48 |
| VI.2.3. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PTS⁺ Y PTS⁻ GLUCOSA⁺ EN PRESENCIA DE LA COMBINACIÓN TRIPLE DE AZÚCARES: GLUCOSA, ARABINOSA Y XILOSA | 50 |
| VI.2.4. TRANSPORTE DE [C¹⁴]-XILOSA EN PRESENCIA DE GLUCOSA PARA LAS CEPAS PTS⁺, PTS⁻GLUCOSA⁻ Y PTS⁻ GLUCOSA⁺. | 52 |
| VI.2.5. TRANSPORTE DE [C¹⁴]-XILOSA EN UNA CEPA PTS⁻ GLUCOSA⁻ CON EL GEN <i>GALP</i> SOBRE-EXPRESADO. | 52 |
| VI.3. SEGUNDA SECCIÓN: DISEÑO DE UN SISTEMA CAPAZ DE MODULAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 54 |
| VI.4. TERCERA SECCIÓN: APLICACIÓN DEL NUEVO SISTEMA DE EXPRESIÓN GENÉTICA PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>GALP</i> Y <i>GLK</i> Y LA RECONSTITUCIÓN DEL FENOTIPO GLUCOSA⁺ A PARTIR DE CEPAS PTS⁻ | 56 |
| VI.4.1. CONSTRUCCIÓN DE LA FUSIÓN DEL PROMOTOR <i>TRC1</i> AL GEN <i>GLK</i> | 56 |

| | |
|---|----|
| VI.4.2. CONSTRUCCIÓN DE LA FUSIÓN DEL PROMOTOR <i>TRC1</i> AL GEN <i>GALP</i> | 57 |
| VI.4.3. CONSTRUCCIÓN DE LA LIBRERÍA DE PROMOTORES FUSIONADOS AL GEN <i>GLK</i> | 58 |
| VI.4.4. CONSTRUCCIÓN DE LA LIBRERÍA DE PROMOTORES FUSIONADOS AL GEN <i>GALP</i> | 62 |
| VI.4.5. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DERIVADO DE PCL1920 QUE CONTIENE LAS FUSIONES DE AMBOS GENES BAJO EL CONTROL DE LA LIBRERÍA DE PROMOTORES | 62 |
| VI.4.6. CULTIVOS EN MATRAZ PARA CALCULAR LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS MUTANTES | 63 |
| VI.4.7. MEDICIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GLUCOCINASA EN LAS MUTANTES PTS-GLUCOSA ⁺ | 67 |
| VI.4.8. MEDICIONES DE TRANSPORTE DE GLUCOSA PARA LAS MUTANTES PTS-GLUCOSA ⁺ | 68 |
| | |
| VI.5. CUARTA SECCIÓN: PRODUCCIÓN DE ETANOL POR LAS CEPAS MUTANTES VH32/PCLvGALP1 Y VH32/PVGLkGALP54 | 68 |
| | |
| VII. DISCUSIÓN | 76 |
| | |
| VIII. CONCLUSIONES | 85 |
| | |
| IX. PERSPECTIVAS | 88 |
| | |
| X. REFERENCIAS | 90 |
| | |
| XI. ARTÍCULOS PUBLICADOS | 99 |

| | |
|---|------------|
| CHARACTERIZATION OF SUGAR MIXTURES UTILIZATION BY AN <i>ESCHERICHIA COLI</i> MUTANT DEVOID OF THE FOSFOTRANSFERASE SYSTEM | 100 |
| XII. ANEXOS | 106 |
| XII.1. ABREVIATURAS | 107 |
| XII.2. UNIDADES DE LOS PARÁMETROS UTILIZADOS | 109 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | PÁGINA |
|--|---------------|
| Figura 1. Metabolismo central. | 9 |
| Figura 2. Componentes generales y específicos del sistema PTS. | 11 |
| Figura 3. Rutas del metabolismo central en <i>E. coli</i> . | 13 |
| Figura 4. Vías de metabolismo central relacionadas con la producción y consumo de PEP. | 18 |
| Figura 5. Sistema alternativo de transporte y fosforilación de glucosa propuesto. Para las mutantes PTS-Glucosa ⁺ | 19 |
| Figura 6. Composición genérica de residuos lignocelulósicos | 22 |
| Figura 7. Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para las cepas PTS ⁺ y PTS-Glucosa ⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con glucosa. | 45 |
| Figura 8. Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para las cepas PTS ⁺ y PTS-Glucosa ⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con arabinosa. | 46 |
| Figura 9. Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para las cepas PTS ⁺ y PTS-Glucosa ⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con xilosa. | 47 |
| Figura 10. Cinéticas de crecimiento de las cepas silvestre y PTS-Glucosa ⁺ realizadas en presencia de la mezcla triple glucosa-arabinosa-xilosa | 51 |
| Figura 11. Transporte de azúcar por las cepas PTS ⁺ , PTS-Glucosa ⁻ , PTS-Glucosa ⁻ /pCLvGalP1 y PTS-Glucosa ⁺ . | 53 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 12. Mutaciones puntuales realizadas en la caja -35 del promotor comercial <i>trc</i> . | 55 |
| Figura 13. Fuerza esperada para los promotores mutantes de <i>trc</i> , en valor relativo a la fuerza del promotor silvestre. | 55 |
| Figura 14. Resultados de los ensayos de actividad enzimática de Glk para la cepa W3110/pvGlk1.2 utilizando diferentes concentraciones del inductor IPTG. | 57 |
| Figura 15. Gráfico de Q_s vs. μ , calculados utilizando las ecuaciones 1 y 3 con un valor de $Y_{x/s}=0.48$. | 59 |
| Figura 16. Actividad enzimática calculada para la cepa W3110 transformada con los derivados de pTrc_99A que contienen las fusiones del gen <i>glk</i> a los promotores <i>trc1</i> y <i>trc5</i> . | 60 |
| Figura 17. Ensayos enzimáticos realizados con la cepa W3110 transformada con la familia de vectores pCLvGlk a una concentración de 1 mM de IPTG. | 61 |
| Figura 18. Comparación de los niveles de expresión obtenidos para las fusiones de <i>trc[#]-glk</i> . El símbolo - indica que este valor no fue determinado. | 62 |
| Figura 19. Posibles combinaciones de las 10 fusiones de <i>glk</i> y <i>galP</i> que pueden ser clonadas en el vector pCL1920. | 63 |
| Figura 20. Velocidades de crecimiento para las 14 mutantes construidas, calculadas en medio mínimo suplementado con glucosa. | 65 |
| Figura 21. Cultivos de las cepas silvestre y mutantes PTS- transformadas con el plásmido pLOI1594. | 72 |

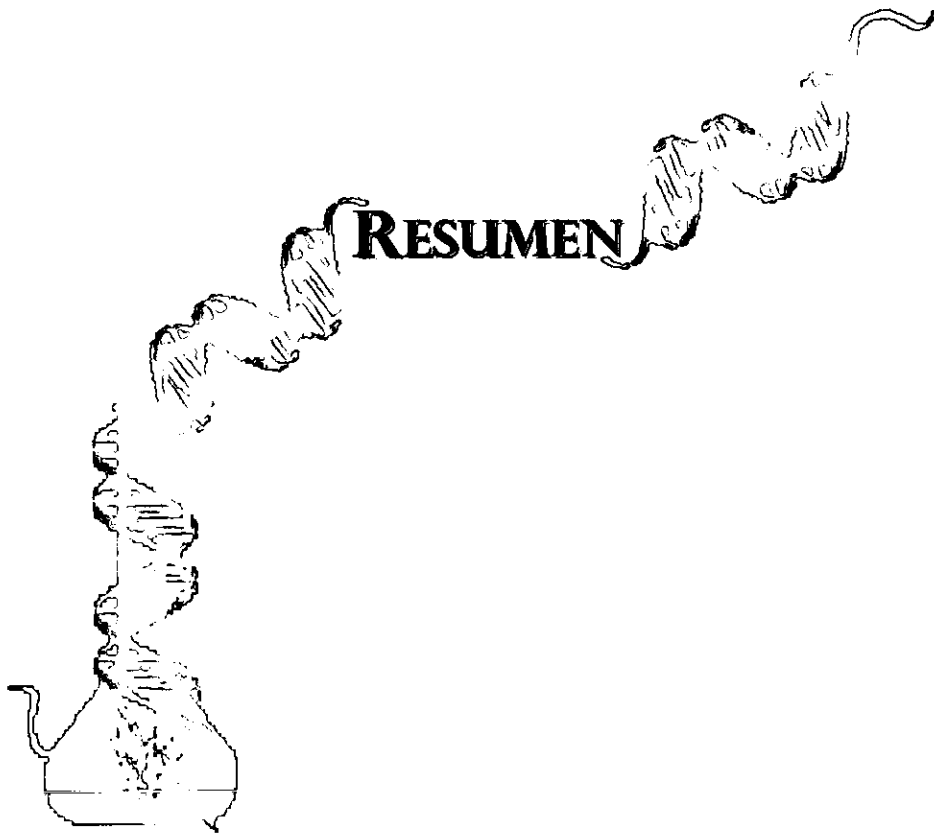
ÍNDICE DE TABLAS

| | PÁGINA |
|--|--------|
| TABLA I. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. | 29 |
| TABLA II. Vectores utilizados en este trabajo. | 30 |
| TABLA III. Parámetros cinéticos para cultivos de las cepas PTS ⁺ y PTS ⁻ Glucosa ⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con un carbohidrato como fuente de carbono. | 44 |
| TABLA IV. Parámetros cinéticos para cultivos de las cepas PTS ⁺ y PTS ⁻ Glucosa ⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con dos o tres carbohidratos como fuente de carbono. | 49 |
| TABLA V. Velocidades de crecimiento de las cepas control calculadas en medio mínimo suplementado con glucosa. | 64 |
| TABLA VI. Rendimiento de ácido acético por glucosa consumida por las mutantes PTS-Glucosa ⁺ y la cepa silvestre W3110 en cultivos de fermentador. | 66 |
| TABLA VII. Actividad enzimática de glucocinasa para los controles y las mutantes más importantes. | 67 |
| TABLA VIII. Velocidades de transporte de glucosa calculadas para las cepas control y las mutantes más importantes. | 68 |
| TABLA IX. Parámetros cinéticos de la cepa silvestre y dos mutantes PTS ⁻ sin el plásmido pLOI1594 en condiciones de aerobiosis. | 70 |

TABLA X. Parámetros cinéticos de la cepa silvestre y dos mutantes PTS transformadas con el plásmido pLOI1594 en condiciones de aerobiosis.

71

I



RESUMEN EN ESPAÑOL.

En *Escherichia coli*, la glucosa y varios carbohidratos más son internalizados a la célula mediante el sistema de la fosfotransferasa (PTS). Además de transporte, este sistema está involucrado en regulación del transporte y metabolismo de otras fuentes de carbono, entre otras funciones. La regulación de la asimilación del carbono es llevada a cabo mediante el componente específico para glucosa IIA^{Glc}. Mutaciones en este sistema producen efectos pleiotrópicos y crecimiento deficiente en una gran variedad de fuentes de carbono (Flores et al, 1996; Postma 1996). En 1996, Flores *et al.* reportaron el aislamiento de mutantes deficientes del sistema de la fosfotransferasa ($\Delta ptsH, I, crr$), que a diferencia de reportes anteriores eran capaces de crecer en glucosa y varias fuentes de carbono más. Este fenotipo resultó ser muy interesante, debido a que estas mutantes tenían la capacidad de crecer a altas velocidades en medio con glucosa como única fuente de carbono. A partir de este reporte, surge el interés de entender cómo la ausencia del componente IIA^{Glc} podría cambiar la regulación de la asimilación de otros carbohidratos y la forma en la que estos serían consumidos en presencia de glucosa.

En el presente trabajo, se llevó a cabo la caracterización del efecto de glucosa sobre la asimilación de otros carbohidratos en mutantes PTS-Glucosa⁺, cuando están creciendo en presencia de mezclas dobles y triples de glucosa, xilosa y arabinosa. Se demostró que la ausencia de IIA^{Glc} provoca la desaparición del efecto represor de glucosa sobre el consumo de arabinosa; sin embargo, estas mutantes aún presentan un efecto de represión parcial por glucosa sobre el consumo de xilosa. Mediciones del transporte de xilosa en presencia y ausencia de glucosa demostraron que este efecto represor sobre la asimilación de xilosa, es menor que el que ocurre en la cepa silvestre y se lleva a cabo mediante la presencia intracelular de glucosa a través de un mecanismo desconocido.

Analizando estas mutantes se encontró que son capaces de internalizar glucosa mediante GalP, como sistema alternativo de transporte y, una vez en el interior de la célula, se fosforila por la glucocinasa (Flores *et al.*, 1996.) A pesar de este conocimiento, no se sabía si únicamente con la expresión de estos dos genes era posible lograr la reconstitución del

fenotipo glucosa⁺ en cepas deficientes de PTS. En este trabajo se resuelve esta interrogante, al mostrar el rol que cada uno de estos genes juega en la capacidad de asimilación de glucosa, generando un nuevo método para obtener mutantes PTS-Glucosa⁺ mediante la expresión del nivel adecuado de los genes *glk* y *galP*, que les permitió crecer a la misma velocidad que su cepa parental. Para encontrar cuál era el nivel de expresión adecuado, se diseñó un conjunto de promotores de diferente fuerza que permitió la modulación de ambos genes, hasta encontrar la combinación adecuada de la expresión de cada uno de ellos para lograr la velocidad de crecimiento iguales a la cepa silvestre parental. Demostrando que es posible regenerar la capacidad de asimilar glucosa con la adecuada expresión de solamente dos genes (*glk* y *galP*).

Adicionalmente, el conjunto de promotores diseñado en este trabajo puede usarse como herramienta general en ingeniería de vías metabólicas, para modular la expresión transcripcional de genes de interés, de forma inducible o constitutiva dependiendo del fondo genético de la cepa de *Escherichia coli* usada.

ABSTRAC.

In *Escherichia coli* glucose and several others carbohydrates are internalized into the cell through the phosphotransferase system (PTS). Besides transport, PTS perform other functions of importance: this system participates in chemotaxis, in the regulation of the transport and the metabolism of other carbon sources. The glucose specific component IIA^{Glc} plays the major role in this regulation.

In 1996, Flores *et al.* reported the isolation of mutants lacking the phosphotransferase system, but with an important difference with former reports; they displayed near-normal growth in glucose and several carbon sources. This phenotype was very interesting, because these mutants have the ability to grow at high rates on minimal media with glucose as sole carbon source. From this report, emerge the interest to understand the regulation of carbohydrate assimilation in the absence of the IIA^{Glc} component and the effect of glucose over the assimilation of other carbohydrates.

Thereby, in the present characterization of the glucose effect over transport of other sugars was determined in the PTS-Glucose⁺ mutants, when they were growing in the presence of double and triple sugar mixtures of glucose, arabinose and xylose. It was observed that the lack of IIA^{Glc} eliminates the repressive effect of glucose over arabinose assimilation; however, in these mutants glucose still repressed to some extent xylose assimilation. Xylose transport measurements, in the absence and presence of glucose showed that this effect is less severe in the mutants than in the wild-type strain and depended on the presence of intracellular glucose.

Previous analyses of these mutants has reveled that they were able to internalize glucose by an alternating system, in which glucose is transported by GalP and is phosphorylated by the glucokinase inside the cell (Flores *et al.*, 1996). Despite of this knowledge, it was not known if the sole expression of these two genes was sufficient to confers a glucose⁺ phenotype in strains devoid of PTS, or if additional changes selected during the continuous culture were responsible (Flores *et al.*, 1996). In the present work,

this question was answered since the expression of the *galP* and *glk* genes reconstituted glucose assimilation. A new method was generated to obtain PTS-Glucose⁺ mutants, by finding the right expression level of the *galP* and *glk* genes that allowed them to grow at the same rate than the parental wild-type strain with glucose as sole carbon source. To determine which was the adequate expression level of these genes, we designed a group of promoters with different strength that allowed the modulation of both genes, until the right combination of the expression of each one was found to get the desired growth rate. By modulating the transcriptional expression of *galP* and *glk*, it was possible to obtain mutants devoid of PTS that can develop growth rates equal to the wild-type strain, showing that is possible to regenerate the capability of assimilating glucose with the adequate expression of only two genes.

In addition, the set of promoters designed in this work could be use as a general tool in metabolic engineering, to modulate the transcriptional expression of a set of specific genes, which could be inducible or constitutive, depending on the genotype of the *E. coli* strain used.

II



II.1. METABOLISMO CENTRAL.

Aproximadamente, dos mil diferentes reacciones metabólicas participan en la síntesis de una célula bacteriana ordinaria. Dependiendo de su función en el crecimiento, estas reacciones pueden ser agrupadas como reacciones de ensamblaje, polimerización, biosintéticas y de generación de energía.

Las reacciones de ensamblaje involucran modificaciones de macromoléculas, su transporte a zonas específicas dentro de la célula y su asociación para formar estructuras celulares. Las reacciones de polimerización consisten en la unión dirigida y secuencial de moléculas activadas formando cadenas largas. Todas las cadenas son formadas de monómeros "building blocks", dentro de los cuáles se incluyen 20 aminoácidos, 8 nucleótidos, un gran número de azúcares y ácidos grasos. Las reacciones biosintéticas producen los monómeros de las reacciones de polimerización y también los cofactores y compuestos relacionados a ellos. En general, las vías biosintéticas celulares comienzan con alguno de los compuestos conocidos como metabolitos precursores. A partir de sólo 12 de estos precursores es posible sintetizar alrededor de 75 monómeros y coenzimas.

A partir de las reacciones del metabolismo central se produce energía, los 12 metabolitos precursores y poder reductor, además de conservar la energía metabólica necesaria para biosíntesis. También se produce la energía requerida para las reacciones de polimerización y todos los procesos endergónicos de la célula, incluyendo todas las reacciones conocidas como catabólicas. Además de estos tipos de reacciones, existen algunas más que pueden ser integradas a estos grupos, por ejemplo reacciones de reparación, transporte y asimilación, entre algunas otras. La secuencia de todas estas reacciones da lugar a lo que llamamos vías metabólicas celulares.

Dentro del conjunto total de vías metabólicas, existe un grupo que forma el llamado metabolismo central. El metabolismo central provee los metabolitos precursores de todas las demás vías; está conformado por las vías de metabolismo de carbohidratos y ácidos carboxílicos, tales como los ácidos dicarboxílicos (C4) y ácido acético. Las principales vías de asimilación de carbohidratos son: la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (también llamada

vía EMP ó glicólisis), la vía de las pentosas fosfato (PPP), y la vía de Entner Doudoroff (ED). Estas vías difieren en varios aspectos, sin embargo, es posible hacer dos consideraciones generales para ellas:

1. Las tres vías convierten glucosa a fosfogliceraldehído, aunque sea por diferentes rutas.
2. El fosfogliceraldehído se convierte a piruvato mediante las mismas reacciones en las tres vías.

Desde un punto de vista energético, las reacciones que convierten el fosfogliceraldehído a piruvato son muy importantes porque generan ATP a partir de fosfato inorgánico y ADP. El destino de este piruvato depende de si las células están respirando o no. Si los organismos están respirando, entonces el piruvato que se forma por la vía catabólica de los carbohidratos es oxidado a acetyl-CoA, el cuál es subsecuentemente oxidado a dióxido de carbono en el ciclo de Krebs, éste generalmente opera sólo durante la respiración aeróbica. Si se lleva a cabo fermentación en lugar de respiración, entonces el piruvato es convertido a productos finales de fermentación tales como alcoholes, ácidos orgánicos y solventes, en lugar de ser oxidado en el ciclo de Krebs. La **figura 1** muestra un resumen de las vías catabólicas de los carbohidratos y su relación al ciclo de Krebs.

Es importante notar que en estas vías existen tres niveles de fosforilación de sustratos, dos durante el catabolismo de carbohidratos y una en el ciclo de Krebs. Además, hay seis reacciones de oxidación, una en glicólisis, una en la reacción de la piruvato deshidrogenasa, y cuatro en el ciclo de Krebs. Estas oxidaciones producen NADH y FADH₂. El NADH y FADH₂ deben ser reoxidados para regenerar el NAD⁺ y FAD que son requeridos para las oxidaciones. La ruta de re-oxidación y el rendimiento de energía depende nuevamente de si el organismo está respirando o fermentando. Durante la respiración, el NADH y FADH₂ son reoxidados vía el transporte de electrones con la formación de Δp (fuerza protón motriz). Cuando las células están fermentando, la mayoría del NADH es re-oxidado en el citosol por un aceptor orgánico, pero no se genera ATP.

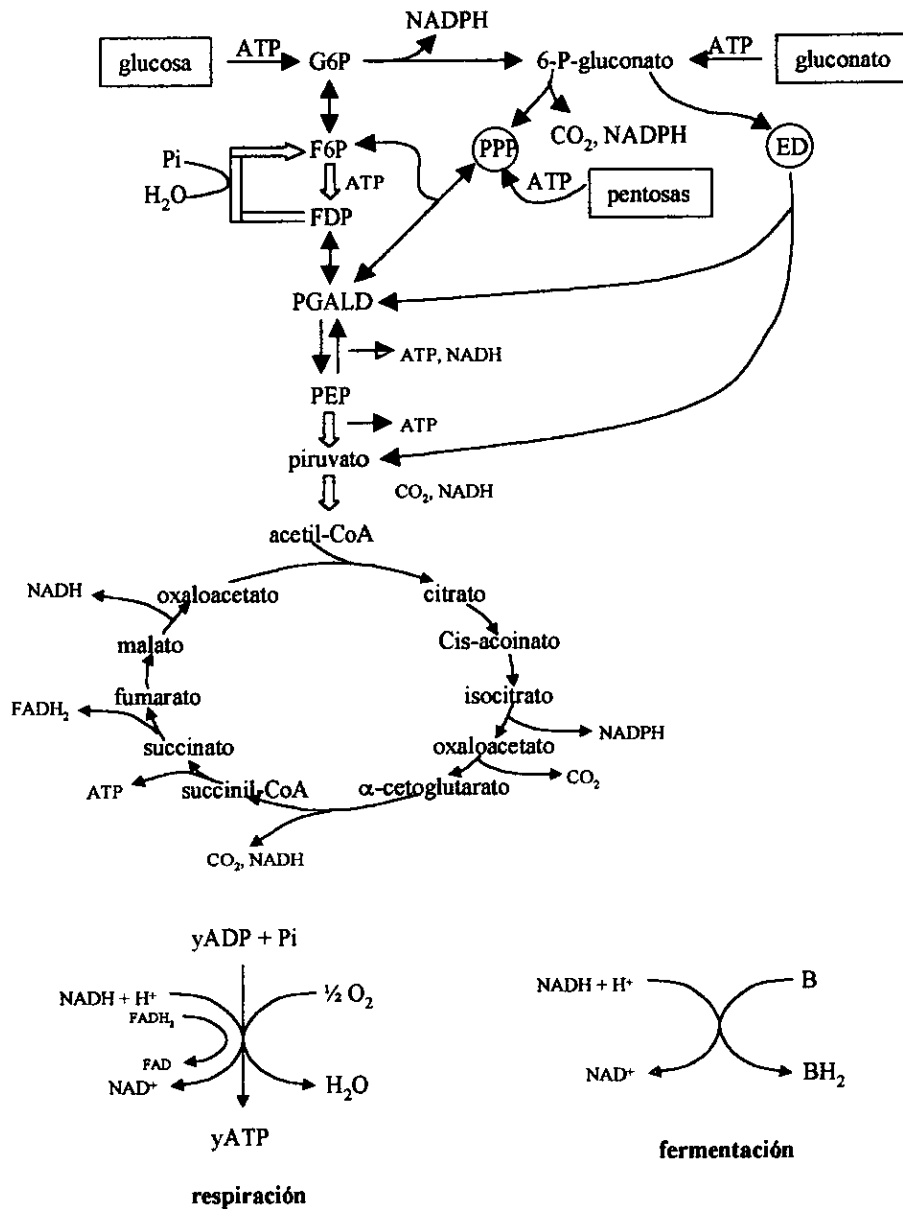


Figura 1. Relaciones entre las principales vías de catabolismo de carbohidratos y el ciclo de Krebs. La vía de Embden-Meyerhof-Parnas inicia con glucosa-6P hasta piruvato. La vía de las pentosas fosfato y de Entner-Doudoroff inician en 6-fosfogluconato. Ambas se unen con la glicólisis en el nivel del fosfogliceraldehído. Todas las vías del catabolismo de carbono producen piruvato, el cuál es oxidado a acetil-CoA ó genera los productos de fermentación. G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FDP, fructosa-1,6-bifosfato; PGALD, 3-fosfogliceraldehído; PEP, fosfoenolpiruvato.

II.2. LA IMPORTANCIA DEL SISTEMA DE LA FOSFOTRANSFERASA (PTS).

Los microorganismos en general pueden asimilar una amplia variedad de fuentes de carbono, estas características hacen a las bacterias capaces de adaptarse a diferentes condiciones ambientales para competir con otros microorganismos por sustratos limitantes. A pesar de que los nutrimentos nunca aparecen aisladamente en el ambiente natural en el que se desarrollan, las bacterias son capaces de crecer en medio mineral suplementado con una sola fuente de carbono y energía a un tiempo de duplicación promedio de 2 a 3 h a 37°C. Esto es impresionante, ya que en medio rico el tiempo de duplicación no es menor a 0.5 h, lo que proporciona evidencia de que la síntesis y ensamblaje de las macromoléculas es el factor que limita la velocidad de crecimiento. Para ser asimiladas, las fuentes de carbono son translocadas a través de la membrana mediante una gran variedad de sistemas de transporte, uno los más importantes es el sistema de la fosfotransferasa (Phosphotransferase System ó PTS por sus siglas en inglés), ya que además de llevar a cabo el transporte y fosforilación de un gran número de fuentes de carbono, este sistema está involucrado en otras actividades fundamentales para la célula, como son: quimiotaxis, percibir el medio que les rodea, elegir el orden en el que las fuentes de carbono van a ser utilizadas y en regulación de un considerable número de vías metabólicas, p. ej.: en *E. coli* esta involucrado en regulación del transporte de lactosa, metabolismo de arabinosa y xilosa, glicólisis, y genes dependientes de CRP-AMPc (Postma y Lengeler et al. 1993. Postma et al. 1996, Saier et al. 1996). Al igual que otros sistemas sensores que han sido identificados (Saier and Reizer, 1994; Lux et al. 1995), PTS involucra en su funcionamiento la fosforilación de proteínas en residuos de histidina, serina o ácido aspártico.

Con respecto al transporte, PTS es fundamental en la internalización de glucosa y una amplia variedad de fuentes de carbono en bacterias, incluyendo a *E. coli*. Este sistema pertenece al grupo de transportadores que forman la familia de translocadores, se encuentra distribuido en el género bacteria y esta ausente en Archaea y en organismos eucarióticos (Saier, 2000). PTS acopla la translocación del carbohidrato a través de la membrana con su concomitante fosforilación, utilizando al fosfoenolpiruvato (PEP) como donador del grupo fosfato y de la energía requerida para llevar a cabo este proceso (Postma et al. 1996). Como

se puede observar en la **Figura 2**, PTS cuenta con dos componentes comunes para todos los carbohidratos PTS (las proteínas generales: EI y HPr) y un componente específico para cada carbohidrato PTS (EIIs). EI (codificado por *ptsI*) es una proteína soluble, que forma dímeros y requiere de la presencia de un catión divalente (Mg^{2+} ó Mn^{2+}) para realizar su actividad; se caracteriza por su capacidad de autofosforilación por PEP, y transfiere el grupo fosforil a la enzima HPr. La proteína HPr (codificada por *ptsH*) es monomérica y soluble. Con respecto a la EII, ésta puede consistir de una sola proteína de membrana o de dos a cuatro proteínas, en las que al menos una está unida a la membrana. Cada EII contiene tres dominios (IIA, IIB, IIC) y algunas veces cuatro (IID). Se encuentran agrupadas en cuatro familias: la de glucosa, manitol, lactosa y manosa. En estas familias, los miembros comparten una identidad en su secuencia de aminoácidos mayor al 25%. Entre los azúcares que pueden ser transportados por PTS, en diferentes microorganismos, se encuentran: glucosa, maltosa, trealosa, sacarosa, manitol, fructosa, lactosa, celobiosa, galactosa, β -glucósidos, entre algunos otros.

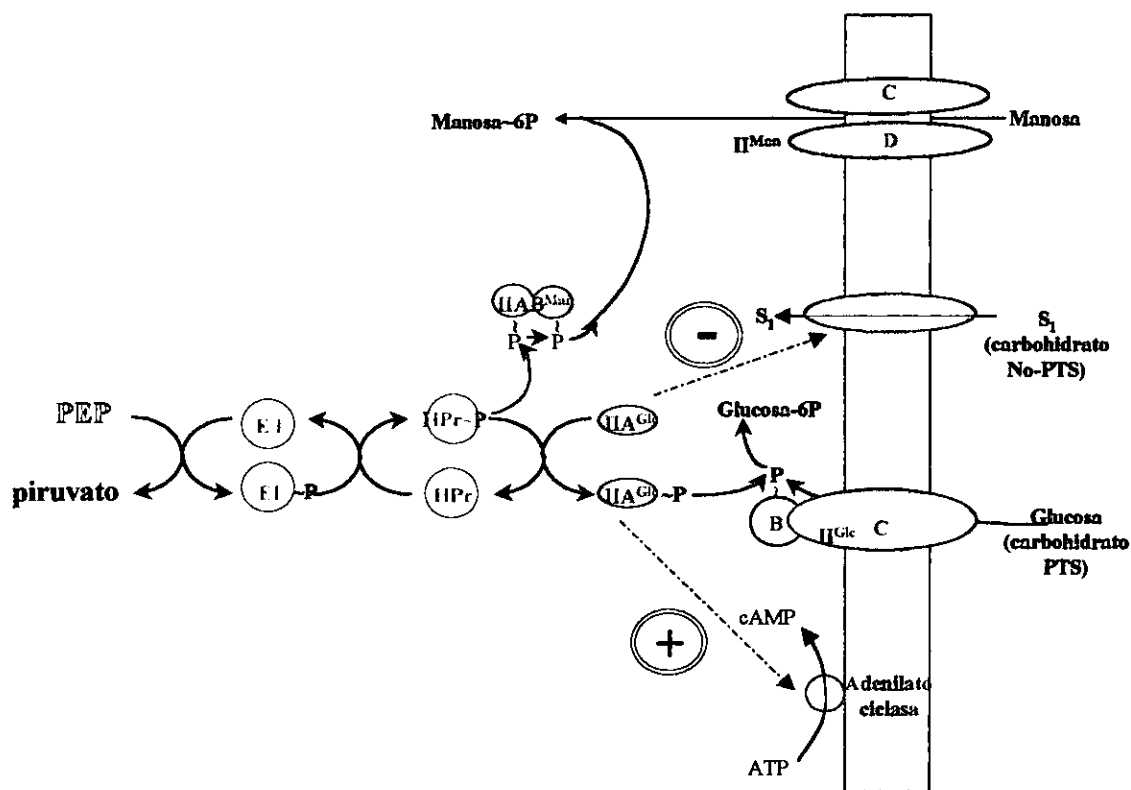


Figura 2. Componentes generales y específicos del sistema PTS.

En *E. coli*, la enzima EII para glucosa (componente II^{Glc}) consiste de dos proteínas: un componente soluble IIA^{Glc} (codificado por *crr*) y la proteína IICB^{Glc} (codificada por *ptsG*). IIC^{Glc} es el dominio unido a membrana, el cual constituye la región amino terminal de la molécula, mientras que el dominio carboxi terminal IIB^{Glc} es hidrofílico. Mutantes con EI y/ó HPr no funcional(es) no pueden utilizar los carbohidratos PTS como única fuente de carbono para crecimiento. Además, las mutantes *ptsHI* de *E. coli* no son capaces de crecer en un gran número de carbohidratos no PTS para ésta bacteria, incluyendo entre ellos lactosa, maltosa, melibiosa, glicerol, intermediarios del ciclo de Krebs, ramnosa, xilosa y otros.

El transporte de glucosa (carbohidrato PTS) implica su fosforilación por la proteína específica $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$, con la consecuente activación de la cadena de fosforilación a partir de PEP y la acumulación de la proteína IIA^{Glc} en su forma no-fosforilada, la cuál ejerce un efecto regulador negativo sobre el transporte de carbohidratos no-PTS. Por el contrario, la presencia de un carbohidrato no-PTS implica la acumulación de la proteína $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$, con la consecuente disminución de la poza de IIA^{Glc} (no fosforilada). Adicionalmente, la proteína $\text{IIA}^{\text{Glc}}\text{-P}$ ejerce un efecto positivo sobre la síntesis del AMPc requerido para el metabolismo de carbohidratos no-PTS en *E. coli*.

El transporte de carbohidratos vía PTS es extremadamente eficiente y, en teoría, puede concentrar la glucosa intracelular hasta 10^6 veces en contra de un gradiente de concentración (Parr and Saier 1992). A pesar de la eficiencia de este sistema, varios grupos (Berry 1996, Saier et al. 1973, Snoep et al. 1994, Flores et al. 1996) han enfocado su esfuerzo al desarrollo de mutantes que sean capaces de internalizar glucosa a través de sistemas alternos. Este interés se basa en la necesidad de incrementar la disponibilidad de PEP, debido a que esta molécula es precursor directo o indirecto de una gran variedad de metabolitos de interés comercial; por ejemplo: aminoácidos aromáticos, índigo, melaninas y ácido adípico (Fig. 3). Además de los compuestos mencionados, existen muchos otros derivados de metabolismo central que son precursores de compuestos de interés, por ejemplo el gliceraldehído-3-fosfato que es precursor del 1,2-propanodiol. Nuestro grupo se ha unido también a este esfuerzo, obteniendo resultados satisfactorios al redirigir el flujo de

carbono en mutantes deficientes del sistema de la fosfotransferasa (cepas PTS-Glucosa⁺) hacia la vía de producción de aminoácidos aromáticos, obteniendo un incremento en la producción de uno de los intermediarios de esta vía (DAHP) de al menos 3.8 veces (Gosset *et al* 1996).

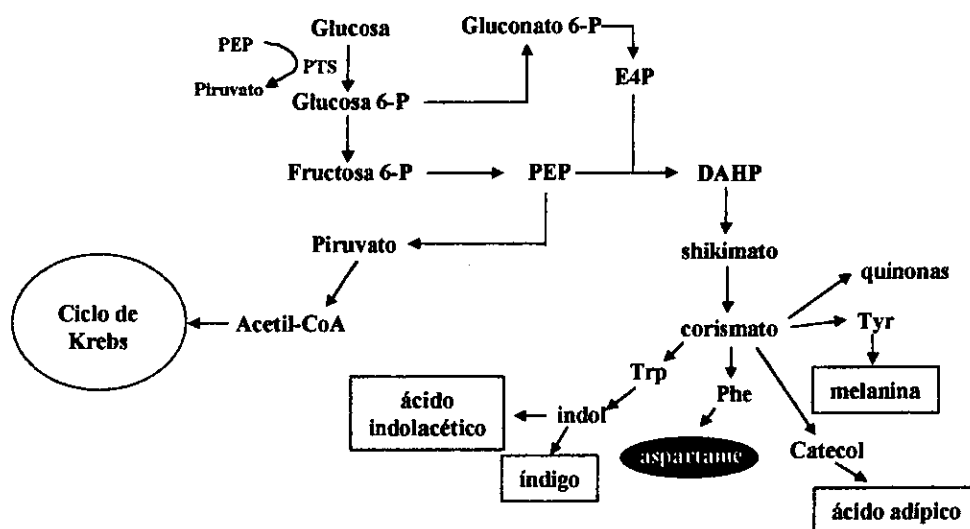


Figura 3. Rutas del metabolismo central en *E. coli*. Se muestra la derivación de los esqueletos de carbono para la biosíntesis de compuestos aromáticos. Otros compuestos que han sido producidos en *E. coli* por enzimas heterólogas son mostrados en los recuadros. El aspartame ha sido sintetizado por un proceso químico acoplado, usando como sustrato fenilalanina producida por fermentación. (Tomado de Flores *et al.* 1996)

II.3 INGENIERÍA DE VÍAS METABÓLICAS.

Como consecuencia del surgimiento y aplicación de la ingeniería de vías metabólicas, en los últimos años se ha acelerado considerablemente la generación de mutantes similares a las descritas en la sección anterior. Esta disciplina nace gracias al conocimiento generado en las dos últimas décadas en investigación en genética microbiana y a una mayor comprensión de las vías metabólicas, ayudando con ello a generar microorganismos capaces de producir metabolitos deseados con altos rendimientos, convirtiéndolos en pequeños reactores capaces de transformar azúcares y otras materias primas en químicos o farmacéuticos. Esta disciplina va más allá de la simple manipulación de las velocidades de

las reacciones bioquímicas, pues se trata de redirigir el flujo de carbono y energía para alcanzar un objetivo. Típicamente, este objetivo es incrementar la velocidad de formación del producto deseado ó reducir la formación de un producto indeseado. Existen muchas definiciones de esta disciplina, por lo que es difícil mencionar solo una de ellas, sin embargo a continuación se presenta lo que a consideración de Stephanopoulos *et al* (1998) es una de las definiciones más completas. Se entiende como ingeniería de vías metabólicas al mejoramiento dirigido de la formación de un producto o de las propiedades celulares, a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o de la introducción de nuevas, con el uso de la tecnología de DNA recombinante.

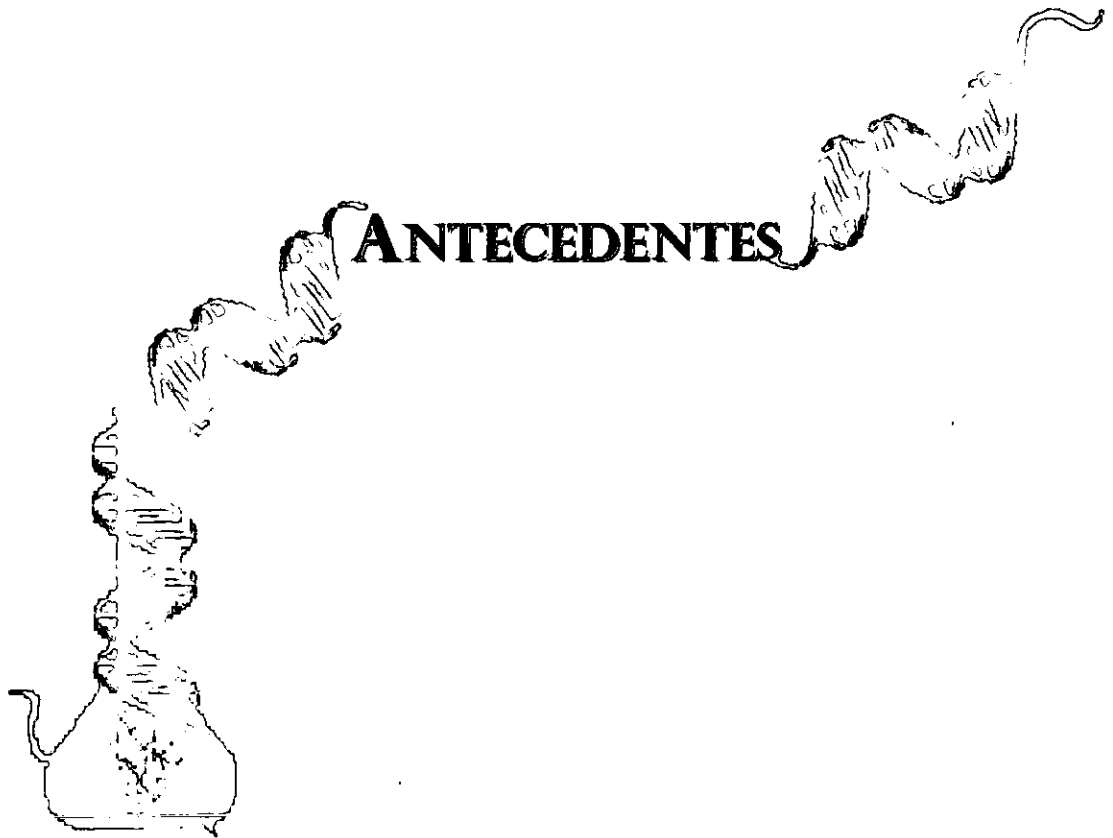
En este contexto, un adecuado control de la expresión génica es de crucial importancia para alcanzar los objetivos de esta disciplina, ya que la optimización metabólica no solo implica la simple sobreexpresión masiva o la inactivación de genes. Los principales blancos de modificación por ingeniería de proteínas e ingeniería genética son las actividades enzimáticas, de transporte y de regulación (Bailey, 1991). Actualmente, la mayoría de los esfuerzos realizados mediante ingeniería de vías metabólicas, para mejorar cepas bacterianas, se han enfocado en la modificación de las actividades enzimáticas o de sus propiedades. Algunas de las estrategias usadas han sido la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas limitantes en una vía o el uso de enzimas mutantes que carecen de sensibilidad a retroinhibición, con las cuáles se ha obtenido como resultado un incremento en el flujo de vías metabólicas específicas (Nakamori *et al.*, 1998; Rajagopal *et al.*, 1998). Además, la inactivación de actividades enzimáticas que compiten por los precursores de una vía determinada ha resultado en un incremento del rendimiento del metabolito de interés (Miller *et al.*, 1987). Estas estrategias, combinadas con la introducción de genes heterólogos en un determinado microorganismo, han permitido el desarrollo de cepas productoras con capacidad de sintetizar metabolitos a un nivel fuera del alcance de su cepa parental (Frost and Draths, 1995; Farmer and Liao, 2000; Ohta *et al.*, 1991; Sim *et al.*, 1997).

Sin embargo, también existen numerosos ejemplos en la literatura donde se demuestra que al usar sólo una de estas estrategias, sobreexpresión o inactivación de genes relacionados a una vía metabólica, se han obtenido resultados pleiotrópicos poco alentadores

o inclusive negativos al objetivo planteado (Ingram y Conway, 1988; Jensen y Hammer, 1997; Jensen y Hammer 1998; Niederberger *et al.*, 1992). Según la teoría de control metabólico, el control de una vía puede estar distribuido en varias enzimas (Henrich and Rapoport, 1974; Kacser and Burns, 1973). Por esta razón, el incrementar la expresión de un gen puede tener solo un efecto marginal en el flujo. Además, debido a la carga metabólica es probable que disminuya el desempeño en general del microorganismo, por el agotamiento de algunas sustancias necesarias para el crecimiento, o al rompimiento del equilibrio en el balance de co-factores involucrados en los procesos metabólicos como consecuencia de la sobreexpresión de uno o varios genes. Para eliminar el efecto de carga metabólica o desbalance en el metabolismo de cepas mutantes varios grupos han dedicado su esfuerzo a la generación de nuevos sistemas de expresión que les permitan obtener niveles adecuados en la expresión de los genes que se están manejando. Los sistemas disponibles actualmente para el control de la expresión genética requieren de la adición de compuestos químicos o el cambio de algún otro parámetro de la fermentación que sirvan como inductores de la expresión génica, además no son capaces de mantener un estado de expresión estacionario en el transcurso del cultivo. Algunos otros sistemas de expresión son constitutivos, por lo que tienen la ventaja de no requerir un inductor. Pero, para obtener los diferentes niveles de expresión se generan promotores mutantes mediante el uso de mutagénesis al azar, lo que genera un gran número de variantes a analizar, haciéndolo costoso y poco práctico.

Por otro lado, a pesar del importante rol de los sistemas de transporte en la fisiología bacteriana, al compararlos con las modificaciones de funciones enzimáticas, existen relativamente pocos ejemplos donde las funciones de transporte han sido directamente modificadas en un intento por mejorar las características de una cepa de producción. En el caso de *Escherichia coli*, los trabajos reportados se han enfocado en la modificación de la capacidad de transporte de azúcares por la célula (Snoep *et al.*, 1994; Chatterjee *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1994; Flores *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Hernandez *et al.*, 2001). Estos esfuerzos están basados, usualmente, junto con otras modificaciones genéticas, en la eliminación o modificación de la función del sistema de la fosfotransferasa y sus proteínas específicas para glucosa.

III



III.1. EL NODO DE FOSFOENOLPIRUVATO (PEP)

Existen varias estrategias dirigidas a dar solución al problema de la disponibilidad de PEP en cepas sobreproductoras de metabolitos de interés industrial, entre ellas se encuentran la obtención de mutantes que transportan glucosa por medio de sistemas alternos a PTS y la inactivación o sobreexpresión de enzimas clave en el metabolismo de PEP. Entre las estrategias reportadas en la literatura que emplean sistemas de transporte alternos a PTS, se encuentran mutantes de *Salmonella typhimurium* que utilizan la permeasa de galactosa (GalP) para transportar la glucosa y, una vez en el interior, fosforilarla por medio de una glucocinasa (Glk) que utiliza ATP (Saier et al. 1973). Si bien estas cepas son capaces de transportar y fosforilar glucosa, no lo hacen a una tasa que les permita crecer a una alta velocidad. Por otro lado, también se ha reportado la reconstitución del fenotipo Glucosa⁺, en cepas de *E. coli* (*ptsG*⁻, *ptsM*⁻, *glk*), utilizando dos genes de *Zymomonas mobilis*, *glf* (proteína transportadora por difusión facilitada) y *glk* (glucocinasa) (Snoep et al. 1994). Pero al igual que en el caso anterior, no se pudieron obtener mutantes con velocidades de crecimiento comparables a la cepa silvestre.

Otra estrategia para incrementar directamente la disponibilidad de PEP ha sido la inactivación de la enzima PEP carboxilasa (*ppc*), que convierte PEP en oxaloacetato (OAA), o la amplificación de la PEP sintasa (*pps*) que ocasiona un considerable incremento en la disponibilidad de PEP. Sin embargo, existe un efecto tóxico al amplificar *pps* y la bacteria deja de crecer. Otra estrategia se ha basado en la inactivación de los genes que codifican para las isozimas piruvato cinasas (*pykA* y *pykF*) (Berry 1996) (Fig.4). Sin embargo, al analizar el nodo de fosfoenolpiruvato (Fig. 4) claramente vemos como en *E. coli* PTS es el mayor consumidor de PEP cuando esta bacteria se encuentra creciendo en glucosa como única fuente de carbono. Es por ello que la inactivación de PTS se convierte en el blanco principal para lograr un incremento considerable en la disponibilidad de PEP.

Siguiendo este razonamiento, Flores *et al.* (1996) obtuvieron mutantes deficientes del sistema de la fosfotransferasa capaces de crecer en medio mínimo con glucosa a altas velocidades de crecimiento (μ del 90% de la cepa silvestre). Estas mutantes (fenotipo PTS-

Glucosa⁺) fueron aisladas mediante un método basado en la presión de selección en un cultivo continuo, utilizando medio mínimo suplementado con glucosa como única fuente de carbono (Flores *et al.* 1996).

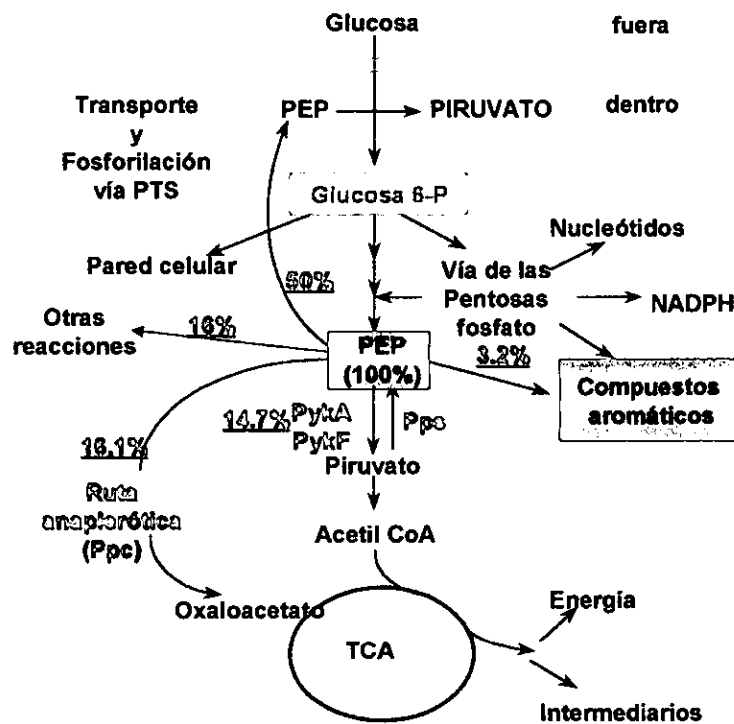


Figura 4. Vías de metabolismo central relacionadas con la producción y consumo de PEP. Datos del nodo de distribución de fosfenolpiruvato reportados por Holms *et al* (1986).

Para determinar cuales eran los genes involucrados con la capacidad de consumir glucosa en las cepas deficientes de PTS, se inició la caracterización de algunas de estas mutantes. Los datos más importantes obtenidos de esta caracterización son: 1) La remoción del gen que codifica para el transportador de galactosa (*galP*) revierte la capacidad de asimilar glucosa en las mutantes PTS-Glucosa⁺ (N. Flores, comunicación personal). 2) La remoción del gen *glk* en las mutantes PTS-Glucosa⁺ provocó el mismo efecto que la delección de *galP*, esto es, incapacidad para asimilar glucosa (N. Flores, comunicación personal). 3) En algunas de estas mutantes se encontró un nivel de actividad de glucocinasa (GlcK) ligeramente mayor al obtenido para cepas silvestres. Estas evidencias permitieron

proponer que el sistema GalP-Glk se encuentra involucrado en el transporte y fosforilación de la glucosa en las mutantes PTS-Glucosa⁺ (Fig. 5).

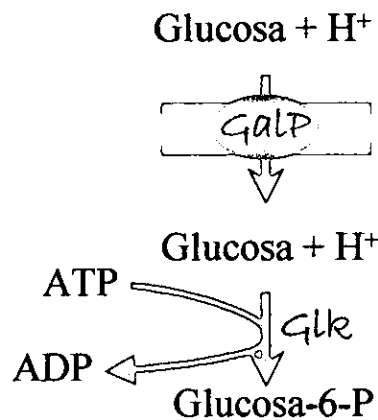


Figura 5. Sistema alternativo de transporte y fosforilación de glucosa propuesto para las mutantes PTS-Glucosa⁺.

En un fondo genético silvestre, el gen *galP* se encuentra regulado negativamente por el represor codificado por *galR* y por la presencia de glucosa: su transcripción es inducida por la presencia intracelular de galactosa. GalP es un transportador activo, utiliza la fuerza protón motriz e internaliza al carbohidrato junto con un protón. Los substratos de este transportador son galactosa, glucosa, xilosa y arabinosa, principalmente; siendo glucosa el carbohidrato por el que posee la mayor afinidad. Sin embargo, esta afinidad de GalP por glucosa no posee interés fisiológico debido a que glucosa no induce la biosíntesis del transportador de galactosa y la glucosa es transportada vía PTS.

Con respecto a la glucocinasa, se sabe que esta proteína no juega un rol determinante en la utilización de glucosa por *E. coli*, debido a que este carbohidrato es transportado y fosforilado vía PTS. Sin embargo, la utilización de disacáridos que contienen glucosa (ej. lactosa, maltosa o trealosa) involucra la formación de glucosa dentro de la célula, requiriendo su fosforilación para la utilización eficiente estos disacáridos. A pesar de ello, mutantes en el gen *glk* no aparentan tener alguna desventaja en la utilización de estos disacáridos. Por otro lado, una considerable reducción en la velocidad de crecimiento se

observa sólo cuando, adicionalmente a la mutación en *glk*, la cepa carece de la habilidad para fosforilar glucosa vía PTS. Aparentemente, la presencia de glucosa reduce la expresión del gen *glk* en un 50% y la inactivación de *fruR* incrementa muy poco su expresión (Meyer *et al*, 1997). El gene *fruR* codifica para la proteína FruR, la cuál esta involucrada en la regulación del regulón de fructosa y en gluconeogénesis.

III.2 PARTICIPACIÓN DE PTS EN LA REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE CARBOHIDRATOS.

PTS también se encuentra involucrado en la regulación de la utilización de carbono, siendo el componente IIA^{Glc} el que juega el rol principal en esta actividad. Esta molécula se puede encontrar en dos estados: fosforilado ($\text{P-IIA}^{\text{Glc}}$) y desfosforilado (IIA^{Glc}). El estado de fosforilación del componente IIA^{Glc} se determina por el balance de la vía de fosforilación P-HP_r y la vía de desfosforilación IICB^{Glc} en presencia de su sustrato (glucosa). La forma en la que esta enzima regula la asimilación de carbono es: IIA^{Glc} se une e inhibe a proteínas esenciales en el transporte ó metabolismo de varios carbohidratos, p ej. lactosa, melibiosa, maltosa y glicerol, inhibiéndose como resultado inmediato la entrada y subsecuente metabolismo de estas fuentes de carbono (Fig. 2). Este proceso de inhibición del transporte de carbohidratos es llamado "exclusión del inductor" (Levy *et al* 1990, Hogema *et al.* 1998b, Postma *et al*, 1993). Por otro lado, $\text{P-IIA}^{\text{Glc}}$ está involucrado en la activación de la adenilato ciclasa. Debido a que AMP_c es requerido para la expresión de muchos genes relacionados con catabolismo, regular el nivel de AMP_c permite controlar la síntesis de enzimas relacionadas con catabolismo (Epstein *et al*, 1975). Cuando las células están creciendo en carbohidratos no-PTS, las proteínas PTS se encuentran predominantemente en su forma fosforilada. Por el contrario, la adición de un carbohidrato PTS disminuye el estado fosforilado de las proteínas PTS, incluyendo al componente IIA^{Glc} . De esta forma se inhibe la entrada de un carbohidrato no-PTS, al existir una alta concentración del inhibidor (IIA^{Glc}) y la expresión de los genes relacionados con su catabolismo es impedida debido a la baja concentración del activador ($\text{P-IIA}^{\text{Glc}}$) (Postma *et al.* 1996).

Cepas de *E. coli* que carecen de PTS presentan una serie de efectos pleiotrópicos y no pueden crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono, incluyendo azúcares PTS y no PTS (Flores *et al.* 1996, Postma *et al.* 1996). Sin embargo, la caracterización de las mutantes PTS-Glucosa⁺ generadas por nuestro grupo ha revelado que, a pesar de la ausencia de PTS, estas cepas son capaces de utilizar otros azúcares, además de glucosa, compuestos PTS clase I (melibiosa, maltosa, glicerol y rafinosa) y clase II (intermediarios del ciclo de Krebs, xilosa, ramnosa y galactosa), los cuales se habían reportado anteriormente que no pueden ser asimilados por cepas PTS⁻ (Postma *et al.* 1996).

III.3. JUSTIFICACIÓN.

Existe una gran variedad de material orgánico (bagazo de caña, cascarilla de arroz, rastrojo y/o olote de maíz, pasto, desechos de madera, maderas suaves y duras, papel de desecho etc.) que al someterse a tratamientos de hidrólisis química ó enzimática puede liberar este tipo de mezclas de carbohidratos. Esta clase de material es una fuente de carbohidratos barata y abundante, sin embargo su uso es limitado debido que la mayoría de los microorganismos no son capaces de asimilar eficientemente estas mezclas por la regulación que existe en la asimilación de fuentes de carbono (como la llevada a cabo por PTS). Cada uno de estos materiales contiene una composición de polímeros diferente (fig. 6), por lo que los tratamientos de digestión para obtener los monómeros pueden variar dependiendo del tipo de material y de la fracción que se desee hidrolizar.

Aprovechando la capacidad que poseen estas las mutantes deficientes de PTS para utilizar otros azúcares, se decidió analizar en este trabajo una de estas mutantes de *E. coli* PTS⁻ Glucosa⁺, la cepa NF9 (Flores *et al.* 1996), la cuál utiliza los tres azúcares más abundantes en hidrolizados de maderas duras y residuos agroindustriales: D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa (Asghari *et al.* 1996, Lugar y Woolsey 1999, Sheehan y Himmel 1999, Li y Frost 1999). La decisión de utilizar este tipo de mezclas se basó en el interés que existe por disponer de fuentes de carbono baratas y abundantes para uso a escala industrial.

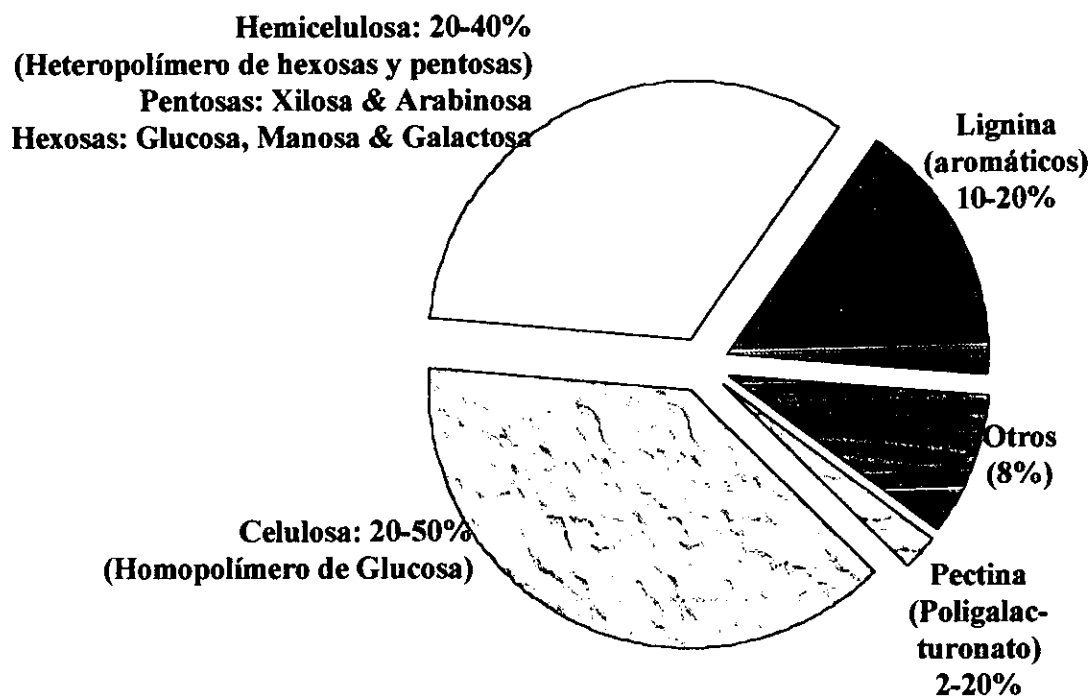


Figura 6. Composición genérica de residuos lignocelulósicos.

Para este trabajo, se realizó la evaluación tomando en cuenta sólo la fracción de hemicelulosa. Esta fracción puede ser hidrolizada en condición alcalina o ácida, a alta temperatura y presión, liberando monómeros de glucosa, arabinosa, xilosa y pequeñas cantidades de galactosa. También se han desarrollado métodos basados en cambios bruscos de presión con vapor y condiciones ligeramente alcalinas, al cuál se le conoce como explosión rápida con amonio. Sin embargo, debido a su bajo costo, se prefiere utilizar la hidrólisis ácida con ácido sulfúrico diluido, a presiones mayores a 1 atmósfera y temperaturas de 120 a 200 °C (Ingram *et al*, 1998). Uno de los procesos que emplean este tipo de tecnología es el de producción de etanol, al cual se ha dedicado un gran esfuerzo en los últimos años, por la capacidad que posee este alcohol para ser utilizado como combustible alterno o como oxigenante para gasolina.

Debido a las características del método de generación con el que se obtuvieron las primeras cepas PTS-Glucosa⁺, no se sabe con exactitud qué mutaciones ocurrieron para reconstituir el fenotipo Glucosa⁺. Por otro lado, no ha sido posible reproducir este fenotipo en todas las cepas que han sido probadas. Esto indica que el método, basado en la selección

mediante cultivo continuo, no es aplicable a todas las cepas PTS⁻. Además, al no conocerse completamente el fondo genético de las mutantes PTS-Glucosa⁺, es muy difícil poder explicar o predecir el comportamiento que presentarán. De ahí surgió la necesidad de entender el papel de las proteínas GalP y Glk dentro del fenotipo Glucosa⁺, para así establecer las bases que permitan desarrollar un proceso reproducible, que pudiera ser utilizado para obtener mutantes PTS⁻, capaces de utilizar glucosa a través de un sistema alternativo (con fondo genético conocido) a partir de cualquier cepa de *E. coli*. Para el diseño, creación y desarrollo de este nuevo método de obtención de mutantes PTS-Glucosa⁺, se consideró que al menos debían cubrirse tres requerimientos básicos: sencillez, eficiencia y reproducibilidad.

III.4 HIPÓTESIS.

Este trabajo está compuesto de dos etapas, las cuales giran alrededor del transporte y fosforilación de glucosa en *Escherichia coli*, considerando las consecuencias de no contar con el sistema de la fosfotransferasa funcional y la caracterización de un sistema alternativo a éste. A continuación se presentan las hipótesis que le dieron origen:

“Debido a la ausencia del componente IIA^{Glc} de PTS, en un fondo PTS⁻Glc⁺ no se llevará a cabo el efecto de represión catabólica por glucosa sobre el consumo de otros carbohidratos. En consecuencia, glucosa y otros carbohidratos serán consumidos simultáneamente”.

“Por otro lado, si la adquisición del fenotipo Glucosa⁺ depende exclusivamente de las actividades combinadas de GalP y Glk, es posible que en estas nuevas condiciones metabólicas (fenotipo PTS-Glucosa⁺), la glucosa sea internalizada a la célula a través de la proteína GalP y, una vez en el interior, fosforilada por la glucocinasa, por lo que el flujo de carbono hacia la glicólisis dependerá de la actividad de estas dos proteínas. En consecuencia, la velocidad de crecimiento de la bacteria depende, principalmente, de las actividades de GalP y Glk, cuando glucosa es la única fuente de carbono”.

IV



OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar el efecto de represión catabólica por glucosa sobre el consumo de otros azúcares en mutantes PTS⁻Glucosa⁺, e identificar los niveles de expresión de *glk* y *galP* requeridos para generar la capacidad de asimilación de glucosa en este tipo mutantes, soportando velocidades de crecimiento semejantes a la de la cepa parental.

OBJETIVOS PARTICULARES:

• Evaluar el crecimiento y determinar los parámetros cinéticos de la mutante PTS⁻Glucosa⁺ en cultivos con glucosa, arabinosa ó xilosa.

Con el fin de conocer los parámetros cinéticos de la mutante PTS⁻Glucosa⁺, en las condiciones utilizadas para la evaluación del consumo de mezclas de carbohidratos, este trabajo dio inicio a la caracterización de cultivos en medio mínimo, utilizando una sola fuente de carbono.

• Evaluar el efecto de la represión catabólica, ejercido por glucosa sobre el consumo de otras fuentes de carbono en una mutante de *E. coli* PTS⁻Glucosa⁺, en presencia de mezclas dobles ó triples de azúcares.

Una vez analizados los cultivos con un solo carbohidrato como fuente de carbono, y a partir de los datos obtenidos, se realizó el diseño de la composición de las mezclas de carbohidratos que permitirían observar, claramente, el efecto que la glucosa ejercía sobre el consumo de dos pentosas; xilosa y arabinosa.

• Reconstituir el fenotipo Glucosa⁺ en cepas de *E. coli* PTS⁻Glucosa⁻, mediante la expresión de los genes *glk* y *galP*.

A partir de este trabajo, se trata de comprobar si las proteínas GalP y Glk podrían reemplazar la capacidad de transporte de glucosa vía PTS. Sin embargo, había que considerar que lograr que una vía alterna de transporte y fosforilación de glucosa fuera eficiente, involucraba varios factores, discutidos a continuación.

• Modular los niveles de expresión de los genes *glk* y *galP* y determinar el efecto sobre velocidad de crecimiento en cepas de *E. coli* PTS⁻Glucosa⁻,

Para lograr la reconstitución eficiente del fenotipo Glucosa⁺ se requiere, por lo menos, una expresión adecuada del transportador que no sature a la membrana citoplasmática, pero que sea suficiente para desarrollar una velocidad de transporte que soporte una alta velocidad de crecimiento. Además, una vez que la glucosa se encuentre dentro de la célula, es necesario fosforilarla a la velocidad adecuada para que sea canalizada eficientemente, como glucosa-6P, a la glicólisis y el metabolismo celular. Si se logra obtener la combinación adecuada de estos dos factores en cepas deficientes del sistema PTS, se podrá lograr la reconstitución del fenotipo glucosa⁺ a velocidades de crecimiento similares a las obtenidas cuando se utiliza PTS para internalizar y fosforilar a la glucosa.

Para lograr esta meta se optó por la modulación de la expresión de los genes *galP* (transportador de galactosa) y *glk* (glucocinasa), utilizando un conjunto de promotores de diferente fuerza.

• Seleccionar los niveles de expresión de los genes *glk* y *galP* requeridos para obtener altas velocidades de crecimiento con cepas de *E. coli* PTS⁻ creciendo en glucosa como única fuente de carbono.

El análisis y caracterización de las mutantes PTS-Glucosa⁺ sería realizado mediante cultivos en matraz y fermentador utilizando medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono.

• Determinar la velocidad de transporte y fosforilación de glucosa para las cepas seleccionadas con las mayores velocidades de crecimiento.

V



MATERIALES Y

MÉTODOS

V.1. CEPAS BACTERIANAS, VECTORES Y MEDIOS.

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1. *E. coli* TOP10 y XL1 blue fueron utilizadas para la propagación y amplificación de los plásmidos empleados en este trabajo. *E. coli* W3110 fue el fondo genético utilizado para evaluar la sobre-expresión de los genes de glucocinasa y el transportador de galactosa, así como la reconstitución del fenotipo glucosa⁺ en presencia de la delección del operón *pts*. W3110 es una cepa silvestre de *E.coli* usada comúnmente como referencia en estudios metabólicos. Otros trabajos realizados en el laboratorio, relacionados con el presente han utilizado también esta cepa silvestre, por estas razones se escogió este genotipo para realizar éste estudio.

TABLA I. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.

| Cepas | Genotipo o fenotipo relevante | Fuente |
|----------|---|---------------------------|
| TOP10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74recA1deoR araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> . Cepa de uso general para clonación, permite la selección de colonias blancas/azules en Xgal sin IPTG. | Invitrogen, Carlsbad, CA |
| XL1 blue | <i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46</i> (Nal ^R), <i>thi, relA1, lac</i> F' <i>[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15, Tn10</i> (Tet ^R)]. Cepa transformable a altas eficiencias y deficiente en recombinación. Modifica pero no restringe el DNA transformado, por lo que se utiliza para propagar a gran escala plásmidos, fagos filamentosos y fagémidos. El F' de esta cepa permite la selección de colonias blancas/azules en XGal y permite la super-infección con el bacteriófago M13. | Colección del laboratorio |

TABLA I. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO. (CONTINUACIÓN)

| Cepas | Genotipo o fenotipo relevante | Fuente |
|--------------|--|---------------------------|
| W3110 | F ⁻ λ ⁻ INV(<i>rrnD-rrnE</i>)1 | Colección del laboratorio |
| PB103 | F ⁻ Δ <i>lacU169trpR</i> , <i>tnaA2</i> | Mascarenhas, D. 1987 |
| NF6 | PB103, Δ <i>pts::Km^R</i> , Glucosa ⁻ | Flores <i>et al.</i> 1996 |
| NF9 | PB103, Δ <i>pts::Km^R</i> , Glucosa ⁺ | Flores <i>et al.</i> 1996 |
| NF29 | JM101, Δ <i>pts::Km^R</i> , Glucosa ⁺ , Δ <i>glk::Cm^R</i> | Colección del laboratorio |
| PB12P | JM101, Δ <i>pts::Km^R</i> , Glucosa ⁺ , Δ <i>galP::Ap^R</i> | Colección del laboratorio |
| VH28 | W3110, Δ <i>galP::Tc^R</i> | Este trabajo |
| VH30 | W3110 Δ <i>pts::km^R</i> , Glucosa ⁻ | Este trabajo |
| VH31 | VH30, Δ <i>lacI</i> , <i>lacZ::Cat2</i> | Este trabajo |
| VH32 | VH30, Δ <i>lacI</i> , <i>lacZ::loxP</i> | Este trabajo |

Los vectores utilizados y generados en este trabajo se presentan en la Tabla II.

TABLA II. VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.

| Vector | Características principales | Fuente o referencia |
|---------------------------------|--|----------------------------|
| pGalP | Derivado de pT7 que lleva el gen <i>galP</i> bajo su propia región promotora | Colección del laboratorio |
| pGlk | Derivado de pT7 que lleva el gen <i>glk</i> bajo su propia región promotora | Colección del laboratorio |
| pTrc ₉₉ ^a | Derivado del vector de expresión pKK233-2 que tiene al promotor de <i>trc</i> clonado antes del sitio de clonación múltiple (MCS) y el terminador transcripcional fuerte <i>rrnB</i> | Pharmacia Biotech |

TABLA II. VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO (CONTINUACIÓN).

| Vector | Características principales | Fuente o referencia |
|-------------------|--|-----------------------------|
| PCL1920 | Derivado de pSC101 que confiere resistencia espectinomicina(50 µg/ml) en <i>Escherichia coli</i> | Lerner <i>et al.</i> , 1990 |
| pCR-Blunt II-TOPO | Este vector permite la selección directa de recombinantes vía interrupción del gen letal <i>ccdB</i> . Posee un gen que confiere resistencia a Kanamicina 50 µg/ml | Invitrogen |
| TOPOtrc1 | Igual que el pCR-Blunt II-TOPO pero con la región promotora silvestre <i>trc</i> , a este promotor se le llamará <i>trc1</i> | Este trabajo |
| TOPOtrc2 | Igual que el TOPOtrc1 pero con una mutación puntual en la caja -35 del promotor <i>trc</i> modificada mediante la técnica de PCR, la nueva secuencia es TTGACT a este promotor se le llamará <i>trc2</i> | Este trabajo |
| TOPOtrc3 | Igual que el TOPOtrc1 pero con una mutación puntual en la caja -35 del promotor <i>trc</i> modificada mediante la técnica de PCR, la nueva secuencia es TTGACG a este promotor se le llamará <i>trc3</i> | Este trabajo |
| TOPOtrc4 | Igual que el TOPOtrc1 pero con una mutación puntual en la caja -35 del promotor <i>trc</i> modificada mediante la técnica de PCR, la nueva secuencia es TTGACC a este promotor se le llamará <i>trc4</i> | Este trabajo |

TABLA II. VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO (CONTINUACIÓN).

| Vector | Características principales | Fuente o referencia |
|----------|---|---------------------|
| TOPOtrc5 | Igual que el TOPOtrc1 pero con una mutación puntual en la caja -35 del promotor <i>trc</i> modificada mediante la técnica de PCR, la nueva secuencia es TTGAAA a este promotor se le llamará <i>trc5</i> | Este trabajo |
| pvLac | Vector con origen de replicación R6K (<i>ori_v</i>) por lo que se comporta como vector suicida en cualquier cepa que no exprese en gen <i>pir</i> . Contiene la región hacia arriba del operon de lactosa y la región 3' de <i>lacZ</i> interrumpidos con el casete de resistencia a cloramfenicol <i>Cat2</i> . Este vector fue utilizado para obtener el fenotipo <i>lacI⁻</i> , <i>lacZ⁻</i> . | Este trabajo |
| pvGlk1.2 | Igual que el pTrc_99A pero con el gen <i>glk</i> clonado bajo el control del promotor <i>trc1</i> | Este trabajo |
| pvGlk2.2 | Construido a partir del pvGlk1.2, contiene la fusión del gen <i>glk</i> al promotor <i>trc2</i> | Este trabajo |
| pvGlk3.2 | Construido a partir del pvGlk1.2, contiene la fusión del gen <i>glk</i> al promotor <i>trc3</i> | Este trabajo |
| pvGlk4.2 | Construido a partir del pvGlk1.2, contiene la fusión del gen <i>glk</i> al promotor <i>trc4</i> | Este trabajo |
| pvGlk5.2 | Construido a partir del pvGlk1.2, contiene la fusión del gen <i>glk</i> al promotor <i>trc5</i> | Este trabajo |
| pvGalP1 | Igual que el pTrc_99A pero con el gen <i>galP</i> clonado bajo el control del promotor <i>trc1</i> | Este trabajo |

TABLA II. VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO (CONTINUACIÓN).

| Vector | Características principales | Fuente o referencia |
|---------------|--|----------------------------|
| pvGalP2 | Construido a partir del pvGalP1, contiene la fusión del gen <i>galP</i> al promotor <i>trc2</i> | Este trabajo |
| pvGalP3 | Construido a partir del pvGalP1, contiene la fusión del gen <i>galP</i> al promotor <i>trc3</i> | Este trabajo |
| pvGalP4 | Construido a partir del pvGalP1, contiene la fusión del gen <i>galP</i> al promotor <i>trc4</i> | Este trabajo |
| pvGalP5 | Construido a partir del pvGalP1, contiene la fusión del gen <i>galP</i> al promotor <i>trc5</i> | Este trabajo |
| pCLvGlk1.2 | Derivado de pCL1920 que contiene la fusión de <i>glk</i> al promotor <i>trc1</i> | Este trabajo |
| pCLvglk2.2 | Derivado de pCL1920 que contiene la fusión de <i>glk</i> al promotor <i>trc2</i> | Este trabajo |
| pCLvglk3.2 | Derivado de pCL1920 que contiene la fusión de <i>glk</i> al promotor <i>trc3</i> | Este trabajo |
| pCLvglk4.2 | Derivado de pCL1920 que contiene la fusión de <i>glk</i> al promotor <i>trc4</i> | Este trabajo |
| pCLvglk5.2 | Derivado de pCL1920 que contiene la fusión de <i>glk</i> al promotor <i>trc5</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP11 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc1</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc1</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP12 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc1</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc2</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP13 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc1</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc3</i> | Este trabajo |

TABLA II. VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO (CONTINUACIÓN).

| Vector | Características principales | Fuente o referencia |
|-------------|--|---------------------|
| pvGlkGalP14 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc1</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc4</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP15 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc1</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc5</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP21 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc2</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc1</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP22 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc2</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc2</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP23 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc2</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc3</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP24 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc2</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc4</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP25 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc2</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc5</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP41 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc4</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc1</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP44 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc4</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc4</i> | Este trabajo |

TABLA II. VECTORES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO (CONTINUACIÓN).

| Vector | Características principales | Fuente o referencia |
|---------------|--|------------------------------|
| pvGlkGalP51 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc5</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc1</i> | Este trabajo |
| pvGlkGalP54 | Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc5</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc4</i> | Este trabajo |
| pLOI1594 | Derivado de pUC19 que contiene los genes <i>pdz</i> y <i>adhB</i> bajo la regulación de la región <i>P_{xm4}</i> | Martinez <i>et al</i> , 1999 |

Medios: YENB empleado para electroporaciones y selección (Sharma y Schimke, 1996); Luria/Cb (200 µg/ml); Luria/Spec (50µg/ml), LB/glc (15 g/l de glucosa) (Maniatis et al. 1989); M9-triptona, (sales M9 suplementado con triptona 1%), empleados para desarrollar inóculos; M9-Glc (sales M9 suplementadas con glucosa al 0.2%, de ser necesario con Cb 50 µg/ml o Spec 50 µg/ml o Km 33 µg/ml) utilizado para ensayos enzimáticos, curvas de crecimiento, mediciones de transporte (Maniatis et al. 1989); M9-Ara (sales M9 suplementadas con arabinosa al 0.2%) utilizado para curvas de crecimiento; M9-Xyl (sales M9 suplementadas con xilosa al 0.2%) utilizadas para curvas de crecimiento y mediciones de transporte. Para cultivos con mezclas de carbohidratos se utilizó M9 suplementado con 0.1% de cada azúcar.

V.2. PROCEDIMIENTOS GENÉTICOS Y TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE.

Todas las enzimas de restricción, DNA ligasa y DNA polimerasa del fago T4, primers y marcadores de tamaño de fragmentos de DNA fueron obtenidos de New England BioLabs (Beverly, MA, USA), Boehringer Mannheim GmbH (Ottweiler, Germany) o Gibco-BRL

(Life Technologies, Rockville, MD, USA) y se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Todos los demás reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Química (Steinheim, Germany), Research Organics Inc (Cleveland, OH, USA), Merck-México (Darmstadt, Alemania) y Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). Todas las manipulaciones de DNA, por lo general, se realizaron como se describen en Maniatis *et al.* (1989).

Reacciones de ligación: Para la mayoría de las reacciones de ligación se utilizó el kit rapid DNA ligation (Boehringer Mannheim GmbH, Ottweiler, Germany).

Transformación de DNA. En los experimentos de clonación, el DNA plasmídico se introdujo en *E. coli* por el método de transformación química estándar con CaCl_2 , pero en la mayoría de los casos se utilizó el método de electro-transformación (Sharma y Schimke, 1996).

Purificación de DNA. Para el análisis de las clonas recombinantes, el DNA de plasmídico se preparó por medio del método de lisis alcalina (Rodriguez and Tait, 1983) ó con QIAGEN Mini-isolation kit (Qiagen, Sta. Clarita, CA, USA) como lo describen los fabricantes. Para los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA se extrajeron de geles preparativos de agarosa utilizando QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, Sta. Clarita, CA, USA) ó por el método de destrucción-congelación del fragmento de agarosa con la banda de DNA de interés y posterior extracción con fenol y cloroformo. El DNA cromosomal se extrajo de cultivos de toda la noche (Pospiech y Neumann, 1996).

PCRs. Las reacciones de la polimerasa en cadena se realizaron utilizando Taq-DNA polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Ottweiler, Germany) ó Pwo DNA polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Ottweiler, Germany). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 50 μl , con los siguientes reactivos: 50 ng de DNA templado, 1 pmol de cada oligonucleótido iniciador, 0.2 mM de mezcla de dNTPs, 1.6 mM de CaCl_2 y 1-2 unidades de DNA polimerasa. Para el proceso de amplificación las mezclas se incubaron en Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Pomona, CA, USA) siguiendo

un método de tres etapas: 1ra. Un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C durante 3-5 min; 2a. De 25-30 ciclos de amplificación, cada uno con un paso de desnaturalización, alineamiento y polimerización cuyos parámetros de temperatura y duración fueron determinados para cada caso; 3ra. Un ciclo de extensión final de 10 minutos a la temperatura óptima de la polimerasa que se usó (70°C para Pwo ó 72°C para Taq).

Construcción de la librería de promotores de *trc*. Los genes *glk* y *galP* se fusionaron al promotor *trc* en un vector comercial (pTrc_99A), a estas construcciones se les dio el nombre de: pTrcGlk y pTrcGalP. Usando como templado los vectores pTrcGlk y pTrcGalP se empleo el Kit Quik Change Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA), para obtener los 4 promotores mutantes fusionados a ambos genes (*glk* y *galP*). A cada construcción se le dio un nombre similar a los plásmidos que les dieron origen (pvGlk y pvGalP) mas un número al final que designa el promotor que poseen(1,2,3,4,5).

Con la finalidad de facilitar la manipulación posterior de los vectores con las fusiones a *glk*, se decidió eliminar algunos sitios de restricción mediante una digestión con *Sal* I, ligando el vector sobre sí mismo se perdieron los sitios de *Acc* I, *Fbl* I, *Psh* AI, *Nde* I, *Bcu* I, *Bcu* I, *Spe* I y *Bcu* I. Para designar el nombre de estos vectores, solo se agregó un .2 a los nombres anteriores, por ejemplo el vector pvGlk1 después de haber sido digerido con *Sal* I y ligado sobre sí mismo, se le llamó pvGlk1.2. (Tabla II).

Determinación de la Secuencia de nucleótidos. Se realizó secuenciación automatizada usando ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Pomona, CA, USA).

V.3. CONDICIONES DE CULTIVO.

Preparación de los inóculos para los cultivos con mezclas de carbohidratos: Una asada de células provenientes de congelado en glicerol se inoculó en 25 ml de sales M9 (sin casamino ácidos) suplementado con 1% de triptona en matraces de 250 ml incubados a 37

°C en una agitadora orbital a 270 rpm (G25, New Brunswick Inc., NJ). Se adicionó Kanamicina (33 µg/ml) a todos los cultivos de la cepa NF9.

Preparación de los inóculos para los cultivos de cepas sobre-expresadoras de *glk* y *galP*: Células provenientes de un congelado en glicerol fueron utilizadas para inocular cajas petri con agar M9-Glc (suplementadas con Spec 50 µg/ml, de ser necesario). Las células obtenidas en estas cajas fueron utilizadas para inocular matraces de 250 ml con 50 ml de medio M9-Glc, de ser el caso con 50 µg/ml de Spec, incubados por 12 h en una agitadora orbital (G25, New Brunswick Inc., NJ) a 270 rpm y 37 °C.

Preparación de los inóculos para los cultivos de cepas productoras de etanol: Se utilizaron células provenientes de un congelado en glicerol para inocular cajas petri con agar LB-Glc (suplementadas con Spec 50 µg/ml y/o Ap 200 µg/ml, de ser necesario). Las células obtenidas en estas cajas fueron utilizadas para inocular matraces fernbach con 600 ml de medio LB-Glc, de ser el caso con 50 µg/ml de Spec y/o Ap 200 µg/ml, incubados por 12 h en una agitadora orbital (Aquatherm, New Brunswick Inc., NJ) a 180 rpm y 30 °C.

Cultivos en matraz: Las células obtenidas en el matraz de inóculo fueron utilizadas para sembrar matraces de 250 ml con 50 ml de medio M9-Glc ajustando a una densidad óptica de 0.05 aproximadamente, incubados en una agitadora orbital (G25, New Brunswick Inc., NJ) a 270 rpm y 37 °C.

Cultivos en fermentador: 1 litro de M9 suplementado con 2.0 g/l de azúcar (o 1.0 g/l de cada azúcar para las mezclas) fue usado para realizar los cultivos en fermentador. Se empleó un fermentador tipo tanque agitado, equipado con 2 mamparas (1 cm) y una turbina tipo Rushton de seis paletas, controlado por el equipo BLSL Biolafitte Maestro. Las condiciones de cultivo fueron 600 rpm, 1 vvm, 37°C y pH 7 (controlado por adiciones automatizadas de NH₄OH al 2.5 %). Todos los cultivos fueron iniciados a una DO₆₀₀ de 0.05.

Cultivos aerobios para evaluar la producción de etanol en fermentador. 1.5 litros de LB suplementado con 15.0 g/l de glucosa (suplementadas con Spec 50 µg/ml y/o Ap 200

µg/ml, de ser necesario) fueron usados para realizar los cultivos en fermentador. Se empleó un fermentador tipo tanque agitado, equipado con 2 mamparas (1 cm) y una turbina tipo Rushton de seis paletas. Las condiciones de cultivo fueron 600 rpm, 1 vvm, 30°C, pH 6 (controlado por adiciones automatizadas de KOH 2N) y oxígeno disuelto no menor a 20%. Todos los cultivos fueron iniciados a una DO₆₀₀ de 1.

Cultivos anaerobios para evaluar la producción de etanol en fermentador. 200 ml de LB suplementado con 15 g/l de glucosa (suplementadas con Spec 50 µg/ml y/o Ap 200 µg/ml, de ser necesario) fueron empleados para realizar los cultivos en minifermentadores (fleakers) (Ingram *et al.* 1991) a 30 °C y pH 6.0 (controlado por adiciones de KOH 2 N). Todos los cultivos fueron iniciados con DO₆₀₀ de 1.

V.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Ensayos enzimáticos de Glk: Esta técnica fue realizada como se describe por Lessie, T.G. et al (1972). La actividad se mide acoplando la producción glucosa-6-fosfato a la reducción de NADP en presencia de ATP y ZWF (glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa).

Determinación de proteína: La determinación de proteína en las muestras para ensayos enzimáticos fue realizada usando el reactivo comercial de PIERCE (USA), el cuál se basa en la tinción de proteínas por azul de Comassie.

Determinación de biomasa. La densidad óptica fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro (Lambda 11 Perkin Elmer, Pomona, CA). La DO₆₀₀ fue convertida a peso seco usando la siguiente relación: 1 DO = 0.37 g/l de biomasa seca. Los datos presentados en los gráficos representan el promedio de dos fermentaciones.

Determinación de azúcares. La glucosa fue determinada con un analizador enzimático (EKTACHEM DT60 II multiple analyzer, Kodak, NY) ó mediante el empleo de HPLC usando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Biorad, Hercules CA), y H₂SO₄ 5

mM como fase móvil (0.5 ml/min) a 50°C. La xilosa fue analizada por HPLC usando una columna Waters Amino carbohydrate (WAT044355, Waters, Milford, MA) y acetonitrilo, 80% en agua, como fase móvil (1.4 ml/min) a 28 °C. Se determinaron azúcares totales mediante la técnica del ácido dinitrosalisílico (DNS) (Chaplin and Kennedy 1987) y la arabinosa fue calculada por diferencia de los datos obtenidos con las otras técnicas.

Determinación de acetato. La concentración de acetato fue determinada por HPLC usando una columna ROA-organic acid (300 x 7.8 mm, OOH-0138-KO, Phenomenex, Torrance, CA) ó Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Biorad, Hercules CA), y H₂SO₄ 5 mM como fase móvil (0.5 ml/min) a 50°C.

Determinación de etanol. La concentración de etanol fue determinada por HPLC usando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm, Biorad, Hercules CA), y H₂SO₄ 5 mM como fase móvil (0.5 ml/min) a 50°C.

V. 5. MEDICIONES DE TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS.

Mediciones de transporte de [¹⁴C]-glucosa. Todas las cepas fueron cultivadas por 12 h en medio mínimo M9 suplementado con 2 g/l de glucosa a 37°C y 270 rpm en una incubadora orbital (G25, New Brunswick Inc., NJ). Estos cultivos fueron utilizados para inocular matraces de 250-ml con 50 ml de M9 suplementado con 2 g/l de glucosa a una DO₆₀₀ inicial de 0.3 y crecidos por 2 h a 37°C con agitación de 270 rpm. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 5000 g por 10 min a 4°C, manteniéndose siempre en hielo a partir de este momento, se lava la pastilla celular con sales M9 y resuspenden en el mismo medio a 1.0 DO₆₀₀. Para realizar los ensayos de transporte, 540 µl del concentrado celular fueron incubados por 10 min a 37°C, la reacción fue iniciada por adición, al concentrado celular, de 30 µl de [¹⁴C]-glucosa (1 mM, 5 mCi/mmol) y 30 µl de sales M9 (para ajustar el volumen final de reacción). La reacción fue mantenida en incubación a 37°C con agitación, tomando muestras de 50 µl a 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15 y 20 minutos a partir de que se inició la reacción. Por último, las muestras fueron filtradas inmediatamente usando membranas con un

tamaño de poro de 0.45 μm , lavándose tres veces con sales M9. Los filtros secos fueron colocados en viales de centelleo con 5 ml de fluido de centelleo (Ecolite scintillation cocktail, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA). La radioactividad fue medida con un contador de centelleo. Las velocidades de transporte de [^{14}C]-glucosa fueron calculadas con los datos lineales iniciales de una gráfica de [^{14}C]-glucosa intracelular *vs* tiempo.

Mediciones de transporte de [^{14}C]-xilosa. Estas mediciones fueron realizadas de la misma forma que las de glucosa, excepto por el medio en el que se crecieron las células. En este caso se utilizó M9 suplementado con xilosa (2 g/l) para los cultivos 12 h y M9 suplementado con glucosa (2 g/l) para el crecimiento de dos horas. El volumen de [^{14}C]-xilosa utilizada en las reacciones de transporte fue de 30 μl de [^{14}C]-xilosa (1 mM, 5mCi/mmol). Mientras que para las reacciones de competencia con glucosa se agregó la misma cantidad de xilosa y 30 μl de glucosa no radioactiva (10 mM).

VI



VI.1. PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Este trabajo esta compuesto de dos etapas ligadas íntimamente, debido a que ambas giran alrededor del transporte y fosforilación de glucosa en *Escherichia coli*. Sin embargo, con el fin de lograr una mayor claridad en la presentación de los resultados, ésta se llevará a cabo en varias secciones.

En la primera sección, se presenta la caracterización del efecto de represión catabólica por glucosa en la asimilación de mezclas de glucosa y pentosas por las mutantes de *Escherichia coli* PTS⁻ aisladas por Flores *et al* (1996), para lo cual se realizaron cultivos en medio mínimo suplementado con glucosa, arabinosa y xilosa. La asimilación de estos carbohidratos fue analizada agregando uno solo o mezclas de ellos al medio de cultivo.

En la segunda sección, se llevó a cabo el diseño de un sistema de expresión transcripcional que permitiera la modulación de los genes necesarios para la reconstitución del fenotipo glucosa⁺. Este sistema se creó pensando en su aplicación para la expresión de diferentes genes con diferentes objetivos. Con el cuál es posible obtener expresión transcripcional constitutiva ó expresión inducible a diferentes niveles dependiendo del fondo genético que se emplee.

En la tercera sección, se desarrolló y caracterizó el sistema alternativo de transporte y fosforilación de glucosa vía GalP-Glk, aplicando el conjunto de promotores diseñados para la expresión de los genes *glk* y *galP*. Se analizó el desempeño de las mutantes deficientes del sistema de transporte de la fosfotransferasa, al utilizar GalP y Glk para internalizar y fosforilar glucosa creciendo en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono.

La cuarta y última sección consistió en evaluar la capacidad de estas mutantes para desviar el flujo de carbono hacia la producción de un compuesto de interés como etanol, mediante la realización de cultivos en fermentador y la cuantificación de la producción de este alcohol en medio LB suplementado con 15 g/l de glucosa. Estos cultivos fueron realizados en condiciones aereadas y no aereadas.

VI.2. PRIMERA SECCIÓN: CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES PTS-GLUCOSA+ GENERADAS POR FLORES ET AL (1996).

VI.2.1. Cinéticas de crecimiento de las cepas PTS+ y PTS-Glucosa+ utilizando como fuente de carbono glucosa, arabinosa o xilosa. Con el fin de determinar los parámetros cinéticos de las cepas PTS+ y PTS-Glucosa+ en cultivos tipo lote, en presencia de un solo azúcar, se realizaron cultivos en medio mínimo M9 suplementado con uno de los tres azúcares siguientes: glucosa, arabinosa ó xilosa (Fig.7, 8 y 9). La evaluación de estos cultivos se realizó calculando los siguientes parámetros cinéticos: rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), velocidad específica de crecimiento (μ) y velocidad específica de consumo de sustrato (q_s). En la Tabla III se muestra un resumen de estos parámetros.

Comparando los valores obtenidos para la cepa PTS+, creciendo en glucosa, con los generados en cultivos con arabinosa y xilosa, encontramos que la velocidad específica de crecimiento en arabinosa fue 14 % mayor, mientras que con xilosa fue 12 % menor, con respecto a la de glucosa y, de forma relevante, el rendimiento biomasa/sustrato se incrementó para ambas pentosas: 22 % para arabinosa y 41% para xilosa.

Tabla III. Parámetros cinéticos para cultivos de las cepas PTS+ y PTS-Glucosa+ creciendo en medio mínimo suplementado con un carbohidrato como fuente de carbono*.

| Azúcares | PTS+ | | | PTS-Glucosa+ | | |
|-----------|--|--|---|--|--|---|
| | Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹) | Rendimiento biomasa-sustrato (g _{biomasa} /g _s) | Velocidad específica de consumo de sustrato (g _s /g _{biomasa} .h) | Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹) | Rendimiento biomasa-sustrato (g _{biomasa} /g _s) | Velocidad específica de consumo de sustrato (g _s /g _{biomasa} .h) |
| Glucosa | 0.42 | 0.32 | 1.28 | 0.36 | 0.31 | 1.15 |
| Arabinosa | 0.48 | 0.39 | 1.25 | 0.42 | 0.5 | 0.84 |
| Xilosa | 0.37 | 0.45 | 0.89 | 0.34 | 0.36 | 0.94 |

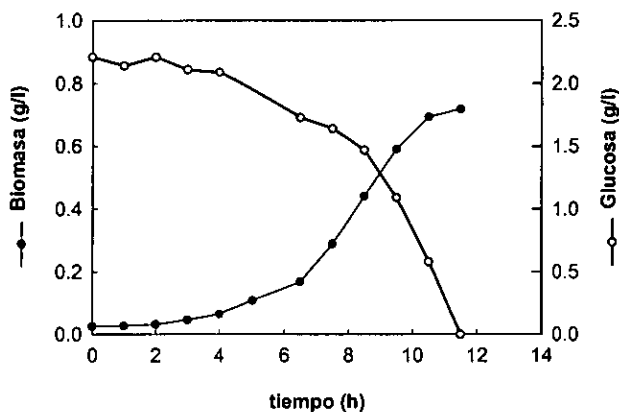
*Las concentraciones iniciales de glucosa, arabinosa y xilosa fueron de 2 g/l.

S es sustrato: glucosa, arabinosa ó xilosa.

La misma comparación fue realizada para la cepa PTS-Glucosa+: al igual que en la cepa silvestre, encontramos un incremento del 17% en la velocidad de crecimiento

utilizando arabinosa con respecto al cultivo con glucosa y un decremento del 6% para el cultivo de xilosa es importante resaltar que, en el caso del $Y_{x/s}$, este se incrementó en un 61% para arabinosa y 16% para xilosa; finalmente, las q_s fueron 27% y 18% menores para arabinosa y xilosa, con respecto al de glucosa.

A) PTS⁺



B) PTS⁻Glc⁺

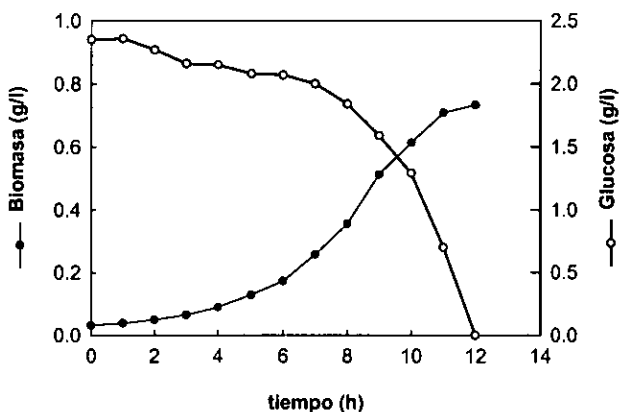
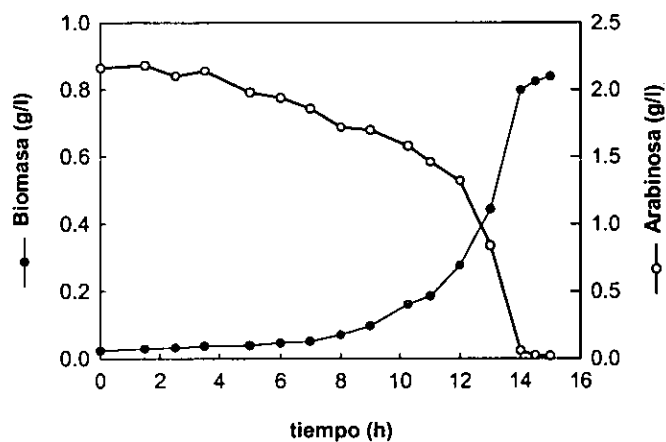


Figura 7. Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para las cepas PTS⁺ y PTS⁻ Glucosa⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con glucosa.

A) PTS⁺



B) PTS⁻Glc⁺

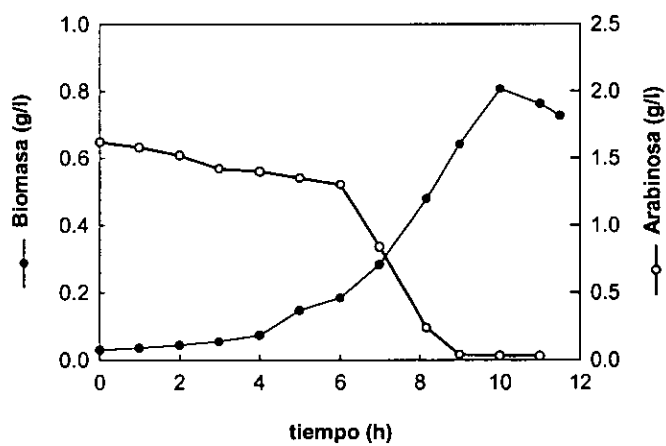
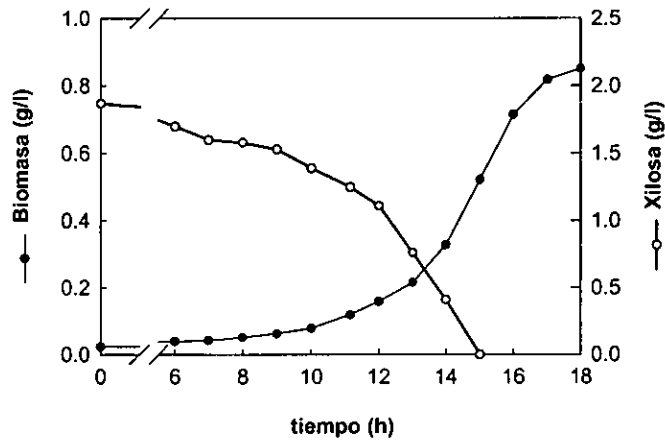


Figura 8. Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para las cepas PTS⁺ y PTS⁻ Glucosa⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con arabinosa. En el segundo gráfico se inicia con una concentración menor de arabinosa debido a un error experimental.

A) PTS⁺



B) PTS⁻Glc⁺

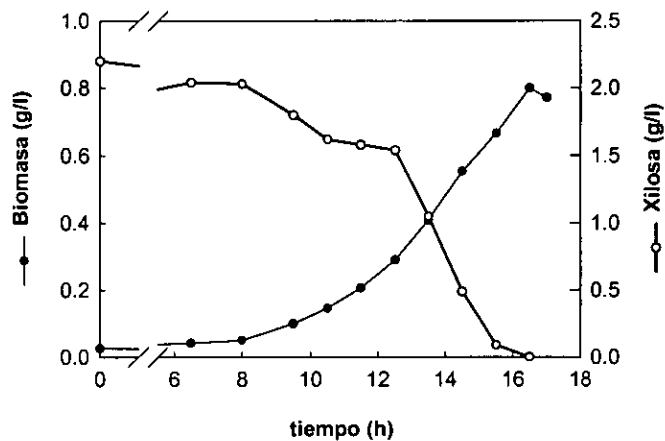


Figura 9. Cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para las cepas PTS⁺ y PTS⁻ Glucosa⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con xilosa.

La comparación entre las dos cepas, en los diferentes medios de cultivo, permitió establecer que la velocidad de crecimiento de la mutante fue menor que la de la cepa

silvestre en los tres sustratos, disminuyendo en un 14 %, 12 % y 8 % para glucosa, arabinosa y xilosa, respectivamente. El $Y_{x/s}$ para arabinosa fue aún mayor que el encontrado para la cepa PTS⁺ con esta pentosa específicamente, se observó un incremento del 28% por otro lado, se encontró un decremento en el valor obtenido para glucosa y xilosa, de 3 % y 20 %, respectivamente. Finalmente, la velocidad de consumo de azúcar para la mutante fue 10 % y 33 % menor para glucosa y arabinosa, mientras que con xilosa se incrementó en un 6 % con respecto a los valores obtenidos para la cepa silvestre.

VI.2.2. Cinéticas de crecimiento para las cepas PTS⁺ y PTS-Glucosa⁺ en presencia de mezclas dobles de azúcares: glucosa-arabinosa y glucosa-xilosa. Los cultivos con dos azúcares fueron realizados con el fin de evaluar el efecto de represión que la glucosa ejerce sobre el consumo de arabinosa o xilosa en la cepa PTS-Glucosa⁺. Como control, se realizaron cultivos de la cepa silvestre PTS⁺ (PB103) bajo las mismas condiciones. Los parámetros cinéticos muestran que la velocidad de crecimiento y el consumo específico de azúcar, obtenidos durante el periodo de asimilación de glucosa son prácticamente iguales a los encontrados en cultivos con un solo azúcar (Tabla IV). Sin embargo, para esta etapa, el rendimiento de biomasa fue mayor al obtenido para cultivos con un solo azúcar. Inesperadamente, los valores de velocidad de crecimiento, velocidad de consumo de azúcar y rendimiento para la segunda etapa de los cultivos dobles fueron en promedio 35%, 23% y 19% menores a los valores obtenidos para sus respectivos cultivos con un solo azúcar. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de acetato acumulado durante el metabolismo de la glucosa.

En cultivos de la cepa PTS-Glucosa⁺ no se observaron fases lag, lo que sugería el consumo simultáneo de ambos azúcares. Midiendo el consumo de los azúcares, se demostró la inexistencia del efecto represor por glucosa en cultivos de la cepa PTS-Glucosa⁺ creciendo en presencia de glucosa y arabinosa, ya que ambos azúcares fueron asimilados simultáneamente. Sin embargo, esta mutante aún presenta represión parcial por glucosa sobre el consumo de xilosa y, en cierto grado, retardamiento en el consumo de esta pentosa. Las velocidades de consumo de glucosa y arabinosa fueron similares; sin embargo, la velocidad de consumo de xilosa fue significativamente menor a la obtenida para glucosa en cultivos de la mezcla de glucosa-xilosa. Con respecto a la producción de acetato, para las

mezclas de glucosa-arabinosa su acumulación se inicia después de 4 h de crecimiento, alcanzando una concentración final de 0.25 g/l. Mientras que en mezclas de glucosa-xilosa, la acumulación de acetato se inicia después de 9 h de crecimiento alcanzando una concentración máxima de 0.04 g/l.

La Tabla IV presenta un resumen de los parámetros cinéticos para los cultivos realizados con mezclas dobles. De forma interesante, la cepa PTS-Glucosa⁺ muestra en ambos cultivos una sola velocidad específica de crecimiento para toda la fermentación. El co-metabolismo de glucosa y arabinosa permitió lograr una alta velocidad de crecimiento (0.52 h⁻¹), la cuál es 21 % mayor a la obtenida con la cepa PTS⁺ metabolizando glucosa en cultivos con un solo azúcar o en las combinaciones dobles; por otro lado, en la mezcla de glucosa-xilosa la mutante creció a una velocidad igual a la desarrollada por la cepa PTS⁺, metabolizando glucosa en cultivos con un solo azúcar.

Tabla IV. Parámetros cinéticos para cultivos de las cepas PTS⁺ y PTS-Glucosa⁺ creciendo en medio mínimo suplementado con dos o tres carbohidratos como fuente de carbono.

| Azúcar | PTS ⁺ | | | PTS-Glucosa ⁺ | | |
|-------------|---|--|---|--|--|---|
| | Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹) | Rendimiento biomasa-sustrato (g _{biomasa} /g _s) | Velocidad específica de consumo de sustrato (g _s /g _{biomasa} .h) | Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹) | Rendimiento biomasa-sustrato (g _{biomasa} /g _s) | Velocidad específica de consumo de sustrato (g _s /g _{biomasa} .h) |
| Glc-Ara | 0.43 _{Glc} 0.33 _{Ara} | 0.39 _{Glc} 0.32 _{Ara} | 1.09 _{Glc} 1.04 _{Ara} | 0.52 | 0.49 _{Glc} | 1.06 _{Glc + Ara} |
| Glc-Xyl | 0.48 _{Glc} 0.23 _{Xyl} | 0.42 _{Glc} 0.32 _{Xyl} | 1.14 _{Glc} 0.71 _{Xyl} | 0.42 | 0.55 | 0.77 _{Glc + Xyl} |
| Glc-Ara-Xyl | 0.47 _{Glc} 0.51 _{Ara + Xyl} 0.17 _{Xyl} | 0.6 _{Glc} 0.3 _{Ara + Xyl} 0.6 _{Xyl} | 0.78 _{Glc} 1.5 _{Ara + Xyl} 0.28 _{Xyl} | 0.54 _{Glc + Ara} 0.26 _{Xyl} | 0.5 _{Glc + Ara} 0.41 _{Xyl} | 1.1 _{Glc + Ara} 0.65 _{Xyl} |

VI.2.3. Cinéticas de crecimiento para cultivos de las cepas PTS⁺ y PTS-Glucosa⁺ en presencia de la combinación triple de azúcares: glucosa, arabinosa y xilosa. Para analizar el comportamiento de la cepa PTS-Glucosa⁺ en presencia de mezclas de los

azúcares más abundantes en los hidrolizados hemicelulósicos, se realizaron cultivos en presencia de glucosa, arabinosa y xilosa con la cepa mutante y la silvestre (PTS⁺) que le dio origen. Claramente y de forma similar a como se observó en los experimentos con mezclas dobles, la cepa PTS⁺ (silvestre) consume secuencialmente los sustratos debido a la represión que la glucosa ejerce sobre el consumo de otros azúcares. En contraste, debido a la inexistencia de la represión catabólica en la cepa PTS-Glucosa⁺, la glucosa y la arabinosa fueron asimiladas simultáneamente. Sin embargo, la xilosa es asimilada hasta que glucosa y arabinosa desaparecen del medio (Figura 10).

Para cultivos de la cepa PTS⁺, los carbohidratos totales fueron consumidos después de 13 h (**Figura 10B**). Se calcularon tres velocidades específicas de crecimiento (μ), una para cada etapa de asimilación de carbohidrato: 0.47 h⁻¹ para glucosa, 0.51 h⁻¹ para arabinosa-xilosa y 0.17 h⁻¹ para xilosa (Tabla IV). La velocidad de crecimiento con glucosa en esta mezcla fue similar al valor obtenido para cultivos con solo glucosa; la segunda velocidad de crecimiento, fue calculada para el periodo de asimilación de las pentosas y es ligeramente mayor a los valores obtenidos para cultivos de un solo azúcar, mientras que la tercera velocidad de crecimiento es significativamente menor a la obtenida en cultivos con solo xilosa, probablemente por la presencia del acetato acumulado durante la primera parte de la fermentación (0.28 g/l).

En contraste, en cultivos de la cepa PTS-Glucosa⁺ bajo las mismas condiciones, la mezcla de carbohidratos fue consumida en 11 h en solo dos periodos de consumo (**Figura 10C**), uno para glucosa y arabinosa creciendo a 0.54 h⁻¹, y el otro para xilosa creciendo a 0.26 h⁻¹ (Tabla IV). Es interesante observar que la velocidad de crecimiento para el primer periodo fue significativamente mayor que los valores obtenidos para los cultivos con glucosa o arabinosa por separado y la velocidad de crecimiento para xilosa fue considerablemente menor a la calculada para cultivos con solo xilosa, al igual que para la cepa PTS⁺ esto puede deberse a la presencia de acetato (0.45 g/l).

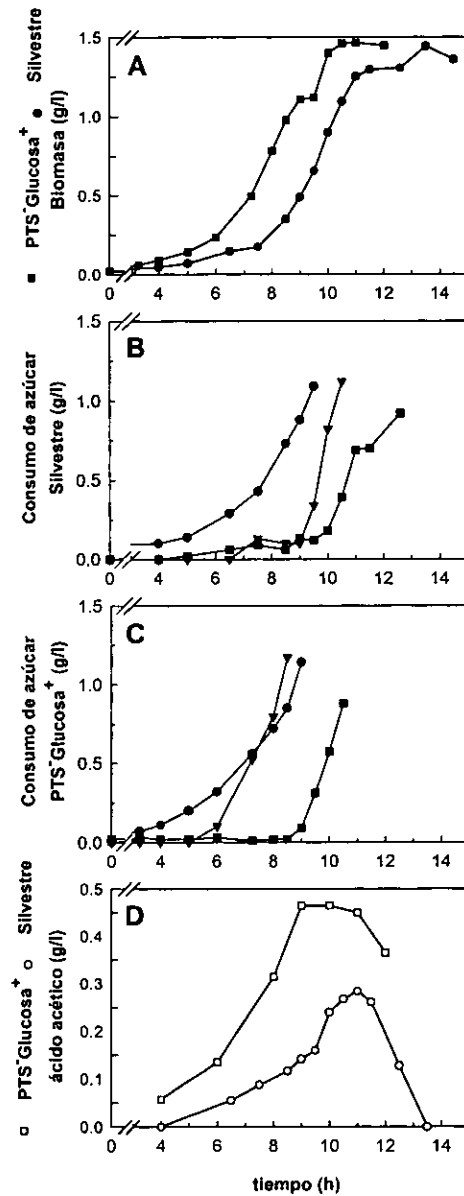


Figura 10: Cinéticas de crecimiento de las cepas silvestre y la mutante PTS-Glucosa⁺ realizadas en presencia de una mezcla triple de glucosa, arabinosa y xilosa. La concentración inicial de cada azúcar fue 1 g/l. **A** curvas de crecimiento; **B,C** consumo de azúcar de las cepas silvestre y PTS-Glucosa⁺. (●) glucosa, (▼) arabinosa y (■) xilosa; **D** acumulación de ácido acético.

El tiempo de fermentación total para esta mutante es 16% menor que el de la cepa silvestre, debido a que mantiene velocidades de crecimiento mayores durante la fermentación. Con respecto a la velocidad de consumo específico de azúcar para el periodo de asimilación de glucosa-arabinosa se obtuvo el mismo valor que el de la mezcla doble correspondiente y la velocidad de consumo para xilosa fue significativamente menor a la obtenida para cultivos con xilosa sola. Por otro lado, el rendimiento de biomasa para los azúcares totales fue en promedio similar para ambas cepas ($0.45 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{azúcares totales}}$).

VI.2.4. Transporte de [^{14}C]-xilosa en presencia y ausencia de glucosa para las cepas PTS⁺, PTS-Glucosa⁻ y PTS-Glucosa⁺. Los cultivos fueron iniciados en medio mínimo (M9) suplementado con xilosa para inducir los sistemas de transporte de esta pentosa, siendo posteriormente transferidos a medio M9 con glucosa para inducir el efecto de represión catabólica. Las velocidades de transporte de xilosa medidas en ausencia de glucosa para las cepas PTS⁺, PTS-Glucosa⁻ y PTS-Glucosa⁺ fueron 7.2 ± 0.65 , 7.4 ± 0.54 y $9.9 \pm 0.75 \text{ nm}_{\text{Xyl}} / \text{mg}_{\text{prot}}\text{min}$, respectivamente. En contraste, en presencia de glucosa no radiactiva ($500 \mu\text{M}$), las velocidades iniciales de transporte de [^{14}C]-xilosa disminuyeron a 2.0 ± 0.17 , 4.9 ± 0.19 y $3.1 \pm 0.19 \text{ nm}_{\text{Xyl}} / \text{mg}_{\text{prot}}\text{min}$, respectivamente. Como muestran estos resultados, la glucosa inhibe el transporte de [^{14}C]-xilosa aún en cepas que carecen de PTS. Los experimentos descritos previamente también mostraron que el transporte de [^{14}C]-xilosa, en ausencia de glucosa, para la cepa PTS-Glucosa⁺ ($9.9 \text{ nm}_{\text{Xyl}} / \text{mg}_{\text{prot}}\text{min}$) fue significativamente mayor (36%) a la observada para las cepas PTS⁺ y PTS-Glucosa⁻.

VI.2.5. Transporte de [^{14}C]-xilosa en una cepa PTS-Glucosa⁻ con el gen *galP* sobre-expresado. La presencia de una copia funcional del gen *galP* en el cromosoma es necesaria para que glucosa sea consumida rápidamente por esta mutante PTS-Glucosa⁺ (Flores *et al.* 1996), sugiriendo con esto que GalP es el principal transportador involucrado en el consumo de glucosa por la cepa PTS-Glucosa⁺. Para probar si GalP estaba involucrado en el incremento de la velocidad inicial de consumo de [^{14}C]-xilosa observado para la cepa PTS-Glucosa⁺, se transformó a la cepa parental PTS-Glucosa⁻ con el plásmido que contiene el gen *galP* bajo el control del promotor *trc* (pCLvGalP1). La cepa obtenida después de esta transformación (PTS-Glucosa⁻/pCLvGalP1) fue crecida usando solo glucosa como fuente de

carbono con la finalidad de evitar la inducción del sistema de transporte de xilosa. Estas células fueron utilizadas para los experimentos de medición de transporte de xilosa en ausencia de glucosa: la velocidad de transporte de xilosa calculada para esta cepa fue igual a la obtenida por la cepa PTS-Glucosa⁺ (9.4 nm_{xil} / mg_{prot}min).

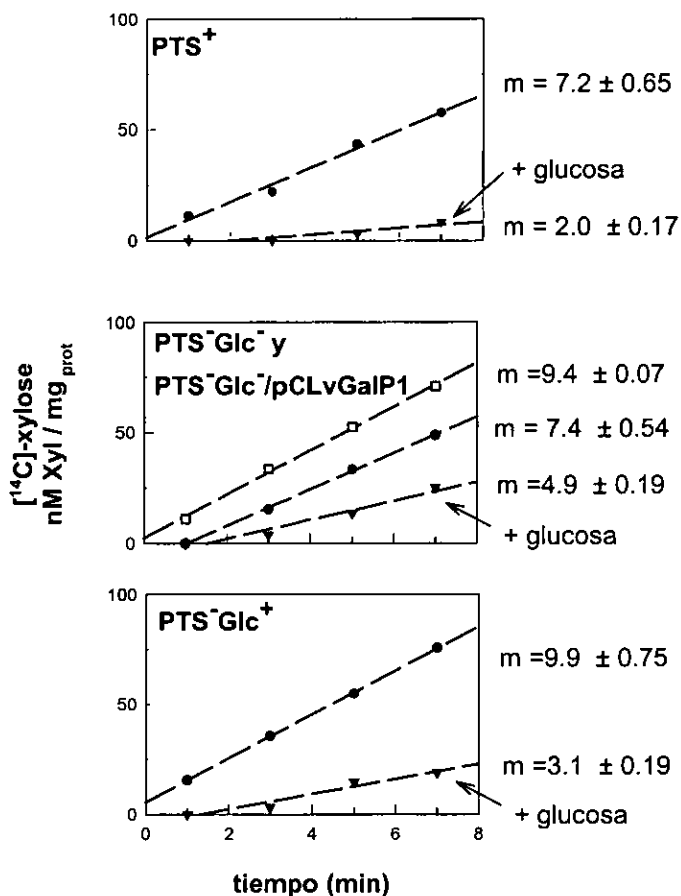


Figura 11. Transporte de azúcar por las cepas PTS⁺, PTS-Glucosa⁻, PTS-Glucosa⁻/pCLvGalP1 y PTS-Glucosa⁺. (●) transporte de xilosa; (▼) transporte de xilosa en presencia de glucosa. (□) transporte de xilosa para la cepa PTS-Glucosa⁻/pCLvGalP1. La concentración inicial de [¹⁴C]-xilosa en los ensayos fue de 50 μM. Para los experimentos de competencia con glucosa se utilizó una concentración inicial de glucosa no radioactiva de 500 μM.

VI.3. SEGUNDA SECCIÓN: DISEÑO DE UN SISTEMA CAPAZ DE MODULAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES EN *ESCHERICHIA COLI*.

Actualmente se dispone de varios sistemas de expresión que permiten modular la transcripción de un gen. Entre ellos se pueden encontrar sistemas cuya expresión es regulada utilizando diferentes concentraciones de inductor, por ejemplo el sistema *lac*, (Jensen et al, 1993) el cual ha sido ampliamente usado, pero ofrece una serie de desventajas p.ej: el uso de IPTG como inductor, porque es un reactivo caro y tóxico para algunas cepas. Por otro lado, es difícil lograr un nivel de expresión genética continua durante el crecimiento. Otro sistema que ha sido desarrollado, son los promotores constitutivos que eliminan el uso de inductores. En este caso la fuerza del promotor fue modulada manipulando mediante mutagénesis al azar la distancia que existe entre las cajas consenso -35 y -10 (Jensen y Hammer, 1998), pero para encontrar el nivel de expresión requerido, se tuvieron que analizar un gran número de mutantes, lo que incrementa el tiempo y costo del trabajo en laboratorio. Considerando estas limitaciones, nos propusimos desarrollar un sistema de control genético con el cual fuera posible detectar el nivel de expresión adecuado en menor tiempo y también evitar el uso de inductor.

Esta propuesta se basa en la creación de un conjunto de promotores de fuerza variable mediante cambios en una sola base de la secuencia de la caja -35 consenso del promotor *trc* (Brosius et al. 1985), utilizando como base para su construcción un reporte anterior, en el que se demuestra la jerarquía existente entre las bases de las regiones consenso -10 y -35 del promotor P22 *ant*, así como el efecto obtenido en la fuerza del promotor al variar cada una de ellas (Moyle *et al*, 1991). En este reporte se realizaron cambios puntuales en cada una de las posiciones por los tres nucleótidos posibles y se analizó, mediante fusiones al gen *lacZ*, la variación en la fuerza del promotor que cada una de las mutaciones generó. Partiendo de estos datos y usando como templatado al promotor *trc*, se planearon las siguientes las mutaciones: cambio de la A en la posición -35 por los tres nucleótidos posibles (T,G,C) y de la C de la posición -36 por A (Fig. 12), esperando que la fuerza de cada promotor mutante variara de 20 a 80% con respecto al promotor *trc* silvestre.

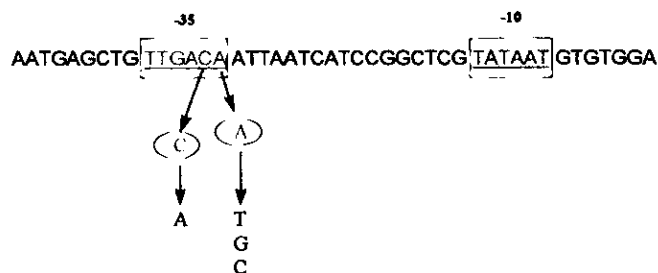


Figura 12. Mutaciones puntuales realizadas en la caja -35 del promotor comercial *trc*.

Tomando al promotor silvestre como un 100% los mutantes tendrían una fuerza proporcional con los siguientes valores (Fig. 13):

| | | | |
|--------------------|---------------|------|-----------|
| <i>trc1</i> | TTGACA | 100% | Silvestre |
| <i>trc2</i> | TTGACT | 80% | Mutante 1 |
| <i>trc3</i> | TTGACG | 50% | Mutante 2 |
| <i>trc4</i> | TTGACC | 40% | Mutante 3 |
| <i>trc5</i> | TTGAAA | 20% | Mutante 4 |

Figura 13. Fuerza esperada para los promotores mutantes de *trc*, en valor relativo a la fuerza del promotor silvestre. Adaptado de un análisis realizado para el promotor P22 *ant* por Moyle *et al* (1991).

trc es un promotor híbrido construido con la caja -35 del promotor *trp* (conservando también su región hacia arriba) y la caja -10 del promotor *LacUV5*, por lo que puede ser regulado por IPTG, aunque, el uso de este inductor puede ser evitado si se utiliza como huésped una cepa *lacF*, en la cuál estos promotores serán constitutivos.

Los promotores mutantes se obtuvieron mediante el uso de un kit de mutagénesis comercial, tal como se describe en materiales y métodos. Para realizar la caracterización de este conjunto de promotores, se utilizaron fusiones al gen *g_{lk}* contenidas en vectores de bajo número de copias (derivados de pCL1920) midiendo la fuerza de cada uno de ellos mediante

ensayos de actividad de glucocinasa en un fondo genético silvestre que serán proporcionales a la transcripción.

De esta forma, nuestro sistema tiene las siguientes características: promotores constitutivos que permitirán la expresión de un gen a un nivel constante durante el cultivo y que, además, pueden ser usados simultáneamente para expresar varios genes a diferentes niveles.

VI.4. TERCERA SECCIÓN: APLICACIÓN DEL NUEVO SISTEMA DE EXPRESIÓN GENÉTICA PARA MODULAR LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *galP* Y *glk* Y LA RECONSTITUCIÓN DEL FENOTIPO GLUCOSA⁺ A PARTIR DE CEPAS PTS⁻.

VI.4.1. Construcción de la fusión del promotor *trc1* al gen *glk*. La fusión de *trc1* a *glk* se llevó a cabo tal y como se describe en materiales y métodos. Para verificar que esta fusión fuera funcional, se realizaron ensayos enzimáticos de Glk utilizando a la cepa W3110, transformada con el vector pvGlk1.2 en cultivos con diferentes concentraciones del inductor IPTG. En la Fig. 14 se muestra la relación entre actividad enzimática y concentración de inductor, característica en fusiones con este tipo de promotores. A partir de estos resultados, se definió que la concentración de IPTG para obtener la máxima expresión con esta fusión era 1mM, la cuál sería utilizada para los experimentos subsecuentes.

Debido a que estos ensayos enzimáticos fueron realizados utilizando un fondo genético *glk⁺* fue necesario medir la actividad enzimática de este fondo, el valor obtenido para este control se presenta en el extremo derecho de la Fig. 14. El valor obtenido para el fondo genético es igual al obtenido para la cepa con el vector pvGlk1.2 en ausencia de IPTG.

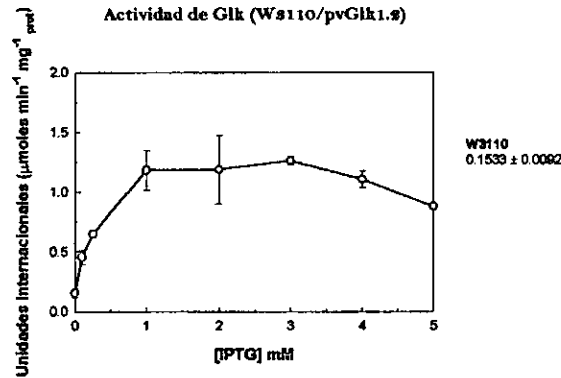


Figura 14. Resultados de los ensayos de actividad enzimática de Glk para la cepa W3110/pvGlk1.2 utilizando diferentes concentraciones del inductor IPTG.

VI.4.2. Construcción de la fusión del promotor *trc1* al gen *galP*. La fusión del gen *galP* fue llevada a cabo igual que la del gene *glk*, y de forma similar fue necesario diseñar una estrategia para verificar que fuera funcional. En este caso, se utilizó la complementación del fenotipo GalP⁺ en cepas deficientes del transportador de galactosa, empleando medio McConkey-Galactosa para detectar fácilmente el fenotipo buscado. Este medio se caracteriza por provocar una coloración rojiza en las colonias capaces de asimilar el carbohidrato con el que este fue suplementado, permitiendo diferenciarlas de las colonias que no pueden asimilar el sustrato debido a su coloración blanca. El fondo genético utilizado para realizar esta complementación fue la cepa PB12P, la cual fue transformada con el vector pvGalP1, y como controles se usaron cultivos de esta misma cepa transformada con pTrc_99A y sin transformar. De estos experimentos se obtuvieron los siguientes resultados: colonias blancas en ausencia y presencia de 1 mM de IPTG para los dos controles, y colonias rojas en ausencia y presencia de 1mM de IPTG para la cepa transformada con el vector de expresión que contiene el gen *galP*. Se esperaban colonias rojas solo en presencia de IPTG; sin embargo debido a que el fenotipo rojo en ausencia del inductor se presenta sólo en las cepas transformadas con el vector que contiene la fusión a

VI.4.3. Construcción de la librería de promotores fusionados a *glk*. El vector de expresión utilizado fue el vector comercial de alto número de copias pTrc_99A, adicional al análisis realizado por actividad enzimática, la secuencia obtenida para estas fusiones demostró que se encontraban en fase y que los genes no tenían ninguna diferencia con la secuencia nucleotídica reportada (datos no mostrados).

Para determinar el rango de actividad de glucocinasa necesario para que estas cepas puedan desarrollar altas velocidades de crecimiento, se realizaron gráficos de μ (velocidad de crecimiento) vs Q_s (velocidad específica de consumo de sustrato). Se correlacionaron los valores de velocidad de fosforilación de glucosa y velocidad específica de crecimiento, a través de la dependencia existente entre Q_s y μ (Blanch y Clarck, 1997; Bailey y Ollis, 1997), la cuál relaciona linealmente el rendimiento ($Y_{x/s}$, ecuación 1) -como una medida de la eficiencia de conversión de sustrato en biomasa- a la velocidad específica de crecimiento (μ) y la velocidad específica de consumo de sustrato (Q_s , ecuación 3). Para que esta relación sea válida es necesario considerar que:

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{dt} \quad \text{Ecuación 1.}$$

El cual se considera aproximadamente constante para un sistema particular de crecimiento. Para *E. coli* este parámetro permanece constante en un rango de velocidad de crecimiento de 0.3 a 0.7 h⁻¹, utilizando un cultivo continuo en medio mínimo suplementado con 2 g/l de glucosa (Ponce, E. 1999).

El consumo global de sustrato puede obtenerse mediante:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} + \frac{q_p X}{Y_{p/s}} + mX \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde m es el factor de mantenimiento.

Si se considera que no hay producto, entonces la ecuación queda de la siguiente forma:

Si se considera que no hay producto, entonces la ecuación queda de la siguiente forma:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \quad \text{Ecuación 3.}$$

Esta relación nos permite predecir de forma aproximada la velocidad de fosforilación de glucosa que se requiere para soportar cierta velocidad de crecimiento (μ), sin olvidar que esta relación es muy simple, ya que la μ no sólo depende de la velocidad de consumo del sustrato y del rendimiento biomasa/sustrato. Además, es muy probable que la velocidad de generación de producto no sea cero, pero hacer esta consideración facilita el manejo de la ecuación; es por esto que los valores obtenidos no serán absolutos, serán solo una aproximación.

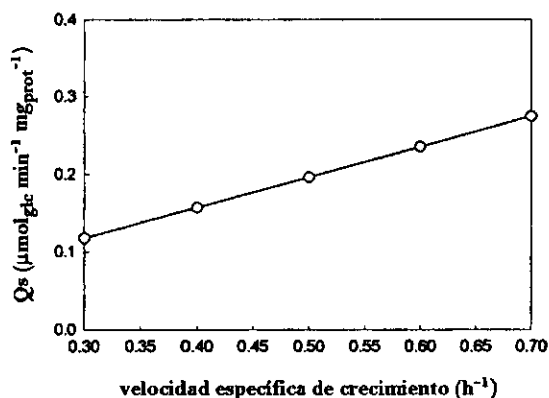


Figura 15. Gráfico de Q_s (velocidad específica de consumo de sustrato) vs. μ (velocidad específica de crecimiento), calculados utilizando las ecuaciones 1 y 3 con un valor de $Y_{x/s}=0.43$ (rendimiento biomasa/sustrato).

Si graficamos esta relación de μ vs velocidad de consumo de glucosa, utilizando los datos obtenidos experimentalmente para la cepa silvestre W3110, cuyo valor de $Y_{x/s}$ para cultivos lote utilizando medio mínimo con 2 g/l de glucosa es de 0.43 $g_{Biomasa}/g_{Glc}$, podemos

encontrar una relación que nos ayude a predecir los valores de actividad de Glk que deben obtenerse a partir de las fusiones a la librería de *trc* para lograr una alta velocidad de crecimiento (Figura 15).

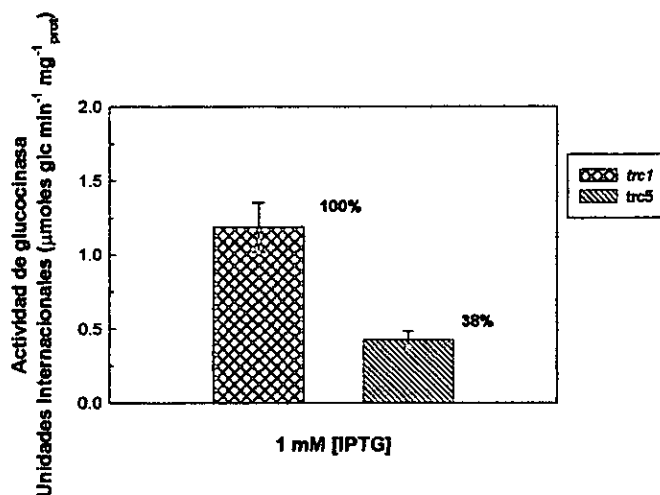


Figura 16. Actividad enzimática de glucocinasa calculada para la cepa W3110 transformada con los derivados de pTrc_99A que contienen las fusiones del gen *glk* a los promotores *trc1* y *trc5*. Como control se realizaron ensayos enzimáticos de W3110/pTrc_99A, obteniéndose valores de actividad similares a los obtenidos para la cepa sin plásmido.

Las fusiones del gen *glk* al conjunto de promotores *trc*[#] (silvestre y 4 mutantes) fueron caracterizadas mediante la realización de ensayos enzimáticos. Estas fusiones se encuentran clonadas en vectores derivados de pTrc_99A, por lo que era muy probable que excedieran los requerimientos celulares mostrados en la figura 15, debido a que pTrc_99A es un vector de alto número de copias, por lo que su caracterización se enfocó solo en las fusiones al promotor silvestre y a uno de los promotores más débiles (*trc5*), lo que permitiría saber si era necesario hacer las construcciones en vectores de bajo número de copias ó si este nivel era el adecuado para soportar la velocidad de crecimiento planteada (Figura 16). Se realizaron los ensayos enzimáticos a la cepa W3110 transformada con los vectores pvGlk1.2 (contiene la fusión *trc1-gluk*) y pvGlk5.2 (contiene la fusión *trc5-gluk*), usando 1mM de IPTG y su control sin inductor.

Comparando el valor de actividad enzimática de Glk obtenido para pvGlk5.2 con la curva presentada en la **figura 15**, podemos observar que el nivel de actividad obtenido para este vector es mayor al requerido por la cepa silvestre para soportar una velocidad de crecimiento similar a la μ_{\max} (0.6 h^{-1}), indicando la necesidad de subclonar estas fusiones en un vector de bajo número de copias para disminuir el nivel de expresión hasta encontrar la expresión requerida, como se había planteado anteriormente.

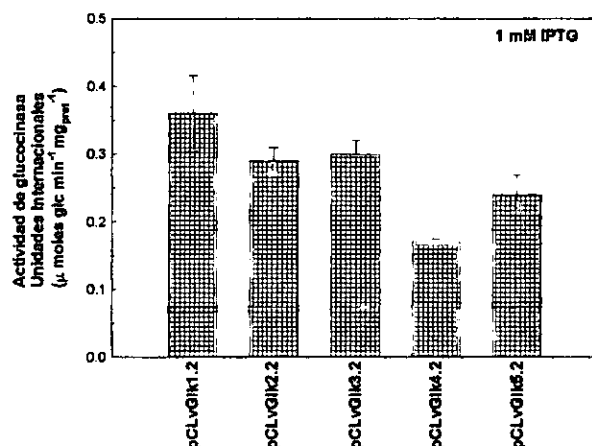


Figura 17. Ensayos enzimáticos de glucocinasa realizados con la cepa W3110 transformada con la familia de vectores pCLvGlk a una concentración de 1 mM de IPTG. Este gráfico presenta la actividad enzimática producto de la expresión del gen *glk* cromosomal (0.1533 Unidades Internacionales) y de la copia clonada en los vectores derivados de pCL1920.

La subclonación de las fusiones de *trc^{*}-glk* en el vector de bajo número de copias pCL1920 (5-10 copias en *E. coli*) dio como resultado la familia de plásmidos pCLvGlk, formada por cinco vectores con los cuáles fue realizada la caracterización completa de la librería *trc^{*}* (**Figura 17**). Como puede observarse en este gráfico, con la familia de vectores pCLvGlk es posible obtener niveles de expresión del gen de glucocinasa que van desde el 100% para el promotor silvestre, hasta 8% para el promotor más débil (*trc4*) y, a pesar de que los niveles obtenidos experimentalmente son diferentes a los teóricos calculados a partir de la información publicada por Moyle *et al* (1991), cada mutante tiene una fuerza diferente que mantiene la tendencia requerida para modular la expresión génica (figura 18).

| | Secuencia del Promotor | Nivel relativo de glucocinasa inducido, 1 mM IPTG | Nivel no inducido |
|-------------|------------------------|---|-------------------|
| <i>trc1</i> | TTGACA | 100% | 8% |
| <i>trc2</i> | TTGACT | 66% | 0% |
| <i>trc3</i> | TTGACG | 85% | 30% |
| <i>trc4</i> | TTGACC | 8% | - |
| <i>trc5</i> | TTGAAA | 44% | 48% |

Figura 18. Comparación de los niveles de expresión obtenidos para las fusiones de *trc^{*}-glk*. El símbolo - indica que este valor no fue determinado.

VI.4.4. Construcción de la librería de promotores fusionados a *galP*. Las fusiones de *trc^{*}-galP* contenidas en el vector de alto número de copias pTrc_99A se obtuvieron de la misma forma que las del gen *glk* y al igual que ellas fueron secuenciadas para verificar que se encontraran en fase y no existiera ningún cambio en la secuencia nucleotídica reportada en el Genbank. Sin embargo, estas fusiones no fueron subclonadas individualmente al vector pCL1920, solo fueron clonadas en presencia de las fusiones *trc^{*}-glk* por lo que no se realizaron ensayos de medición de transporte de glucosa para caracterizar el conjunto de promotores fusionados a este gen. Asumiendo que la fuerza de los promotores fuera a la obtenida para el gen *glk*.

VI.4.5. Construcción del vector derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de ambos genes bajo el control de la librería de promotores. Una vez obtenidas las fusiones de *trc^{*}* a los genes que codifican para el transportador de galactosa y la glucocinasa, el siguiente paso fue clonar ambas fusiones en un mismo vector. Así, a los vectores derivados de pCL1920 que ya contenían las fusiones de *trc^{*}* a *glk*, les fueron ligados los casets *trc^{*}-galP*, obteniéndose la familia de vectores pVGlkGalP que contienen diferentes combinaciones de las fusiones de ambos genes.

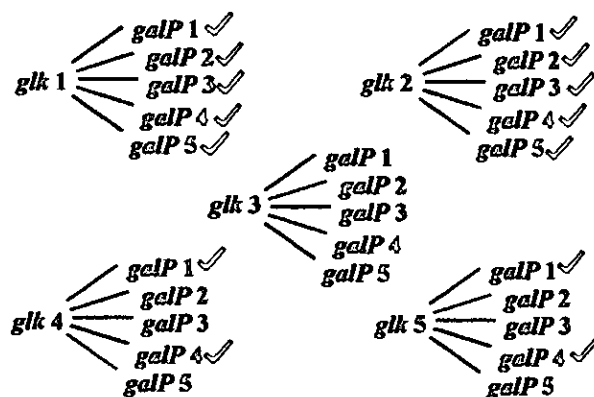


Figura 19. Posibles combinaciones de las 10 fusiones de *glk* y *galP* que pueden ser clonadas en el vector pCL1920. Las combinaciones marcadas con ✓ son aquellas que fueron ligadas al vector pCL1920 para generar la familia de vectores pvGlcGalP.

Existen 25 vectores que pueden ser construidos con las 10 fusiones de *glk* y *galP* (Fig. 19), sin embargo debido a los resultados obtenidos en su caracterización sólo se construyeron 14 vectores, los cuáles serán descritos en secciones posteriores.

VI.4.6. Cultivos en matraz para calcular la velocidad de crecimiento de las mutantes.

Para realizar la evaluación del fenotipo PTS-Glucosa⁺, fue necesario transformar la familia de vectores pvGlcGalP en un fondo genético adecuado, como el de la cepa VH32. En esta cepa, el sistema de la fosfotransferasa no es funcional y además los genes *lacI* y *lacZ* fueron inactivados. La inactivación de *lacI* permite que las fusiones de *glk* y *galP* a los promotores *trc** sean expresadas constitutivamente, evitando el uso del inductor IPTG. Por otro lado, la inactivación de *lacZ* (realizada al mismo tiempo que la del gen *lacI*) se usó para facilitar la selección del fenotipo *lacF* por medio de colonias blancas en presencia de XGal. Al transformar la cepa VH32 con los vectores de la familia pvGlcGalP, se obtuvieron las 14 cepas recombinantes esperadas con las que se llevaron a cabo los cultivos para evaluar y demostrar la reconstitución del fenotipo Glucosa⁺ mediante el uso del sistema GalP-Glc.

Como control se realizaron cultivos de la cepa W3110 (silvestre), VH32 (huésped), VH32 con el plásmido pCL1920 sin inserto, VH32 con el vector conteniendo la fusión de

trc1 al gen *glk* (pCLvGlk1.2), VH32 con el vector conteniendo la fusión de *trc1* a *galP* (pCLvGalP1) y por último VH32 con el vector conteniendo la fusión de *trc4* a *galP* (pCLvGalP4) (Tabla V).

Tabla V. Velocidades de crecimiento de las cepas control calculadas en medio mínimo suplementado con glucosa.

| Cepa | μ (h ⁻¹) |
|-----------------|--------------------------|
| W3110 | 0.62 ± 0.02 |
| VH32 | 0.03 ± 0.0 |
| VH32/pCL1920 | 0.03 ± 0.0 |
| VH32/pCLvGlk1.2 | 0.03 ± 0.0 |
| VH32/pCLVGalP1 | 0.55 ± 0.01 |
| VH32/pCLVGalP4 | 0.51 ± 0.01 |

En cuatro de estos controles se obtuvo el resultado esperado, una μ de alrededor de 0.6 h⁻¹ para la W3110 e inferiores a 0.05 h⁻¹ para la cepa huésped sin vector y con los vectores pCL1920 y pCLvGlk1.2. Sin embargo, para los dos últimos controles en los que sólo se expresa el gen del transportador GalP se esperaba una μ baja, debido a que la hipótesis planteaba que la expresión basal de *glk* no era suficiente para soportar una alta velocidad de crecimiento. Sin embargo, con estas cepas observamos que al expresar el gen del transportador GalP en un vector de bajo número de copias, es posible recuperar el fenotipo glucosa⁺ alcanzando velocidades de crecimiento del 88 y 82% con respecto a la μ de la cepa silvestre: probablemente estas mutantes no alcanzan la μ_{\max} por limitación del nivel de actividad de Glk, ya que solo cuentan con el actividad basal existente en el fondo VH32.

Como se mencionó en la sección anterior, a partir de las fusiones de *trc** a *galP* y *glk* era posible generar 25 diferentes vectores, que al transformarse en la cepa VH32 generarían derivadas con diferentes niveles de expresión para ambos genes. Inicialmente se construyeron 10 vectores de estos 25 posibles, los cuales contenían una combinación de la fusión de *trc1-glk* con las 5 posibilidades para *galP* y la fusión *trc2-glk* también con las 5

posibilidades para *galP* (Fig. 19). Cabe recordar que el promotor *trc1* es el *trc* silvestre y *trc2* es uno de los promotores más fuertes. La caracterización de estas 10 derivadas reveló que combinando el nivel de expresión de estas dos fusiones, para glucocinasa y para *galP*, no se reducía la velocidad de crecimiento de las mutantes (Fig. 20).

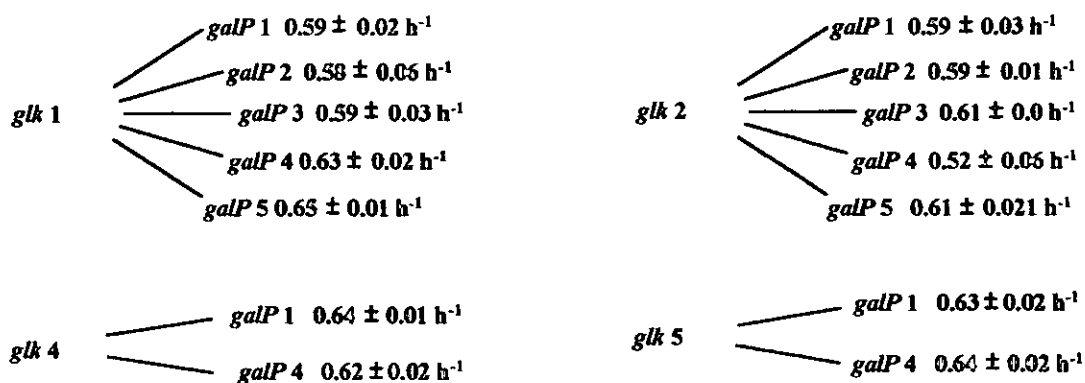


Figura 20. Velocidades de crecimiento para las 14 derivadas construidas, calculadas en medio mínimo suplementado con glucosa.

Debido a este resultado, se construyeron 4 derivadas más en las que se mantuvo el nivel de expresión más bajo para *galP*, combinándolo con una disminución en la expresión de *glk*, para lo cuál se utilizaron las fusiones *trc4-glk* y *trc5-glk*, con el fin de evaluar como se afectaría la velocidad de crecimiento al disminuir la expresión de *glk* en presencia de una baja expresión de *galP*. Para demostrar que el cambio en la velocidad de crecimiento fuera debido a la disminución en la expresión de los dos genes, se construyeron como control derivadas con una combinación de estos bajos niveles de expresión de glucocinasa (*trc4-glk* y *trc5-glk*) con una alta expresión de *galP* (fusión a *trc1*).

En total 14 derivadas fueron construidas y caracterizadas (Fig. 20); los valores de velocidad de crecimiento calculados para ellas son muy similares. A pesar que las velocidades de crecimiento son iguales para todas ellas, existen 2 cepas más eficientes: la VH52/pvGikGalP44 y la VH32/pvGikGalP54, debido a que son capaces de desarrollar una alta velocidad de crecimiento con el menor nivel de expresión para ambos genes, utilizando

el conjunto de promotores generado en este trabajo. Basándose en los resultados obtenidos, estas dos derivadas fueron conservadas para realizar la caracterización de la velocidad de transporte de glucosa y la actividad enzimática de glucocinasa, con el fin de definir si existía una relación entre estos dos parámetros y la velocidad de crecimiento encontrada, pero no fue posible obtener una correlación entre estos parámetros. Al paralelo con la caracterización de las derivadas, se realizó también la evaluación de los controles más importantes. En la siguiente sección se presentan los valores obtenidos para estos parámetros.

Como parte de la caracterización de las mutantes PTS-Glucosa⁺ se realizaron cultivos en fermentador de las derivadas VH32/pvGlkGalP11, VH32/pvGlkGalP44, VH32/pvGlkGalP54, VH32/pCLvGalP1 y la silvestre W3110. En estos cultivos, las derivadas de VH32 producen una mayor proporción de ácido acético que su cepa silvestre parental (Tabla VI), lo que podría ser consecuencia de un acelerado flujo en la vía glicolítica debido a que la internalización y fosforilación de la glucosa no esta regulada en estas mutantes. Esta característica puede ser una ventaja si se logra desviar el flujo de carbono a la producción de un metabolito de interés (como compuestos aromáticos o etanol), ya que probamente estas mutantes desarrollen una mayor velocidad de producción del metabolito que la cepa silvestre parental.

Tabla VI. Rendimiento de ácido acético por glucosa consumida por las mutantes PTS-Glucosa⁺ y la cepa silvestre W3110 en cultivos de fermentador. La cepa VH32 no fue probada debido a que no crece en medio mínimo con glucosa.

| Cepa | $P_{\text{acético}} (\text{g}_{\text{acético}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ | $\text{g}_{\text{acético}} / \text{g}_{\text{glucosa}}$ |
|------------------|--|---|
| W3110 | 0.27 ± 0.1 | 0.17 ± 0.05 |
| VH32/pCLvGalP1 | 0.5 ± 0.12 | 0.37 ± 0.03 |
| VH32/pvGlkGalP11 | 0.54 | 0.38 ± 0.03 |
| VH32/pvGlkGalP44 | 0.54 | 0.36 ± 0.02 |
| VH32/pvGlkGalP54 | 0.65 ± 0.06 | 0.43 ± 0.03 |

VI.4.7. Mediciones de actividad enzimática de glucocinasa en las mutantes PTS⁻ Glucosa⁺. Para complementar la caracterización de las mutantes y definir el nivel de actividad de Glk requerido para desarrollar una alta velocidad de crecimiento, se realizaron ensayos enzimáticos para las derivadas más eficientes (VH32/pvGlkGalP44 y VH32/pvGlkGalP54) y los controles más importantes (W3110, VH32/pCLvGalP (vector que solo expresa *galP* bajo el promotor *trc* silvestre) y VH32/pvGlkGalP11 (vector que expresa ambos genes bajo el promotor *trc* silvestre). A continuación se presenta la Tabla VII con los resultados de estos experimentos.

Tabla VII. Actividad enzimática de glucocinasa para los controles y las mutantes más importantes. Entre ellas se encuentra la cepa silvestre W3110, la cepa huésped VH32 transformada con: el vector pCLvGalP en el que solo se expresa el gen *galP*, el vector pvGlkGalP11 que solo contiene las fusiones *trc1-glk* y *trc1-galP*; y las mutantes más eficientes: VH32/pvGlkGalP44 y VH32/pvGlkGalP54. Nota: se realizaron ensayos de actividad de Glk para la cepa VH32, debido a que no se puede obtener la biomasa necesaria porque no crece en M9-Glucosa.

| CEPA | Glucocinasa $\mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ |
|------------------|---|
| VH32/pCLvGalP1 | 0.1276 \pm 0.0097 |
| VH32/pvGlkGalP11 | 0.2298 \pm 0.0147 |
| VH32/pvGlkGalP44 | 0.1705 \pm 0.0099 |
| VH32/pvGlkGalP54 | 0.1815 \pm 0.0314 |
| W3110 | 0.1533 \pm 0.0092 |

Cabe mencionar que los valores de actividad enzimática obtenidos con los vectores que contienen las fusiones de los dos genes (*glk* y *galP*) son menores a los obtenidos anteriormente con los vectores que solo tienen la fusión de *trc** a *glk* (familia de vectores pCLvGlk, Fig. 17). Esto puede ser debido a carga metabólica o a competencia entre las regiones promotoras por la polimerasa.

VI.4.8. Mediciones de transporte de glucosa para las mutantes PTS-Glucosa⁺. Las mismas cepas que fueron caracterizadas por ensayos de actividad de Glk, se utilizaron para realizar ensayos de transporte de glucosa. La tendencia de los valores obtenidos para cada una de las fusiones de *trc**-*galP* se muestra en la Tabla VIII. El valor obtenido para la cepa VH32 con el vector pvGlkGalP11 no coincide con el encontrado para la misma cepa con pClvGalP1 a pesar que en ambos vectores el gen *galP* se encuentra bajo el control del mismo promotor (*trc1*). La diferencia entre ellos es que en el primer vector también se encuentra presente la fusión a *glk*.

Tabla VIII. Velocidades de transporte de glucosa calculadas para las cepas control y las mutantes más importantes. Entre ellas se encuentra la cepa silvestre W3110, la cepa huésped VH32 transformada con: el vector pCLvGalP1 en el que sólo se expresa el gen *galP*, el vector pvGlkGalP11 que contiene las fusiones *trc1-glk* y *trc1-galP*; y las mutantes más eficientes: VH32/pvGlkGalP44 y VH32/pvGlkGalP54.

| CEPA | Transporte | |
|------------------|---|---------|
| | n mol min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína | |
| VH32/pCLvGalP1 | 93.89 | ± 10.17 |
| VH32/pvGlkGalP11 | 20.49 | ± 1.08 |
| VH32/pvGlkGalP44 | 38.48 | ± 7.54 |
| VH32/pvGlkGalP54 | 34.93 | ± 3.79 |
| W3110 | 65.36 | ± 2.8 |

VI.5. CUARTA SECCIÓN: PRODUCCIÓN DE ETANOL POR LAS CEPAS MUTANTES VH32/PCLVGALP1 Y VH32/PVGLKGALP54.

Como resultado de la caracterización de las mutantes PTS-Glucosa⁺ generadas en este trabajo, se observó una mayor producción de ácido acético en cultivos con medio mínimo suplementado con glucosa. Como se mencionó anteriormente, es probable que esta elevada producción de acetato sea la consecuencia de un mayor flujo en la vía glicolítica,

pensar que un exceso de fructosa 1-6, difosfato podría contribuir a este mayor flujo de carbono, ya que fructosa 1-6, difosfato regula positivamente a las piruvato cinasas, pero también se sabe que PEP regula negativamente a la fosfofructocinasa, por lo que la acumulación de este metabolito podría disminuir la velocidad con la que el carbono fluye a través de esta vía. Sin embargo, si estas mutantes eran capaces de producir acetato a una mayor velocidad, era probable también que este exceso pudiera ser canalizado hacia la producción de etanol. De ser esto cierto, sería posible obtener una cepa capaz de lograr una productividad mayor que la cepa silvestre parental.

Para probar la viabilidad de este planteamiento, se realizaron cultivos de evaluación para la derivada VH32/pvGlkGalP54, debido a que en el análisis realizado anteriormente esta derivada se caracterizó por su alta acumulación y velocidad de producción de ac. acético (Tabla VI). Como control se realizaron cultivos de las cepas W3110 (silvestre) y VH32/pCLvGalP1 (cepa PTS⁻ expresando el gen *galP*). A su vez, estas tres cepas fueron transformadas con el vector pLOI1594, que contiene los genes necesarios para desviar el flujo de carbono hacia la producción de etanol: éstos genes fueron aislados de *Z. mobilis* y codifican para las enzimas piruvato decarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADHII) (Martinez *et al*, 1999).

Como parte inicial de la caracterización las mutantes se planteó cultivarlas en condiciones aerobias con el fin de evaluar si tenían realmente un flujo mayor en la vía glicolítica que el de la cepa silvestre. Posteriormente, se llevarían a cabo cultivos en condiciones anaerobias para evaluar si es posible incrementar el rendimiento de etanol con respecto a la cepa silvestre. En anaerobiosis, es posible obtener un mayor rendimiento de etanol por gramo de azúcar consumido. En general para un cultivo anaerobio en condiciones óptimas es posible obtener 0.51 gramos de etanol por cada gramo de azúcar asimilado, este rendimiento es el mismo para glucosa, arabinosa o xilosa. En base a este planteamiento experimental, se decidió realizar estos cultivos en medio LB suplementado con 15 g/l de glucosa, esperando tener un mejor desempeño de las cepas bacterianas en estas condiciones en comparación con el que se obtiene en medio mínimo, debido a que utilizarían los componentes del medio rico para crecimiento y la glucosa para obtener energía y producir etanol. Sin embargo, estas mutantes no habían sido caracterizadas en

con 15 g/l de glucosa, esperando tener un mejor desempeño de las cepas bacterianas en estas condiciones en comparación con el que se obtiene en medio mínimo, debido a que utilizarían los componentes del medio rico para crecimiento y la glucosa para obtener energía y producir etanol. Sin embargo, estas mutantes no habían sido caracterizadas en medio rico anteriormente, por lo que era necesario realizar como control los cultivos de las 3 cepas a evaluar sin el plásmido pLOI1594. De estas fermentaciones se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos (Tabla IX):

Tabla IX. Parámetros cinéticos de la cepa silvestre y dos mutantes PTS⁻ sin el plásmido pLOI1594 en condiciones de aerobiosis. Cultivos realizados en medio LB suplementado con 15 g/l de glucosa.

| Cepa | W3110 | VH32 pCLvGalP1 | VH32 pvGlkGalP54 |
|----------------------|-------|-------------------|---------------------|
| μ | 0.51 | 0.67 | 0.48 |
| q_s | 1.68 | 1.27 | 2.33 |
| $Y_{EtOH/X}$ | 0 | 0 | 0 |
| $g_{EtOH/l}$ | 0 | 0 | 0 |
| $Y_{ac/X}$ | 0.64 | 0.45 | 0.42 |
| $Y_{ac/glc}$ | 0.19 | 0.18 | 0.08 |
| $q_{acético}$ | 0.1 | 0.07 | 0.09 |
| tiempo | 4 h | 4 h | 4 h |
| Biomasa (g/l) | 4.56 | 6.11 | 4.88 |

En estos cultivos, la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre fue 30% menor que la de la derivada VH32/pCLGalP1 y 6% mayor que la de la VH32/pvGlkGalP54. De forma sobresaliente y contrario a lo observado en medio mínimo, con ambas derivadas se obtuvo un menor rendimiento de ácido acético que el esperado. Siendo menor que el de la cepa silvestre (58% y 48% menor para VH32/pCLvGalP1 y VH32/pvGlkGalP54,

respectivamente). Otra observación importante es que para los cultivos de las mutantes PTS⁻ se obtuvo un mayor consumo de base, principalmente para la cepa VH32/pvGlkGalP54 (la derivada VH32/pCLvGalP1 consumió el doble y la VH32/pvGlkGalP54 consumió el triple de solución KOH 2N). Cabe recordar que los cultivos fueron realizados con condiciones controladas de pH, utilizando adiciones de hidróxido de potasio para mantener un valor de pH constante. Un mayor consumo de base puede ser relacionado con una mayor producción de ácidos orgánicos. A pesar de ello, no ha sido posible determinar los productos de fermentación (además de ac. acético y láctico) responsables de este mayor consumo de KOH. Por esto, a pesar de haber encontrado una menor productividad de ac. acético por las mutantes en medio rico, se decidió continuar con la evaluación de los cultivos con las cepas transformadas con el vector pLOI1594 (Fig. 21), obteniéndose los siguientes parámetros cinéticos (Tabla X).

Tabla X. Parámetros cinéticos de la cepa silvestre y dos mutantes PTS⁻ transformadas con el plásmido pLOI1594 en condiciones de aerobiosis. Cultivos realizados en medio LB suplementado con 15 g/l de glucosa.

| Cepa | W3110 pLOI1594 | VH32 pCLvGalP1/ pLOI1594 | VH32 pvGlkGalP54/ pLOI1594 |
|-----------------|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| μ | 0.39 | 0.41 | 0.54 |
| q_s | 1.47 | 1.34 | 1.94 |
| $Y_{EtOH/X}$ | 0.7 | 0.82 | 1.76 |
| $g_{EtOH/l}$ | 3.21 | 3.5 | 4.15 |
| q_p | 0.1 | 0.08 | 0.21 |
| $Y_{ac/X}$ | 0.11 | 0.02 | 0.19 |
| $Y_{ac/glc}$ | 0.07 | 0.001 | 0.034 |
| $q_{pACETICO}$ | 0.02 | 0.005 | 0.02 |
| tiempo | 6 | 6 | 6 |
| $g/l_{Biomasa}$ | 5.03 | 4.49 | 2.64 |

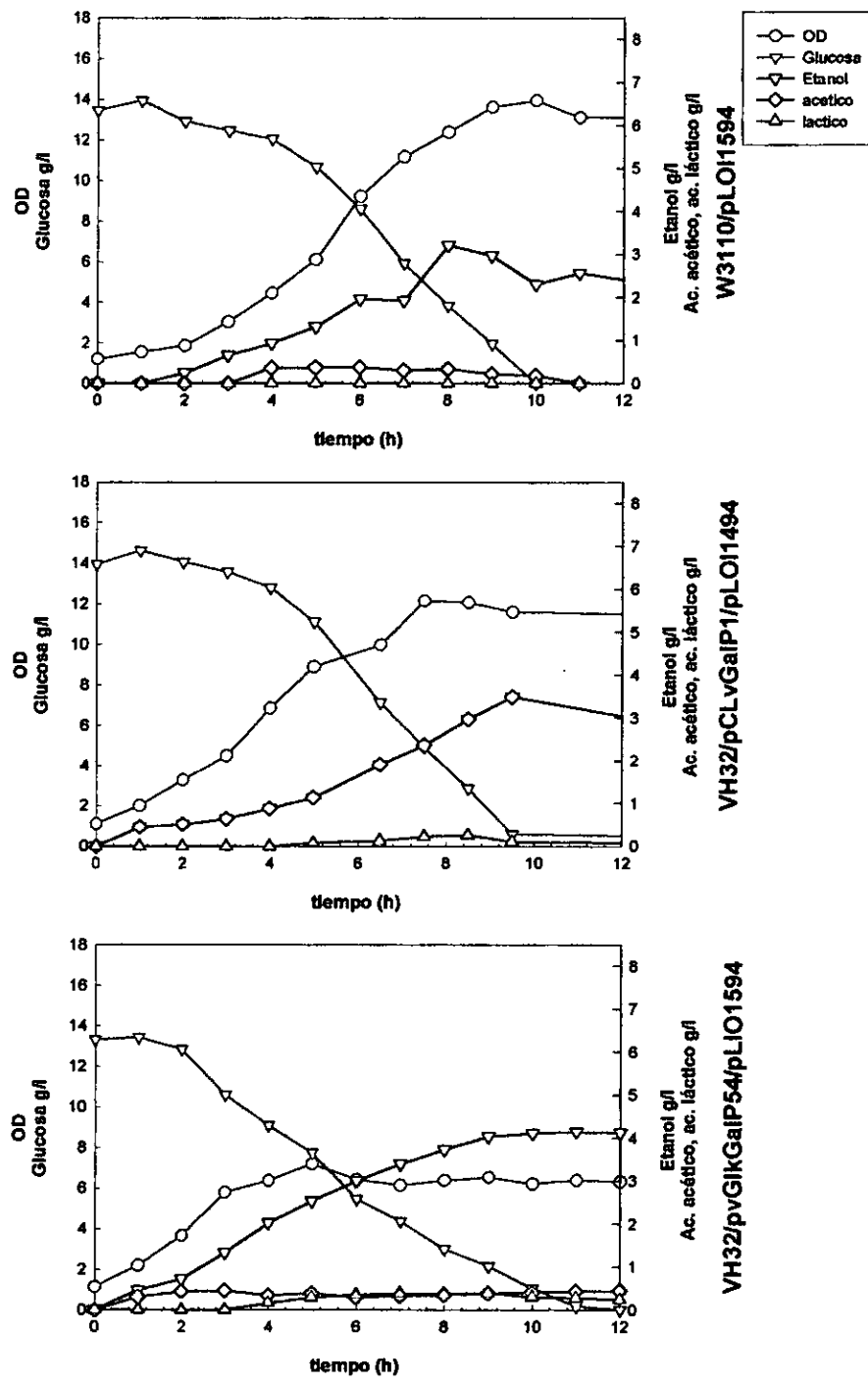


Figura 21. Cultivos de las cepas silvestre y mutantes PTS⁻ transformadas con el plásmido pLOI1594.

En estos cultivos, la cepa derivada VH32/pvGlkGalP54/pLIO1594 desarrolló una velocidad de crecimiento 38 % mayor que la cepa silvestre/pLIO1594. Sin embargo se generó tan solo el 50% de la biomasa debido a que esta alta velocidad de crecimiento se mantuvo por un periodo de fermentación muy corto (3 h). Por otro lado, para la cepa VH32/pCLvGalP1/pLIO1594, la velocidad de crecimiento es similar a la de la cepa silvestre/pLIO1594 y se obtuvo el 90% de la biomasa generada con respecto a la silvestre.

En cuanto al rendimiento etanol/biomasa, la cepa VH32/pvGlkGalP54/pLIO1594 obtuvo un valor 2.5 y 2.17 veces mayor a las cepas silvestre/pLIO1594 y VH32/pCLvGalP1/pLIO1594, respectivamente. En cuanto al rendimiento etanol/glucosa, la cepa VH32/pvGlkGalP54/pLIO1594 obtuvo el mismo valor que la silvestre/pLIO1594, y ambas obtuvieron un rendimiento 18 % mayor que el calculado para la VH32/pCLvGalP1/pLIO1594. Y la productividad de etanol obtenida para la mutante VH32/pvGlkGalP54/pLIO1594 fue 2.1 y 2.6 veces mayor que la de las cepas silvestre/pLIO1594 y VH32/pCLvGalP1/pLIO1594, respectivamente (Fig.22).

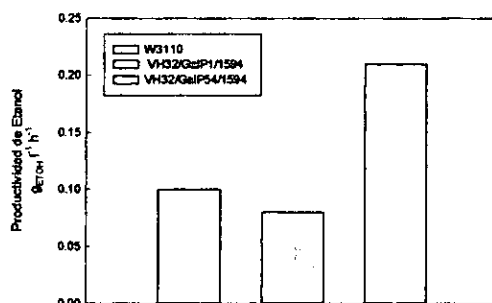


Figura 22. Comparación de la productividad de etanol en cultivos aerobios.

Sin embargo, la derivada VH32/pvGlkGalP54/pLIO1594 produce más ac. acético que las otras dos cepas, siendo el rendimiento acético/biomasa para esta derivada 1.72 y 9.5 veces mayor, con respecto a las cepas silvestre/pLIO1594 y VH32/pCLvGalP1/pLIO1594 respectivamente.

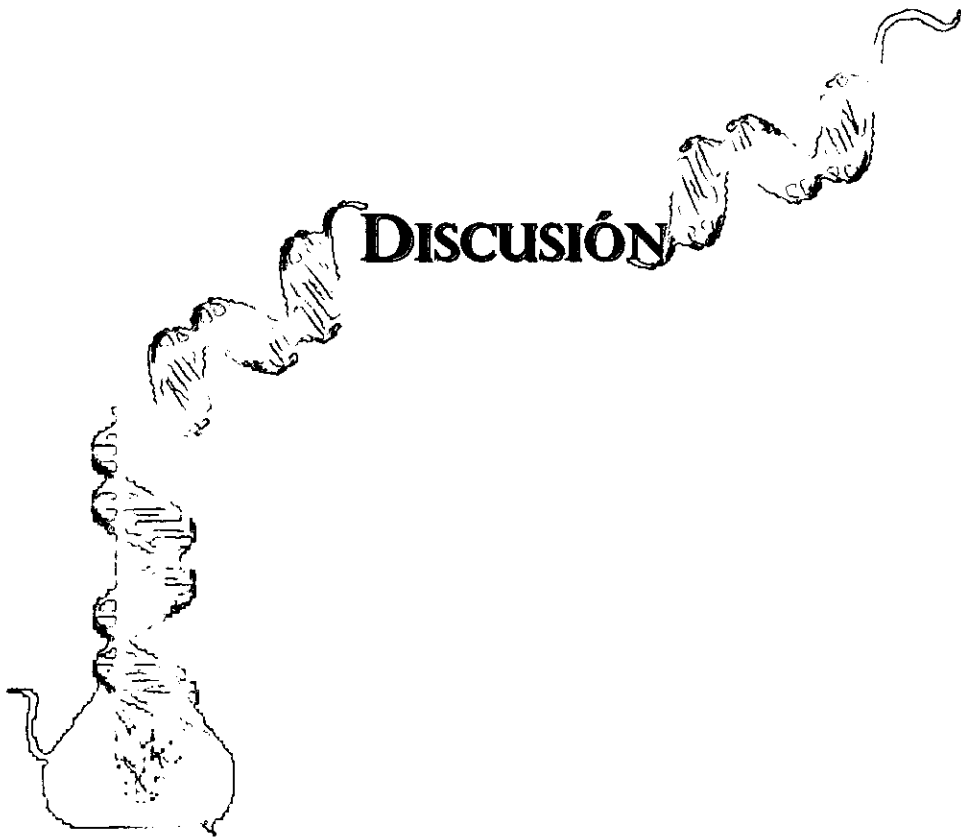
Con los cultivos aerobios se cumplió con el objetivo planteado al inicio de esta evaluación: determinar si las mutantes PTS-Glucosa⁺ tenían la capacidad de producir un metabolito de interés más rápido que la cepa silvestre como consecuencia de un mayor flujo de carbono en la vía glicolítica. El valor de productividad de etanol obtenido para la cepa VH32/pvGlkGalP54/pLIO1594 (100% mayor que el de la silvestre) nos daba indicios de que esta aseveración era correcta.

Este resultado alentó la continuación de la evaluación de las mutantes en condiciones de anaerobiosis. Nuevamente se realizaron cultivos control de cepas sin el vector pLIO1594, para los cuales la velocidad específica de crecimiento de la W3110 fue de 0.29 h⁻¹, mientras que para las mutantes VH32/pCLvGalP1 y VH32/pvGlkGalP54 fue 59% y 35% menor con respecto a la silvestre. Al realizar los cultivos con las cepas transformadas con el vector pLIO1594 la velocidad de crecimiento de las mutantes no disminuyó (al compararlos con los cultivos de las cepas sin este vector), pero solo se duplicaron una vez y después se mantuvieron a lo largo de toda la fermentación, siendo viables debido a que seguían consumiendo glucosa y produciendo etanol. Sin embargo, debido a la baja generación de biomasa, la productividad de etanol en cultivos de las mutantes fue significativamente menor que la de la cepa silvestre (85 % menor para VH32/pCLvGalP1 y 74% menor para VH32/pvGlkGalP). Es posible que esta incapacidad para crecer en condiciones anaeróbicas sea consecuencia de la carga metabólica provocada por la presencia de dos vectores en las mutantes deficientes de PTS ó a un nivel limitante de actividad de GalP y/o Glk. Por otro lado, también es probable que se deba a un efecto pleiotrópico de la mutación en PTS.

Para entender si este comportamiento era efecto de la mutación PTS o si era consecuencia de una actividad limitante de GalP ó Glk, se realizaron cultivos con cepas PTS-Glucosa⁺ obtenidas por cultivo continuo (NF9) y con derivadas de VH32 expresando los genes *galP* y *glk* a un mayor nivel que las cepas probadas anteriormente (alto e intermedio, 12 y 7 veces mayor al obtenido con el vector pvGlkGalP54). Para todas las cepas se obtuvo una velocidad de crecimiento similar ó menor a la obtenida con la VH32/pvGlkGalP54, lo que permite concluir que la incapacidad de crecer eficientemente en

condiciones anaerobias es característica común de las mutantes deficientes del sistema de la fosfotransferasa y posiblemente es consecuencia de esta inactivación.

VII



La presencia de una fuente de carbono rápidamente metabolizable en el medio de cultivo de un microorganismo inhibe la síntesis de las enzimas involucradas en el catabolismo de otras fuentes de carbono (Saier et al. 1996, Saier 1998). Este fenómeno se llama represión catabólica, y el consumo secuencial de fuentes de carbono es una de sus consecuencias. La glucosa es el carbohidrato que causa represión catabólica de forma más eficiente, por lo que a este fenómeno se le ha llamado efecto glucosa (Saier et al. 1996). Sin embargo, son diferentes mecanismos los que contribuyen a este efecto y la importancia relativa de cada uno de ellos depende de varias condiciones. Por ejemplo: uno de los mecanismos más importantes es el llamado exclusión del inductor, para el cuál el componente IIA^{Glc} de PTS es el mediador principal.

En el presente trabajo, se mostró el efecto que provoca la inactivación del operón *pts* sobre la represión que glucosa ejerce sobre la asimilación de otros carbohidratos. Para realizar este análisis, se llevaron a cabo cultivos con mezclas dobles o triples de glucosa y arabinosa y/o xilosa con la cepa NF9 (PTS-Glucosa⁺) aislada por Flores *et al* (1996). En una mezcla de glucosa-arabinosa, mutantes de *E. coli* deficientes de PTS, conforme a lo esperado, al no contar con el componente IIA^{Glc}, pueden asimilar simultáneamente estos carbohidratos. Sin embargo, en mezclas de glucosa-xilosa existe aún un efecto de represión parcial de glucosa sobre la asimilación de esta pentosa, esto es de llamar la atención, porque en base a reportes previos, suponíamos que el efecto de glucosa en estas mutantes sería similar para ambas pentosas. Al realizar el cultivo en presencia de una mezcla triple de glucosa, arabinosa y xilosa, se observó un efecto similar al obtenido con mezclas dobles: para la cepa PTS-Glucosa⁺ no se observó represión por glucosa sobre la asimilación de arabinosa, pero existe un retardamiento en el consumo xilosa. Este retardamiento es mayor en presencia de arabinosa, por lo que el co-metabolismo parcial de glucosa-xilosa observado en el cultivo con la mezcla doble fue inhibido por la presencia de arabinosa. Este comportamiento se debe a que L-arabinosa reprime al operón *xyk*; sin embargo, aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual se lleva a cabo este fenómeno (Kang et al. 1998).

Por reportes anteriores, se sabe que en *E. coli* existe un límite máximo en la velocidad de consumo de la fuente de carbono, aún cuando los compuestos están siendo asimilados a través de diferentes sistemas de transporte (Narang et al. 1997). Los resultados

obtenidos para los cultivos de la cepa PTS-Glucosa⁺ en presencia de mezclas de glucosa-arabinosa o glucosa-arabinosa-xilosa confirman este desempeño característico, ya que la velocidad de consumo simultáneo de glucosa-arabinosa para los cultivos con mezclas dobles ó triples fueron de 1.06 y 1.1 g_{azúcar}/g_{biomasa}.h, respectivamente; mientras que las velocidades de consumo de glucosa y arabinosa en cultivos con un solo azúcar fueron 1.15 y 0.84 g_{azúcar}/g_{biomasa} respectivamente.

Otra diferencia importante entre las cepas analizadas (PTS⁺ y PTS-Glucosa⁺) es la cantidad de acetato producido. En cultivos con mezclas dobles se observó una menor producción de ácido acético para la cepa PTS-Glucosa⁺ que la cepa PTS⁺. En presencia de glucosa-arabinosa, la cepa PTS-Glucosa⁺ produce 30% menos acetato, mientras que en mezclas de glucosa-xilosa los cultivos de esta mutante producen 90% menos ácido acético que los de la cepa PTS⁺, debido a que la velocidad de crecimiento en la mezcla glucosa xilosa es 20% menor que la desarrollada en la mezcla de glucosa-arabinosa.

En contraste, cuando la mutante es cultivada en presencia de una mezcla triple de azúcares, produce 14% más acetato que la cepa silvestre. Este resultado puede ser consecuencia de la alta velocidad de crecimiento desarrollada por la mutante. De hecho, la acumulación de acetato se detiene cuando las células empiezan a crecer lentamente utilizando xilosa en la parte final del cultivo.

Los experimentos de transporte de [¹⁴C]-xilosa, en presencia y ausencia de glucosa, mostraron que la glucosa es capaz de ejercer diferentes grados de inhibición del transporte de xilosa, dependiendo del fondo genético que se analice. En este sentido, las velocidades iniciales de transporte de xilosa para las cepas PTS⁺, PTS-Glucosa⁻ y PTS-Glucosa⁺ fueron 28, 67 y 31% menores, con respecto a los valores de velocidad observados en la ausencia de glucosa. Para la cepa PTS⁺, la inhibición observada es el resultado de la represión catabólica mediada por PTS. Pero en el caso de las cepas deficientes de PTS, el efecto de inhibición debe ser independiente de este sistema. Considerando que la principal diferencia entre las cepas PTS-Glucosa⁻ y PTS-Glucosa⁺ es que ésta última es capaz de internalizar glucosa, los datos presentados en este trabajo sugieren que el incremento en el efecto de inhibición del

transporte de xilosa por glucosa en la cepa PTS-Glucosa⁺ es dependiente de la presencia intracelular de glucosa, mediante un mecanismo desconocido.

Por otro lado, la velocidad inicial de transporte de xilosa para la cepa PTS-Glucosa⁺, calculada en ausencia de glucosa, fue en promedio 36 % más alta que la observada para las PTS⁺ o PTS-Glucosa⁻. Sabemos que una característica de la cepa PTS-Glucosa⁺ es la presencia constitutiva del transportador GalP (el gen se expresa aún en ausencia del inductor natural galactosa) (F. Valle, comunicación personal) y, de acuerdo con reportes anteriores, esta proteína puede transportar varios azúcares además de galactosa, incluyendo glucosa, xilosa y arabinosa (McDonald et al. 1997). Para probar si la diferencia en la velocidad de transporte de xilosa entre la cepa silvestre y la mutante PTS-Glucosa⁺ era debida a la participación de GalP en su transporte, se analizó el comportamiento de la cepa PTS-Glucosa⁻ (NF6) transformada con el vector pCLvGalP. La velocidad de transporte calculada para esta cepa fue 28 % mayor que la obtenida para la cepa PTS-Glucosa⁻ sin transformar. Cabe recordar que el cultivo utilizado para estas mediciones fue realizado usando glucosa como única fuente de carbono, por lo que el transporte de xilosa dependería principalmente de GalP. En consecuencia, el incremento obtenido para la cepa PTS-Glucosa⁻/pCLvGalP1 demostró que el consumo de xilosa en la cepa PTS-Glucosa⁺ es el resultado de las actividades conjuntas de las permeasas específicas de xilosa (codificadas por *xylE* y *xylT*) y de GalP. En resumen, una mutante sin el sistema de la fosfotransferasa (la cepa PTS-Glucosa⁺) es capaz de asimilar mezclas de glucosa y arabinosa simultáneamente, como consecuencia de la ausencia del componente IIA^{Glc} de PTS. La permeasa de arabinosa (AraE) puede transportar esta pentosa libremente, a pesar de la presencia de glucosa.

Debido al co-metabolismo de glucosa y arabinosa en este tipo de cultivos, los azúcares totales presentes en el medio fueron consumidos más rápido y la mutante desarrolló una velocidad de crecimiento mayor que la de la cepa silvestre, tanto en cultivos con un solo azúcar como en mezclas. Estas características poseen un gran interés para propósitos de producción a nivel industrial; la ausencia de represión por glucosa en el metabolismo de algunas pentosas puede ser una propiedad muy útil en cepas industriales para cultivos utilizando medio suplementado con hidrolizados hemicelulósicos de alto contenido de pentosas (Asghari et al. 1996, Li y Frost 1999, Lindstay et al. 1995). En este

sentido, debido a su alta velocidad de crecimiento, el tiempo de fermentación para la mutante será menor al de la silvestre, haciendo posible obtener un incremento en la productividad del metabolito de interés (p. ej: aminoácidos aromáticos) al utilizar estas mutantes. Sin embargo, éstas aún despliegan cierto grado de represión por glucosa sobre el consumo de xilosa.

Como se ha mencionado en trabajos previos publicados por nuestro grupo (Flores et al. 1996, Gosset et al. 1996) y en secciones anteriores de este documento, las mutantes PTS-Glucosa⁺ ofrecen una atractiva opción para el desarrollo de procesos productivos de metabolitos de interés, proteínas recombinantes, asimilación simultánea de mezclas de sustratos y el análisis de represión catabólica y regulación génica entre otras, debido al nuevo ambiente metabólico y regulador que poseen estas mutantes. Sin embargo, la utilización de estas cepas en procesos de producción industrial, requiere de un adecuado conocimiento acerca de las actividades que les permiten poseer el fenotipo glucosa⁺. El método inicial de obtención de cepas PTS-Glucosa⁺ usado por Flores *et al.* (1996) posee algunas desventajas (discutidas también en secciones anteriores): no es totalmente reproducible, ya que no fue posible obtener mutantes glucosa⁺ a partir de todas las cepas probadas y las mutantes generadas no tienen un fondo genético conocido. Debido a lo anterior, surgió la necesidad de realizar un estudio acerca del papel de las proteínas GalP y Glk en el transporte de glucosa en las cepas PTS⁻ y así mismo crear un nuevo método de obtención de mutantes PTS-Glucosa⁺ que cubriera los requerimientos surgidos por el uso y caracterización de las mutantes que ya habían sido aisladas por el método de cultivo continuo (Flores *et al.*, 1996).

Para establecer las condiciones y bases del nuevo método fueron considerados algunos aspectos importantes que a continuación se discuten:

- Cuáles eran los genes involucrados en el fenotipo Glucosa⁺: Por la caracterización de las mutantes generadas anteriormente por Flores *et al.* (1996), se sabe que al menos dos genes se encuentran involucrados en este fenotipo: el gen *galP* que codifica para el transportador de galactosa y el gen *glk* que codifica para una glucocinasa. Sin embargo, al inicio de este trabajo no se tenía la certeza de que solo estos dos genes fueran capaces de generar eficientemente la capacidad de asimilar

glucosa en mutantes deficientes del sistema de la fosfotransferasa. En paralelo, se realizaron estudios por Flores *et al* (En prensa) en los cuales se demuestra que en las mutantes PTS-Glucosa⁺, generadas por cultivo continuo, existen otras enzimas cuya actividad ha sido modificada, específicamente se sabe del caso de Pgi (fosfoglucoasa isomerasa) y Zwf (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa): ambas presentan un incremento en su actividad con respecto al fondo silvestre. La hipótesis planteada sugería que la obtención de los niveles adecuados de expresión transcripcional de estos los genes *galP* y *glk* permitiría obtener mutantes PTS-Glucosa⁺, capaces de desarrollar velocidades de crecimiento similares a la μ_{max} de la cepa parental, utilizando glucosa como única fuente de carbono.

- La mejor opción para alcanzar los niveles de expresión adecuados para *glk* y *galP* era mediante la utilización de un conjunto de promotores constitutivos. Existen varias formas de modular la expresión transcripcional, algunas de ellas son: Realizar modificaciones en una región promotora para obtener promotores que permitan la expresión a diferentes niveles, utilizar promotores diferentes con fuerza variable, emplear vectores con diferentes números de copias ó en el caso de promotores inducibles es posible usar diferentes concentraciones del inductor, entre otras. Analizando estas opciones se decidió que la más adecuada era utilizar fusiones a promotores constitutivos de diferente fuerza para evitar el uso de inductores que pudieran activar la transcripción de otros genes del cromosoma y vectores de alto número de copias que pudieran provocar un efecto negativo por carga metabólica. El conjunto de promotores utilizado fue obtenido mediante mutagénesis dirigida, realizando cambios de una sola base en la secuencia consenso de la caja -35 del promotor *trc*, obteniéndose 4 mutantes con fuerza menor a la del promotor silvestre entre 8 y 85% con respecto al promotor *trc* silvestre.
- Cómo seleccionar el nivel de expresión transcripcional de *galP* y *glk*. Actualmente se sabe que la mejor forma de manipular el flujo de carbono es mediante la optimización de los niveles de actividad enzimática de la vía metabólica de interés, en lugar de sobreexpresar los genes involucrados ya que un exceso de proteína puede tener un efecto negativo en el objetivo que se desea alcanzar. En este trabajo

se utilizó la velocidad de crecimiento como parámetro para evaluar los diferentes niveles de expresión de los genes involucrados en el transporte y fosforilación de glucosa. Es importante mencionar que el nivel de expresión más adecuado para los dos genes, probablemente depende del fondo genético y de la aplicación que se desee dar a las cepas generadas, por lo que, el parámetro de evaluación puede cambiarse para aislar mutantes en diferentes condiciones de cultivo y para diferentes usos y aplicaciones.

En consecuencia, el sistema de expresión generado tiene las siguientes características:

- Los promotores son constitutivos (en el fondo *lacI*), permitiendo la expresión de genes en un nivel relativamente constante durante todas las fases del cultivo.
- Los promotores pueden ser usados simultáneamente para expresar varios genes a diferentes niveles.

Al subclonar este conjunto de promotores fusionados a *glk* y *galP* en vectores de bajo número de copias, fue posible obtener la combinación de promotores mutantes que permitió lograr el nivel de expresión adecuado para reconstituir el fenotipo Glucosa⁺ desarrollando velocidades de crecimiento similares a la cepa silvestre. Cabe mencionar que la caracterización completa de estos promotores fue realizada mediante el análisis de ensayos enzimáticos para las fusiones al gen *glk*, clonadas en vectores de bajo número de copias. En este análisis se observó que existe mayor actividad de Glk en estas condiciones, que cuando se usan cepas transformadas con vectores que además de la fusión *trc*glk* contienen la fusión a *galP* en el mismo plásmido. Este resultado puede ser debido a una menor expresión transcripcional por efecto de competencia entre las regiones promotoras cercanas contenidas en el vector por la RNA polimerasa. Adicionalmente, se trató de encontrar una correlación entre la velocidad de crecimiento obtenida por las mutantes y los valores de actividad enzimática de Glk y velocidad de transporte de glucosa medidos. Sin embargo, no fue posible correlacionarlos debido a que los valores encontrados experimentalmente fueron

significativamente menores a los calculados por la ecuación 3 presentada en la sección de Resultados.

Un resultado importante y que no se esperaba, fue la reconstitución de la capacidad de asimilar glucosa por cepas deficientes de PTS expresando solo el gen *galP* bajo el control del promotor *trc1* ó *trc4*. Con la expresión de *galP* fue posible obtener una velocidad de crecimiento 20% menor a la obtenida al expresar los dos genes (*glk* y *galP*).

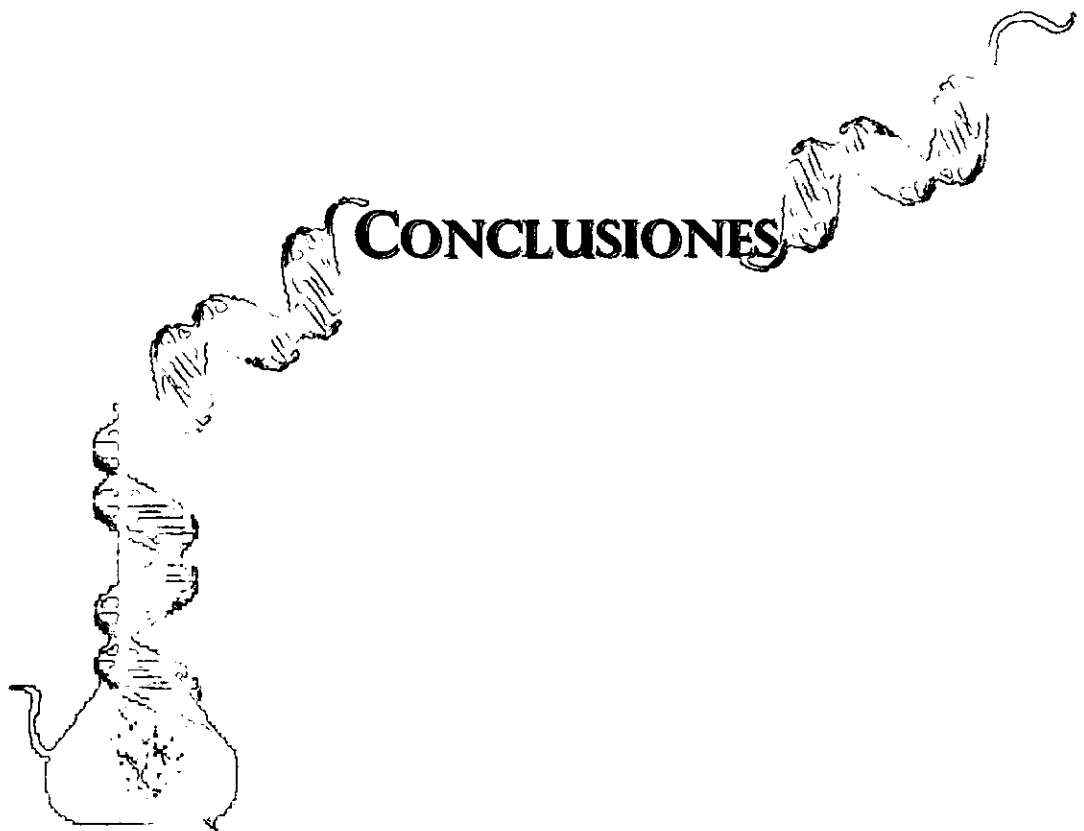
La primera evaluación de la expresión individual de *galP* fue realizada expresando este gen bajo el control del promotor *trc1* (silvestre) en el vector de bajo número de copias pCL1920. Debido a que *trc* es un promotor fuerte, existía la posibilidad de que un exceso de GalP en membrana fuera la causa de este decremento en la velocidad de crecimiento. Además, por la caracterización realizada se sabe que al expresar ambos genes bajo el promotor silvestre se mantiene la alta velocidad de crecimiento. Por esta razón, se tenían dudas de cual era el motivo por la cual no se obtenía la misma velocidad de crecimiento al expresar sólo *galP* que al expresar los dos genes. Para aclarar esta duda, se realizaron cultivos de la cepa PTS⁻ expresando *galP* bajo un promotor más débil (*trc4*), como el usado en la cepa VH32/pvGlkGalP54 que desarrolla una velocidad de crecimiento igual a la de la cepa silvestre expresando los genes *glk* y *galP*, al utilizar los promotores mutantes más débiles (*trc4* y *trc5*). Con esta fusión, es posible disminuir la expresión de este gen hasta en un 90% con respecto a la fusión al promotor *trc* silvestre y, sin embargo, se obtuvo la misma velocidad de crecimiento al expresar *galP* con los promotores *trc1* ó *trc4*. Este resultado indica que el gen *galP* posee mayor relevancia que *glk* en la reconstitución del fenotipo Glucosa⁺, debido a que la expresión individual del gen de la glucocinasa no permite reconstituir la capacidad de asimilar glucosa, contrario a lo observado con la expresión individual de *galP*. Sin embargo, para que una mutante PTS⁻ alcance una velocidad de crecimiento igual a la cepa silvestre parental, se requiere la expresión adecuada de ambos genes *galP* y *glk*.

Por otro lado, las mutantes PTS-Glucosa⁺ generadas en este trabajo desarrollan velocidades de crecimiento ligeramente diferentes cuando son cultivadas en matraz o en fermentador, sin embargo conservan la misma tendencia. Para cultivos de fermentador, los

valores de μ son menores a los observados en matraz en un rango variable de 0.08 a 0.1 h⁻¹, el motivo por el cual la velocidad de crecimiento disminuye en el fermentador no es muy claro, ya que estos cultivos se llevan a cabo en condiciones controladas de pH y temperatura y con mejor aireación, por lo que la concentración de oxígeno disuelto nunca es menor a 20%, a diferencia de los cultivos en matraz en los que solo se controla la temperatura ambiental. Los cultivos en fermentador permitieron verificar que la causa por la que las mutantes PTS-Glucosa⁺ presentan un menor rendimiento biomasa-sustrato es que producen más ácido acético que la cepa silvestre, posiblemente a causa de un exceso en el flujo de la vía glicolítica.

En estas condiciones, un flujo acelerado en la vía glicolítica puede considerarse como una desventaja, porque como consecuencia de ello, tienen mayor producción de acetato y por lo tanto menor rendimiento biomasa/sustrato, porque la presencia de acetato en el medio de cultivo es un inhibidor del crecimiento (Luli *et al*, 1990. Ponce 1999). Sin embargo, esto podría ser una ventaja si estas mutantes son modificadas para desviar el flujo de carbono hacia la vía de producción de un metabolito de la vía común o de la vía del PEP o piruvato, ya que potencialmente serían capaces de mantener rendimientos altos de producto y desarrollar productividades mayores que la cepa silvestre. La evaluación de esta característica se realizó mediante el desvío del flujo de carbono hacia la producción de etanol, utilizando un vector de expresión que contiene los genes *pdh* y *adhB*, obteniéndose un incremento del 150% en el rendimiento etanol/biomasa y 100% en la productividad específica de etanol creciendo en aerobiosis. Este resultado corrobora la propuesta planteada: las mutantes PTS-Glucosa⁺ son capaces de desarrollar velocidades de producción específica mayores que la cepa silvestre.

VIII



Finalmente, del trabajo descrito en este documento se desprenden las siguientes Conclusiones:

- * En un fondo PTS-Glucosa⁺ no se lleva a cabo el efecto de represión catabólica por glucosa sobre el consumo de arabinosa, por lo que esta mutante es capaz de cometabolizar estos dos azúcares en sus mezclas y también en mezclas triples de glucosa-arabinosa-xilosa. En mezclas de glucosa-xilosa y glucosa-arabinosa-xilosa aún se presenta represión por glucosa sobre el consumo de xilosa.
- * En base a los resultados obtenidos, es posible pensar que en un fondo silvestre existen diferentes mecanismos de represión por glucosa para la asimilación de xilosa ó arabinosa.
- * El efecto de represión catabólica por glucosa sobre el transporte y consumo de xilosa en la cepa PTS-Glucosa⁺ es menor que el desarrollado en una cepa silvestre y depende de la presencia intracelular de glucosa a través de un mecanismo desconocido.
- * Las diferencias observadas en la regulación de la asimilación de azúcares por la mutante PTS-Glucosa⁺ le permite asimilar mezclas de azúcares a una mayor velocidad que la cepa parental. El consumo volumétrico de los azúcares totales para la mutante es 19% menor que el de la silvestre.
- * Se generó un conjunto de promotores que permite la modulación de la expresión de genes en un rango de 8% a 100%. Estos promotores pueden tener usos múltiples al ser constitutivos en un fondo *lacI⁻* o regulables por IPTG en un fondo *lacI⁺*.
- * La expresión del gen *galP* es suficiente para reconstituir la capacidad de asimilar glucosa en cepas de *Escherichia coli* PTS⁻, alcanzando una la velocidad de crecimiento tan solo 20% menor a la desarrollada por la cepa silvestre parental.

- * La expresión de *galP* y *glk* bajo el conjunto de promotores *trc** en vectores de bajo número de copias permite reconstituir el fenotipo Glucosa⁺ en cepas de *Escherichia coli* *PTS-lacI* desarrollando velocidades de crecimiento iguales a la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre que les dio origen.
- * Se generó un método reproducible para la obtención de cepas de genotipo conocido capaces de transportar glucosa rápidamente a pesar de no contar con un sistema PTS funcional (fenotipo PTS-Glucosa⁺).
- * Una mutante PTS-Glucosa⁺ posee una mayor capacidad de producción específica de etanol que la cepa silvestre, el valor de velocidad específica de producción obtenido para ella fue el doble del calculado para la cepa silvestre en condiciones de aerobiosis.

IX



- * Analizar el mecanismo por el cuál *Escherichia coli* desarrolla un consumo preferencial de pentosas. Así como tratar de definir las diferencias, si es que estas existen, entre la regulación del consumo preferencial de pentosas en una cepa silvestre y en una mutante PTS⁻. En base al conocimiento generado a través de este análisis proponer una estrategia para eliminar este efecto.

- * A pesar que no se conoce exactamente el mecanismo por el cual se regula la asimilación secuencial de pentosas, se sabe que la presencia de AraC provoca la asimilación preferencial de arabinosa sobre xilosa. Por lo que la proteína AraC puede estar involucrada en la regulación negativa de la transcripción del operón *xyl*. Una estrategia para evitar el consumo secuencial de arabinosa y xilosa podría ser el cambio de la región reguladora del operón de xilosa *xylAB* (codifican para una isomerasa y una cinasa específicas para el metabolismo de xilosa) y del *xylE* (codifica para el transportador de baja afinidad de xilosa) por una región de regulación que permita la expresión constitutiva de estos genes.

- * Obtener mutantes que posean las fusiones de *trc** a los genes *glk* y *galP* en monocopia integradas al cromosoma. Para no afectar ningún otro locus en *E.coli*, es posible obtener este genotipo cambiando solo la región promotora silvestre de los genes *galP* y *glk* presentes en el cromosoma por los promotores derivados de *trc*.

- * Realizar la selección de los niveles de expresión adecuados para las fusiones de *trc** a los genes *glk* y *galP* integrados en cromosoma, basándose en un criterio de interés específico (μ , productividad, etc.)

- * Evaluar el crecimiento y productividad de estas mutantes PTS-Glc⁺ en medio mínimo suplementado con mezclas de azúcares ó hidrolizados lignocelulósicos.

X



Asghari, A., Bothast, R. J., Doran, J. B., Ingram, L. O. 1996. Ethanol production from hemicellulose hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KO11. *J. Ind. Microbiol.* **16**: 42-47.

Bauer, K., Bassat, A.B., Dawson, M., Puente, V.T. and Neway, J.O. 1990. Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotranscetylase mutant. *App. Environ. Microbiol.* **56**:1296-1302

Beall, D.S., Ohta, K., Ingram, L.O. 1991. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering.* **38**: 296-303.

Berry, A. 1996. Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Reviews.* **14**: 250-256

Blanch, H.W., Clarck, D.S. 1997. pp. 185-192 in *Biochemical Engineering.* Marcel Dekker, inc. USA

Bothast, R.J., Nichols, N.N., Dien, B.S. 1999. Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnol. Prog.* **15**:867-875

Brosius, J., Erfle, M. Storella, J. 1985. Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. *J. Biol. Chem.* **260**: 3539-3541.

Chatterjee R, Millard CS, Champion K, Clark DP and Donnelly MI. 2001. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **67**:148-154.

Chaplin, M. F., Kennedy, J. F. 1987. Monosaccharides, p. 3. *Carbohydrate analysis. A practical approach.* IRL Press. Oxford, England.

Chen R, Yap WMGJ, Postma PW and Bailey JE. 1997. Comparative studies of *Escherichia coli* strains using different glucose uptake systems: metabolism and energetics. *Biotechnol. Bioeng.* **56**:583-590.

Chou CH, Bennett GN, San KY. 1994. Effect of modulated glucose uptake on high-level recombinant protein production in a dense *Escherichia coli* culture. *Biotechnol Prog* **10**:644-647.

Dale, B.E. 1999. Biobased industrial products: bioprocesses engineering when cost really counts. *Biotechnol. Prog.* **15**:775-776

Epstein, W., Rothman-Denes, L.B., Hesse, J. 1975. Adenosine 3', 5' - cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 2300-2304.

Farmer, W.R. and Liao J.C. 2000. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control. *Nat. Biotechnol.* **18**:533-537.

Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., Valle, F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **4**: 620-623.

Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A.A. and Bolívar, F. 2001. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labelling and NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering. En prensa*

Frost JW and Draths KM. 1995. Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:557-579.

Gosset, G., Yong-Xiao, J., Berry, A. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 47-52.

Hernández, V., Valle, F., Bolivar F. and Gosset G. 2001. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system (PTS). *Appl Microbiol Biotechnol* **57**: 186-191.

Hogema, B. M., Arents, J. C., Bader, R., Eijkemans, K., Inada, T., Postma, P. W. 1998a. Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**: 755-765.

Hogema, B.M., Arents, J.C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., Postma, P. 1998b. Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Mol. Microbiol.* **30**: 487-498.

Holms, W. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationships between flux and control at the branch point, efficiency of conversion to biomass and excretion of acetate. pp 69-105. *Current topics in cellular regulation*. Horecker, B.L. y Stadman, E.R. (Eds). Academic Press, New York, USA.

Ingram L.O., Conway, T. 1988. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in Recombinant Strains of *Escherichia coli*. *App Environ Microbiol* **54**:397-404

Ingram, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., York, S. W. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol Bioeng* **58**: 204-214

Jensen, P.R., Westerhoff, H.V. and Michelsen O. 1993. The use of *lac*-type promoters in control analysis. *Eur. J. Biochem.* **211**: 181-191.

Jensen, P.R., Hammer, K. 1997. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnology and Bioengineering.* **58**(2-3):191-195.

Jensen, R., Hammer, P.K. 1998. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *App and Env Microbio.* 64(1): 82-87.

Kang, H., Song, S., Park, C. 1998. Priority of pentose utilization at the level of transcription: arabinose, xylose, and ribose operons. *Molecules and Cells* 8: 318-323.

Lerner, C.G., Inouye, M. 1990. Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. *Nucleic Acids Research* 18: 4631.

Lessie, T.G., VanderWyk, J.C. 1972. Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases: differences in size, pyridine nucleotide specificity, and susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate. *J. Bacteriol.* 3, 110: 1107-1117.

Levy, S., Zeng, G.Q., Danchin, A. 1990. cAMP synthesis in strains bearing well characterized deletions in the central pts genes of *Escherichia coli*. *Gene* 86:27-33

Li, K., Frost, J.W. 1999. Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: a comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources. *Biotech. Prog.* 15:876-883

Lindsay, S.E., Bothast, R.J., Ingram, L.O. 1995. Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:70-75

Lugar, R.G., Woolsey, R.F. 1999. The new petroleum. *Foreign affairs.* 78:88-102

Luli, G.W., Strohl, W.R. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and feed-batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1004-1011.

Lux, R., Munasinghe, V.R.N., Castellano, F., Lengeler, J. W., Corrie, J. E. T., Khan, Shahid. 1999. Elucidation of a PTS-Carbohydrate chemotactic signal pathway in *Escherichia coli* using a Time-resolved behavioral assay. *Mol Biol Cell* **10**: 1133-1146

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Martinez, A., York, S.W., Yomano, L.P., Pineda, F.C., Davis, F.C., Shelton, J.C., Ingram, L.O. 1999. Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdc*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progress* **15**: 891-897

Mascarenhas, D. 1987. Tryptophan producing microorganisms. Patent W087/01130.

McDonald, T. P., Walmsley, A. R., Henderson, P. J. F. 1997. Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H⁺ symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J. Biol. Chem.* **272**: 15189-15199.

Meyer, D., Schneider-Fresenius, C., Horlacher, R., Peist, R., Boos, W. 1997. Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bac.* **179**(4): 1298-1306.

Miller, J.E., Backman, K.C., O'Connor M.J. and Hatch R.T. 1987. Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* **2**:143-149.

Monod, J. 1942. *Recherches sur la croissance des cultures Bactériennes.* Hermann et Cie, Paris **911**: 1-215.

Moyle, H., Waldburger, C., Susskind, M.M. 1991. Hierarchies of base pair preferences in the P22 *ant* promoter. *J. Bacteriol.* **173** (6): 1944-1950.

Nakamori, S., Kobayashi, S., Kobayashi, C. and Takagi H. 1998. Overproduction of L-cysteine and L-cystine by *Escherichia coli* strains with a genetically altered serine acetyltransferase. *Appl Environ Microbiol* **64**:1607-1611.

Narang, A., Konopka, A., Ramkrishna, D. 1997. New patterns of mixed-substrate utilization during batch growth of *Escherichia coli* K12. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 747-757.

Neidhardt, F.C., Ingraham, J. L., Schaechter, M. 1990. Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. Sinauer Associates, Inc Publishers. Massachusetts, USA.

Niederberger, P., Prasad, R., Miozzari, G., Kacser, H. 1992. A strategy for increasing an *in vivo* flux by genetic manipulations. *Biochem J.* **287**: 473-479.

Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugan, K. T., Ingram, L. O. 1991. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl Environ Microbiol.* **57**(4): 893-900.

Parr T.R., Saier, M.H. 1992. The bacterial phosphotransferase system as a potential vehicle for the entry of novel antibiotics. *Res. Microbiol.* **143**: 443-447

Ponce E. 1999. Effect of growth rate reduction and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *J Biosc Bioengineering.* **87**(6): 775-780

Pospiech, A., Nuemann, B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genetics* **11**: 217-218

Postma, P.W., Lengeler, J.W. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543-594.

Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G. R. 1996. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems, p. 1149-1174. Neidhardt, F. C. (ed. in chief).

Escherichia coli and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Rajagopal, B.S., DePonte, J., Tuchman, M, and Malamy, M.H. 1998. Use of inducible feedback-resistant *N*-acetylglutamate synthetase (*argA*) genes for enhanced arginine biosynthesis by genetically engineered *Escherichia coli* K-12 strains. *Appl Environ Microbiol* **64**:1805-1811.

Rodriguez, R.L., Tait, R.C. 1983. Recombinant DNA techniques: an introduction. Addison-Wesley Publishing Company. Advanced Book Program Reading, Massachusetts, USA, 236 pp

Saier, M. H. Jr, Bromberg, F. G. y Roseman, S. 1973. Characterization of constitutive galactose permease mutants in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **113**:512-514.

Saier, M. N., Reizer, J. 1994. The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* **13**(5): 755-764

Saier, M. N., Ramseier, T.M., Reizer, J. 1996. Regulation of carbon utilization, p. 1325-1343. Neidhardt, F. C. (ed. in chief). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Saier, M.H. 1998. Multiple mechanisms controlling carbon metabolism in bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 170-174.

Saier M.H. 2000. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J. Bacteriol.* **182**: 5029-5035.

Sharma, R. C., Schimke, R. T. 1996. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**: 44-46

Sheehan, J., Himmel, M. 1999. Enzymes, Energy, and Environment: A Strategic Perspective on the U.S. Department of Energy's Research and Development Activities for Bioethanol. *Biotechnol. Prog.* **15**: 817-827.

Sigüenza, R., Flores, N., Hernández, G., Martínez, A., Bolivar, F., Valle, F. 1999. Kinetic characterization in batch and continuous of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *W. J. of Microbiol. Biotechnol.* **15**: 587-592.

Silhavy, T., Berman, M., Enquist, L. 1984. pp110-112 in Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sim, S.J., Snell, K.D., Hogan, S.A., Stubbe, J., Rha, C. and Sinskey, A.J. 1997. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. *Nat. Biotechnol.* **15**:63-67.

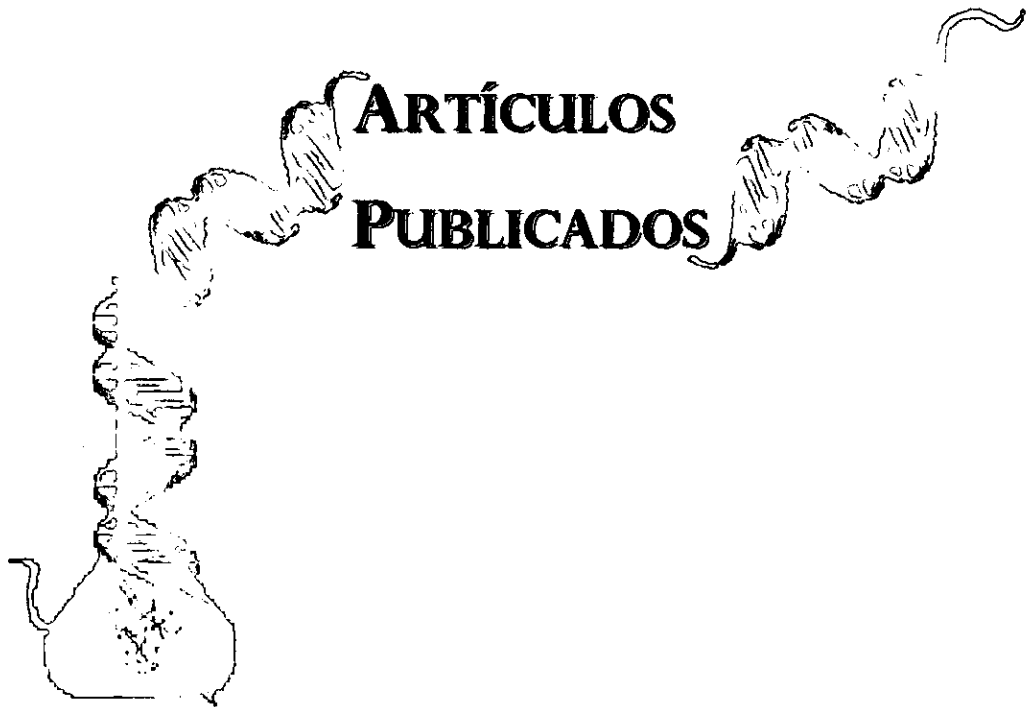
Snoep, J.L., Arfman, N., Yomano, L.P., Fliege, R.K., Conway, T., Ingram, L.O. 1994. Reconstitution of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J. Bacteriol.* **176**:2133-2135.

Stephanopoulos, G.N., Aristidou, A.A., Nielsen, J. 1998. Metabolic Engineering. Principles and Methodologies. Academic Press. USA.

Valle, F., Muñoz, E., Ponce, E., Flores, N., Bolivar, Z. 1996. Basic and applied aspects of metabolic diversity: the phosphoenolpyruvate node. *J Ind Microbiol* **17**: 458-462

White, D. 1995. The physiology and biochemistry of prokaryotes. Oxford University Press. USA

XI



V. Hernández-Montalvo · F. Valle · F. Bolívar
G. Gosset

Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system

Received: 21 February 2001 / Received revision: 30 May 2001 / Accepted: 11 June 2001 / Published online: 24 July 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract Due to catabolite repression in microorganisms, sugar mixtures cannot be metabolized in a rapid and efficient manner. Therefore, the development of mutant strains that avoid this regulatory system is of special interest to fermentation processes. In the present study, the utilization of sugar mixtures by an *Escherichia coli* mutant strain devoid of the phosphotransferase system (PTS) was characterized. This mutant can transport glucose (PTS⁻ Glucose⁺ phenotype) by a non-PTS mechanism as rapidly as its wild-type parental strain. In cultures grown in minimal medium supplemented with glucose-xylose or glucose-arabinose mixtures, glucose repressed arabinose- or xylose-utilization in the wild-type strain. However, under the same culture conditions with the PTS⁻ Glucose⁺ mutant, glucose and arabinose were co-metabolized, but glucose still exerted a partial repressive effect on xylose consumption. In cultures growing with a triple mixture of glucose-arabinose-xylose, the wild-type strain sequentially utilized glucose, arabinose and finally, xylose. In contrast, the PTS⁻ Glucose⁺ strain co-metabolized glucose and arabinose, whereas xylose was utilized after glucose-arabinose depletion. As a result of glucose-arabinose co-metabolism, the PTS⁻ Glucose⁺ strain consumed the total amount of sugars contained in the culture medium 16% faster than the wild-type strain. [¹⁴C]-Xylose uptake experiments showed that in the PTS⁻ Glucose⁺ strain, galactose permease increases xylose transport capacity and the observed par-

tial repression of xylose utilization depends on the presence of intracellular glucose.

Introduction

Glucose is the main carbon source used in the fermentation industry. However, for production of some bulk chemicals, it is expensive as a raw material (Dale 1999; Lugar and Woolsey 1999; Sheehan and Himmel 1999). Hence, the availability of alternative and less expensive carbon sources is highly desired. One possible source could be lignocelulosic hydrolysates that contain mixtures of glucose, arabinose, xylose and small amounts of galactose and mannose (Asghari et al. 1996; Bothast et al. 1999; Sheehan and Himmel 1999). When these hydrolysates are utilized as a carbon source, bacteria display a catabolic repressive effect that does not permit the simultaneous consumption of all sugars, i.e. sugars are sequentially consumed resulting in several exponential growth phases that are separated by intermediate lag phases, developing so-called diauxic growth (Monod 1942; Epstein et al. 1975). Catabolite repression and inducer exclusion are the main mechanisms by which cells select the order in which the sugars are metabolized (Postma and Lengeler 1993; Postma et al. 1996; Saier et al. 1996). This response is mediated mainly by one of the enzymes of the phosphotransferase system (PTS), i.e. enzyme IIA^{Glucose} (Hogema et al. 1998). Using phosphoenolpyruvate (PEP) as the phosphoryl donor, the PTS catalyzes the transport and concomitant phosphorylation of several sugars, and it also coordinately modulates both cytoplasmic inducer and cAMP levels in a way that can account for repression of enzyme synthesis (Postma et al. 1996). *Escherichia coli* strains lacking the PTS exhibit pleiotropic effects and cannot grow on a wide variety of carbon sources including both PTS and non-PTS sugars (Flores et al. 1996; Postma et al. 1996).

Our group has previously reported a method for the isolation of *E. coli* mutants with an inactive PTS, which can metabolize glucose and achieve high growth rates

V. Hernández-Montalvo · F. Bolívar · G. Gosset (✉)
Departamento de Microbiología Molecular,
Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca,
62210 Morelos, México
e-mail: gosset@ibt.unam.mx
Tel.: 52-7-3291601, Fax: 52-7-3172388

F. Valle
Genencor International Inc, Palo Alto, CA 94304, USA

G. Gosset
Dept. de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3,
Cuernavaca, Mor. 62271 México

(PTS⁻ Glucose⁺ phenotype) (Flores et al. 1996). In these mutants, rapid glucose consumption is dependent on a functional galactose permease (*galP*) gene in the chromosome (Flores et al. 1996); therefore, it is assumed that the transporter protein GalP internalizes glucose. Internal glucose should be phosphorylated and the enzyme that can catalyze this reaction is glucokinase. Partial characterization of these PTS⁻ Glucose⁺ strains revealed that the level of glucokinase is higher than that present in the parent wild-type strain (S. Flores, personal communication). Interestingly, despite the absence of the PTS, characterization of these strains has shown that some of them are able to utilize other sugars (Flores et al. 1996), including PTS class I and II compounds not metabolized by PTS⁻ strains (this PTS compound classification has been reported previously by Postma et al. 1996).

Industrial interest in PTS⁻ Glucose⁺ strains comes from the expected increase in metabolic availability of the precursor molecule PEP, which results from the elimination of PTS-dependent PEP consumption for glucose transport. Characterization of these mutant strains has revealed that they can synthesize aromatic compounds with higher yield and productivity than a wild-type strain (Flores et al. 1996; Gosset et al. 1996; Baez et al. 2001). These results confirm that PEP availability has increased significantly as a result of PTS inactivation.

The purpose of this work was to extend our knowledge of the physiology of the PTS⁻ Glucose⁺ phenotype with regard to sugar mixtures consumption. We studied the capability of one of these *E. coli* PTS⁻ Glucose⁺ mutants, the NF9 strain (Flores et al. 1996), to utilize the three more abundant sugars in hemicellulosic hydrolysates of hardwood and agricultural residues: D-glucose, D-xylose and L-arabinose (Asghari et al. 1996; Li and Frost 1999; Sheehan and Himmel 1999). It was found that this strain could simultaneously metabolize D-glucose and L-arabinose. As a result of this characteristic, the PTS⁻ Glucose⁺ strain consumed total sugars in a culture containing glucose, arabinose and xylose, faster than a wild-type strain.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

E. coli strains used in this study: parent strain PB103, F⁻ *ΔlacU169 trpR, tnaA2*, a Trp⁺ derivative of strain C534 (Mascarenhas 1987). In this work, strain PB103 is referred to as wild type. NF6 is a PTS⁻ Glucose⁻ derivative of PB103, obtained by P1 *vir* phage transduction using TPB2811 as a donor as described by Silhavy et al. (1984). NF9 is a PTS⁻ Glucose⁺ derivative of NF6, obtained by a selection method using a chemostat as described by Flores et al. (1996). TP2811: F⁻, *xyl, argH1, lacX74, aroB, ilvA, Δ(ptsH, ptsI, crr)::Km^R* (Levy et al. 1990). Plasmid pCLvGalP1 is a pCL1920 (Lerner and Inouye 1990) derivative containing the *galP* gene controlled by the *trc* promoter (Brosius et al. 1985).

Inoculum preparation

Strains from frozen vials were inoculated in 125 ml flasks containing 25 ml of M9 minimal medium (Maniatis et al. 1989) supple-

mented with 1% tryptone. Flasks were incubated for 12 h at 37°C and 300 rpm in an orbital shaker (G25, New Brunswick Inc., NJ). Kanamycin (33 mg/l) was added to all NF6 and NF9 cultures.

Fermenter cultures

One liter of M9 minimal medium supplemented with 2 g/l of sugar (or 1 g/l of each sugar for mixtures) was used in a baffled stirred tank fermenter equipped with a six-blade Rushton turbine and controlled by BLSL Biolafitte Maestro (Biolafitte, Princeton, NJ). Working conditions were 600 rpm, 1 vvm (air volume × media volume⁻¹ min⁻¹), 37°C and pH 7 (controlled by automatic additions of 2.5% NH₃). All cultures were initiated at an OD₆₀₀ of 0.05. Specific sugar consumption rates were calculated from the exponential growth data as the ratio between the specific growth rate and biomass yield.

Analytical methods

Biomass determination

Optical density was measured at 600 nm in a spectrophotometer (Lambda 11 Perkin Elmer, Pomona, Calif.). Culture data represent the average of at least two fermentations; OD₆₀₀ was converted to dry cellular weight using a standard curve (1 OD₆₀₀=0.37 g/l of dry cellular weight).

Sugar analysis

Glucose was determined with an enzymatic analyzer (EKTACHEM DT60 II multiple analyzer, Kodak, N.Y.). Xylose was determined by HPLC using a Waters amino carbohydrate column (WAT044355, Waters, Milford, Mass.) and acetonitrile, 80% in water, as the mobile phase (1.4 ml/min) at 28°C. Arabinose concentration was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) technique (Chaplin and Kennedy 1987). In sugar mixtures, arabinose concentration was calculated by determining total sugars with the DNS technique and subtracting glucose and xylose content as determined by the previously described methods.

Acetate analysis

Acetate concentration was determined by HPLC using a ROA-organic acid column (300×7.8 mm, OOH-0138-KO, Phenomenex, Torrance, Calif.), and 5 mM H₂SO₄ as the mobile phase (0.5 ml/min) at 50°C.

Measurement of initial rates of [¹⁴C]-xylose uptake

Strains were grown overnight in 250 ml flasks, with 50 ml of M9 medium supplemented with 2 g/l of xylose at 37°C and 300 rpm. This culture was used to inoculate 250 ml flasks, with 50 ml M9 medium supplemented with 2 g/l of glucose, at an OD₆₀₀ of 0.3, and grown for 2 h at 37°C and 300 rpm. Cells were harvested (5,000 g for 10 min) cooled on ice, washed in 1× M9 salts and resuspended in the same medium without sugars at an OD₆₀₀ of 1. For the [¹⁴C]-xylose uptake assays, 540 μl of cell suspension was incubated 10 min at 37°C, then the reaction was started by the addition of 60 μl of [¹⁴C]-xylose (0.5 mM, 5 mCi/mmol). For glucose repression experiments, 30 μl of [¹⁴C]-xylose (1 mM, 5 mCi/mmol) and 30 μl of glucose (10 mM) were added to the cell suspension. The reaction was kept at 37°C with shaking and 50 μl samples were taken at 1, 3, 7, 9, 11 and 13 min. Samples were filtered immediately through membrane filters (pore size: 0.45 μm) and washed three times with M9 salts. Filters were dried and placed in vials with 5 ml of Ecolite scintillation cocktail (ICN Biomedicals, Costa Mesa, Calif.). Radioactivity was measured in a scintillation counter. The [¹⁴C]-xylose uptake rates were calculated from the initial linear data in a plot of intracellular [¹⁴C]-xylose vs time.

Results

Growth kinetics for wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strains cultured on single and dual sugar combinations

In order to determine the kinetic parameters for batch cultures with single sugars, the wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strains were grown in M9 minimal medium supplemented with one of the following three sugars: glucose, arabinose or xylose. Biomass yield, specific growth rate and specific sugar consumption rate were determined for all cultures (Table 1). A comparison between the wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strain showed that the specific growth rates on single sugars were always slightly slower for the latter strain. Interestingly, biomass yield on arabinose for the PTS⁻ Glucose⁺ strain was 28% higher than that found for the wild-type strain.

Cultures containing two sugars were carried out to evaluate if the glucose repression effect over arabinose or xylose consumption occurs in the PTS⁻ Glucose⁺ strain. As a control, the wild-type strain was cultivated under the same conditions. As seen in Fig. 1, the wild-type strain showed a lag phase between 6 and 6.5 h of cultivation with glucose-arabinose and between 9 and 10 h of cultivation with glucose-xylose mixtures. Accordingly, sugars were consumed sequentially (Fig. 1B, C). The point where glucose is exhausted coincides with the temporary growth rate decrease (Fig. 1A). These data are indicative of diauxic growth in these cultures. With regard to acetate production, the same amount was accumulated for both wild-type cultures (0.38 g/l). Rates of growth and sugar consumption, determined during the glucose consumption period, are similar to those obtained for the single glucose cultures (Table 1).

In dual-sugar cultures with the PTS⁻ Glucose⁺ strain, no lag phases were observed (Fig. 1A). Measurements of sugar consumption in cultures with glucose and arabinose clearly showed that both sugars were consumed

simultaneously (Fig. 1C). In this culture, the specific growth rate was 0.52 h⁻¹, 21% faster than that measured for the wild-type strain metabolizing glucose on single or dual sugar combinations. In glucose-xylose cultures, xylose consumption started after 9 h when cells were still consuming glucose. This result indicated that catabolite repression occurred in these conditions, but it was less severe in this strain than in the wild-type (Fig. 1B). Interestingly, no lag phase was observed, as only a single exponential growth phase with a specific growth rate of 0.42 h⁻¹ was determined. Concerning the production of acetic acid, it reached final concentrations of 0.25 and 0.04 g/l for glucose-arabinose and glucose-xylose mixtures, respectively (Fig. 1D).

Growth kinetics for wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strains cultured on the triple sugar combination, glucose, arabinose and xylose

The PTS⁻ Glucose⁺ strain and its parental wild-type strain were grown in the simultaneous presence of glucose, arabinose and xylose (Fig. 2). As expected, the wild-type strain sequentially consumed these three sugars, which were exhausted after 13 h (Fig. 2B). Three specific growth rates were calculated, one for each carbohydrate assimilation period: 0.47 h⁻¹ for glucose, 0.51 h⁻¹ for arabinose-xylose and 0.17 h⁻¹ for xylose (Table 1). The third growth rate, corresponding to the xylose consumption period, was significantly slower than that observed for single xylose cultures. This reduction in specific growth rate could be caused by accumulated acetate (0.28 g/l).

In contrast, PTS⁻ Glucose⁺ cultures consumed the triple sugar mixture in 11 h (Fig. 2C) and developed only two consumption periods, the first for glucose and arabinose growing at 0.54 h⁻¹, and the second for xylose growing at 0.26 h⁻¹ (Table 1). Interestingly, the growth

Table 1 Kinetic parameters for batch fermenter cultures of wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strains grown in minimal medium supplemented with single, dual and triple sugar mixtures as carbon

| Sugar | Wild-type strain | | | PTS-Glucose ⁺ strain | | |
|-----------------|---|--|---|--|---|---|
| | Specific growth rate (h ⁻¹) | Biomass yield (g _{biomass} /g _s) | Specific sugar consumption rate (g _s /g _{biomass} ·h) | Specific growth rate (h ⁻¹) | Biomass yield (g _{biomass} /g _s) | Specific sugar consumption rate (g _s /g _{biomass} ·h) |
| Glucose | 0.42 | 0.32 | 1.28 | 0.36 | 0.31 | 1.15 |
| Ara | 0.48 | 0.39 | 1.25 | 0.42 | 0.5 | 0.84 |
| Xyl | 0.37 | 0.45 | 0.89 | 0.34 | 0.36 | 0.94 |
| Glucose-Ara | 0.43 _{Glucose} 0.33 _{Ara} | 0.39 _{Glucose} 0.32 _{Ara} | 1.09 _{Glucose} 1.04 _{Ara} | 0.52 | 0.49 | 1.06 _{Glucose+Ara} |
| Glucose-Xyl | 0.48 _{Glucose} 0.23 _{Xyl} | 0.42 _{Glucose} 0.32 _{Xyl} | 1.14 _{Glucose} 0.71 _{Xyl} | 0.42 | 0.55 | 0.77 _{Glucose+Xyl} |
| Glucose-Ara-Xyl | 0.47 _{Glucose} 0.51 _{Ara+Xyl} 0.17 _{Xyl} | 0.6 _{Glucose} 0.3 _{Ara+Xyl} 0.6 _{Xyl} | 0.78 _{Glucose} 1.5 _{Ara+Xyl} 0.28 _{Xyl} | 0.54 _{Glucose+Ara} 0.26 _{Xyl} | 0.5 _{Glucose+Ara} 0.41 _{Xyl} | 1.1 _{Glucose+Ara} 0.65 _{Xyl} |

^a Average from at least two independent fermentations for each test, with relative errors lower than 10%

source^a. Initial glucose, arabinose (*Ara*) and xylose (*Xyl*) concentrations were 2 g/l for single sugar cultures and 1 g/l for sugar mixtures

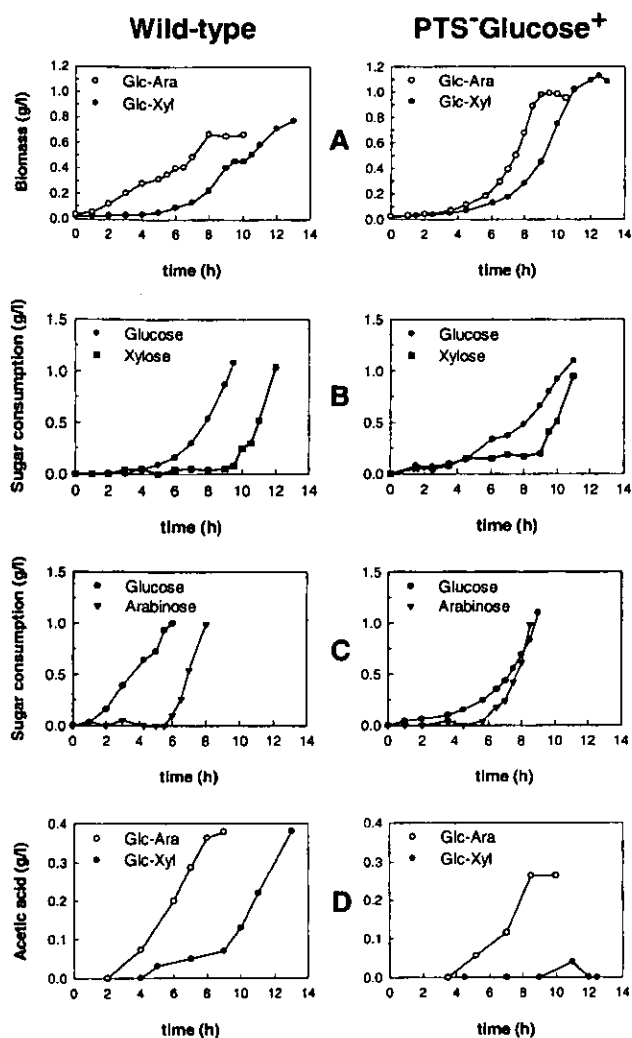


Fig. 1A–D Comparative growth of the wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strains in minimal medium supplemented with a mixture of glucose and arabinose (*Glc-Ara*) or glucose and xylose (*Glc-Xyl*). The initial concentration of each sugar was 1 g/l. **A** Growth curves; **B**, **C** sugar consumption for wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strains: (●) glucose, (▼) arabinose and (■) xylose; **D** acetic acid accumulation

rate for the first period was significantly higher than those obtained for its corresponding single sugar cultures: 0.36 h⁻¹ for glucose and 0.42 h⁻¹ for arabinose. The growth rate on xylose was considerably slower than that observed for the single xylose culture, as for the wild-type strain this might be because of accumulated acetate (0.45 g/l). Since the mutant maintained higher specific growth rates during the triple sugar culture, the total fermentation time was 16% shorter than that of the wild-type. Regarding the specific sugar consumption rate for the glucose-arabinose assimilation period, it was equal to that determined for the corresponding dual-sugar mixture cultures. In contrast, the consumption rate for xylose was notably slower than that determined for single xylose cultures, as observed also for the dual-sugar

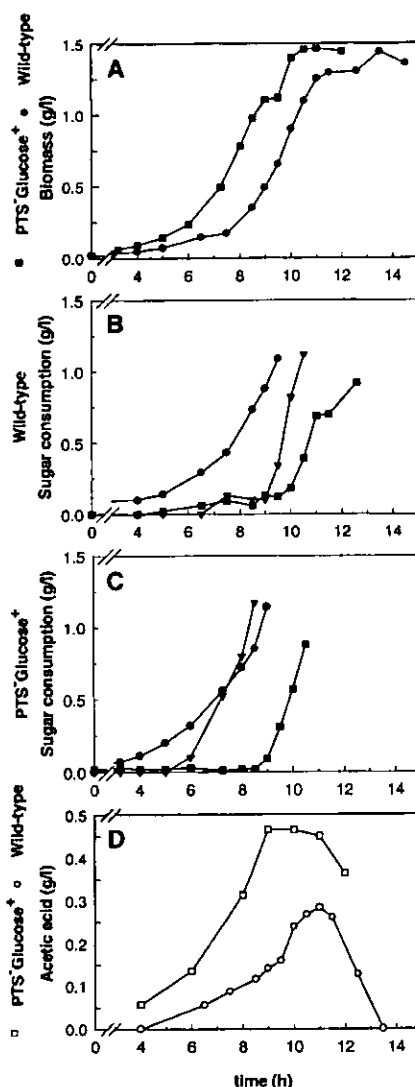


Fig. 2A–D Growth kinetics of wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ fermentations performed in the simultaneous presence of glucose, arabinose and xylose. The initial concentration of each sugar was 1 g/l. **A** growth curves; **B**, **C** sugar consumption for wild-type and PTS⁻ Glucose⁺ strains: (●) glucose, (▼) arabinose and (■) xylose; **D** acetic acid accumulation

mixture cultures. On the other hand, in cultures growing on the triple sugar mixture, the total biomass yield was similar for both strains (0.45 g produced biomass/g total sugar).

[¹⁴C]-Xylose uptake in the presence and absence of glucose in wild-type, PTS⁻ Glucose⁻ and PTS⁻ Glucose⁺ strains

To provide information about the mechanism of partial glucose repression of xylose utilization in the PTS⁻ Glucose⁺ strain, the initial rates of [¹⁴C]-xylose uptake in the presence and absence of glucose in the PTS⁺, PTS⁻ Glucose⁻ and PTS⁻ Glucose⁺ strains were measured. The

[¹⁴C]-xylose uptake rates measured without glucose in wild-type, PTS⁻ Glucose⁻ and PTS⁻ Glucose⁺ strains were 7.2±0.65, 7.4±0.54 and 9.9±0.75 nm xylose mg protein⁻¹ min⁻¹, respectively. On the other hand, in the presence of non-radioactive glucose (500 μM), [¹⁴C]-xylose uptake rates decreased to 2.0±0.17, 4.9±0.19 and 3.1±0.19 nm xylose mg protein⁻¹ min⁻¹, respectively. These results clearly show that glucose inhibits [¹⁴C]-xylose uptake, even in strains devoid of the PTS.

[¹⁴C]-Xylose uptake in a PTS⁻ Glucose⁻ strain with the over-expressed *galP* gene

From previous results, it was determined that [¹⁴C]-xylose uptake in the PTS⁻ Glucose⁺ strain was 36% higher than that observed for the wild-type or the PTS⁻ Glucose⁻ strain. In order to test if GalP, which is involved in glucose transport in the PTS⁻Glucose⁺ strain, was also involved in the observed increase of [¹⁴C]-xylose uptake for this strain, the PTS⁻ Glucose⁻ strain was transformed with a plasmid (pCLvGalP1) carrying the *galP* gene under the control of the strong *trc* promoter. To avoid induction of the xylose transport system the PTS⁻Glucose⁻/pCLvGalP1 strain was grown using glucose as the only carbon source. The initial rate of [¹⁴C]-xylose uptake measured for this strain was 9.4±0.88 nm xylose mg protein⁻¹ min⁻¹; this value is similar to that determined for the PTS⁻ Glucose⁺ strain.

Discussion

In this work, it was determined that no glucose repression occurs in the PTS⁻ Glucose⁺ strain upon utilization of arabinose. However, xylose consumption was partially repressed by glucose. [¹⁴C]-Xylose uptake experiments in the presence of glucose showed that, depending on the genetic background, glucose exerts varying degrees of xylose-transport inhibition. Regarding the PTS⁻Glucose⁻ and PTS⁻ Glucose⁺ strains, the major difference between them is that the latter is capable of glucose internalization. The results obtained showed that glucose repression of [¹⁴C]-xylose uptake was higher in the PTS⁻Glucose⁺ strain. Therefore, it can be assumed that inhibition of xylose uptake in this strain is dependent on the presence of intracellular glucose. However, the mechanism causing this inhibition is not known. In addition, glucose-xylose co-metabolism was completely inhibited by the presence of arabinose. This effect is attributed to the preferential pattern of pentose consumption that *E. coli* exhibits as reported by Kang et al. (1998). These authors found that L-arabinose represses the *xyl* operon, although the mechanism has not been determined.

In the PTS⁻ Glucose⁺ strain, GalP is involved in glucose transport. However, it has been reported that this protein can also transport several different sugars including xylose (McDonald et al. 1997). By over-expressing the *galP* gene in the PTS⁻ Glucose⁻ strain, it was possi-

ble to increase its xylose-transport capacity to a level similar to that observed for the PTS⁻ Glucose⁺ strain. These results showed that it should be possible to enhance both glucose- and xylose-transport capacity by controlling *galP* gene expression in a PTS⁻ Glucose⁻ or a PTS⁻ Glucose⁺ strain. It can also be concluded that for the PTS⁻ Glucose⁺ strain grown in medium containing xylose, the transport capacity for this sugar is the result of the added activities of the xylose permeases and GalP.

In the present work, it was shown that a mutant having the PTS⁻ Glucose⁺ phenotype could metabolize glucose and arabinose mixtures simultaneously. To our knowledge, no other *E. coli* mutant has been reported to confer such a phenotype. As a consequence of the co-metabolism of glucose-arabinose, the total sugars from the medium were consumed faster while the mutant strain maintained a higher specific growth rate than the wild-type strain. These are important characteristics for industrial production purposes: the lack of glucose repression on the metabolism of some pentoses can be a highly useful trait for strains grown in media derived from lignocellulosic hydrolysates, such as those used in emerging biological technologies for the production of ethanol or aromatic compounds (Lindsay et al. 1995; Asghari et al. 1996; Li and Frost 1999). Finally, because of the relatively higher growth rates displayed by the PTS⁻ Glucose⁺ strain growing in triple sugar mixtures, it can be expected that its productivity would be higher when compared to a wild-type strain.

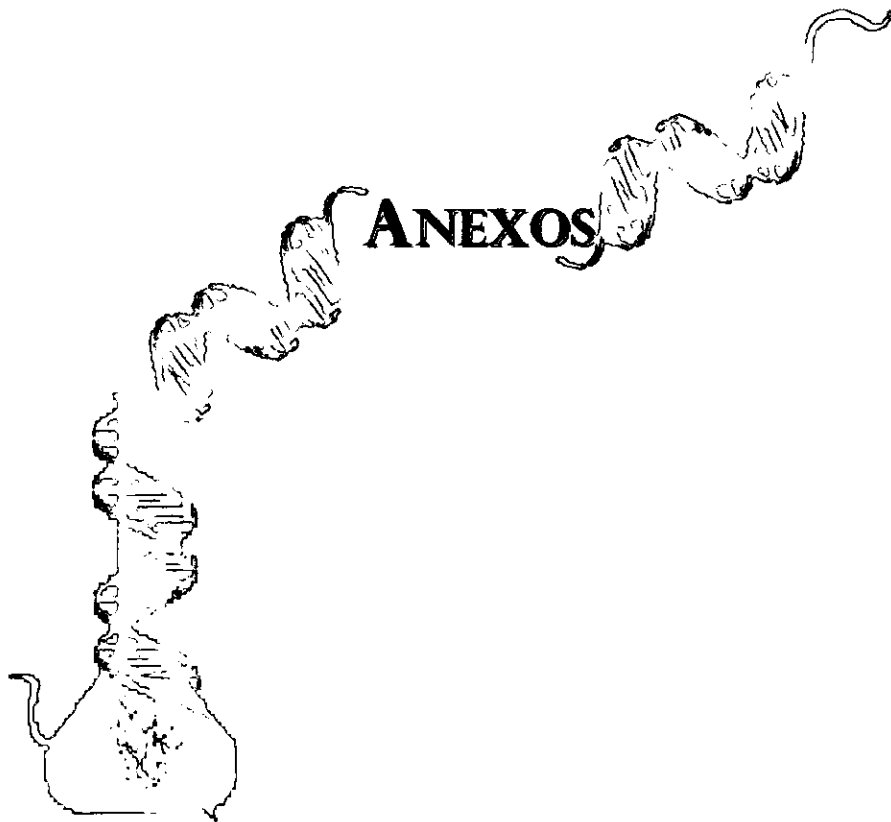
Acknowledgements Noemí Flores kindly provided strains NF6 and NF9. We thank Georgina Hernández-Chávez for HPLC determinations of acetic acid and xylose, and Mercedes Enzaldo for technical assistance. We thank Milton H. Saier, Beatriz Palmeros and Alfredo Martínez for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants 25375 N and Z-003 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México and partially supported by Genencor Int.

References

- Asghari A, Bothast RJ, Doran JB, Ingram LO (1996) Ethanol production from hemicellulose hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KO11. *J Ind Microbiol* 16:42-47
- Baez JL, Bolivar F, Gosset G (2001) Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol Bioeng* 73:530-535
- Bothast RJ, Nichols NN, Dien BS (1999) Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnol Prog* 15:867-875
- Brosius J, Erfle M, Storella J (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. *J Biol Chem* 260:3539-3541
- Chaplin MF, Kennedy JF (1987) Monosaccharides. In: Chaplin MF (ed) Carbohydrate analysis. A practical approach. IRL Press, Oxford, p 3
- Dale BE (1999) Biobased industrial products: bioprocesses engineering when cost really counts. *Biotechnol Prog* 15:775-776
- Epstein W, Rothman-Denes LB, Hesse J (1975) Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate as mediator of catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2300-2304
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolivar F, Valle F (1996) Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature* 4:620-623

- Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A (1996) A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 17:47-52
- Hogema BM, Arents JC, Bader R, Eijkemans K, Inada T, Postma PW (1998) Inducer exclusion by glucose 6-phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 28:755-765
- Kang H, Song S, Park C (1998) Priority of pentose utilization at the level of transcription: arabinose, xylose, and ribose operons. *Molecules Cells* 8:318-323
- Lerner CG, Inouye M (1990). Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. *Nucleic Acids Res* 18:4631
- Levy S, Zeng GQ, Danchin A (1990) camp synthesis in strains bearing well characterized deletions in the central *pts* genes of *Escherichia coli*. *Gene* 86:27-33
- Li K, Frost JW (1999) Microbial synthesis of 3-dehydroshikimic acid: a comparative analysis of D-xylose, L-arabinose, and D-glucose carbon sources. *Biotechnol Prog* 15:876-883
- Lindsay SE, Bothast RJ, Ingram LO (1995) Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:70-75
- Lugar RG, Woolsey RF (1999) The new petroleum. *Foreign Affairs* 78:88-102
- Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J (eds) (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mascarenhas D (1987) Tryptophan producing microorganisms. USA Patent W087/01130
- McDonald TP, Walmsley AR, Henderson PJF (1997) Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H⁺ symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J Biol Chem* 272: 15189-15199
- Monod J (1942) Recherches sur la croissance des cultures Bactériennes. Hermann, Paris 911:1-215
- Postma PW, Lengeler JW (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol Rev* 57:543-594
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1996) Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems. In: Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1149-1174
- Saier MH, Ramseier TM, Reizer J (1996) Regulation of carbon utilization. In: Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1325-1343
- Sheehan J, Himmel M (1999) Enzymes, energy, and environment: a strategic perspective on the US department of energy's research and development activities for bio-ethanol. *Biotechnol Prog* 15:817-827
- Silhavy T, Berman M, Enquist L (1984) Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 110-112

XII



ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| Anb | antibiótico(s) |
| Ap | ampicilina |
| βGal | enzima β-galactosidasa |
| <i>bla</i> | gen que codifica la enzima β-lactamasa (Ap ^R) |
| <i>cat</i> | gen que codifica la enzima cloramfenicol acetil-transferasa (Cm ^R) |
| cb | carbenicilina |
| Cm | cloramfenicol |
| D.O. _{xnm} | densidad óptica determinada a una longitud de onda específica |
| DHAP | 3-deoxy-D-arabino-heptolusonato 7-fosfato |
| Δ | eliminación de un fragmento del cromosoma bacteriano o de algún gen determinado |
| <i>E.</i> | <i>Escherichia</i> |
| Gm | gentamicina |
| <i>galP</i> | gen que codifica para el transportador de galactosa. |
| INV | inversión del fragmento del cromosoma comprendido entre los genes especificados para cada caso v.gr. INV(<i>rnnD-rnnE</i>) |
| IPTG | inductor gratuito de la expresión del operón de lactosa (isopropil β-D-tiogalactopiranosido) |
| kb | kilo base o 1,000 pares de bases |
| Km | kanamicina |
| λ | bacteriófago lambda |
| <i>lacP</i> | gen que codifica la proteína represora del operón de lactosa. El promotor de este gen lleva una mutación puntual en la caja -35 que cambia una C por una T en la posición 5; esto, provoca un incremento en la expresión a partir de este promotor que se traduce en aproximadamente 10 veces más concentración del represor. |
| <i>lacZ</i> | gen que codifica la enzima βGal involucrada en el metabolismo de lactosa |
| LB | medio de cultivo Luria-Bertani |

| | |
|----------------------------|---|
| MCS | sitio de clonación múltiple |
| M9 | Medio mínimo M9 |
| Neo | neomicina |
| <i>ori</i> | origen(es) de replicación del DNA |
| <i>ori</i> _{R6K} | origen gama de replicación condicionada del plásmido R6K |
| <i>oriT</i> | origen de transferencia del replicón RP4 |
| p | plásmido |
| P | promotor |
| pb | pares de bases |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| PEP | fosfoenolpiruvato |
| <i>P</i> _{lacUV5} | promotor <i>lac</i> con la mutación UV5 que aumenta la fuerza de este promotor |
| PTS | sistema de la fosfotransferasa |
| R | resistencia |
| R6K | replicón silvestre de <i>E. coli</i> que confiere resistencia a estreptomicina y ampicilina |
| s | sensibilidad |
| Sm | estreptomicina |
| Spec | espectinomicina |
| T4Pol | DNA polimerasa del fago T4 |
| Tet | tetraciclina |
| <i>trc</i> | promotor híbrido, posee la región regulatoria del promotor de triptofano hasta la caja -35 y la región correspondiente a la caja -10 del promotor <i>lacUV5</i> |
| wt | forma silvestre |
| XGal | sustrato cromogénico de la enzima β-galactosidasa (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido) |
| :: | inserción o fusión de una construcción genética en un locus determinado |

UNIDADES DE LOS PARÁMETROS UTILIZADOS.

| | |
|------------------|-------------------------------------|
| μ | h^{-1} |
| $Y_{x/ARA}$ | gBIOMASA/gARABINOSA |
| $Y_{x/XYL}$ | gBIOMASA/gXILOSA |
| $Y_{x/GLC}$ | gBIOMASA/gGLUCOSA |
| $Y_{x/s}$ | gBIOMASA/gSUSTRATO |
| $Y_{ETANOL/x}$ | gETANOL/gBIOMASA |
| $Y_{ETANOL/GLC}$ | gBIOMASA/gGLUCOSA |
| $Y_{AC/GLC}$ | gAC. ACETICO/gGLUCOSA |
| $Y_{AC/X}$ | gAC. ACETICO/gBIOMASA |
| qs | gAZUCAR/gBIOMASA.h |
| qp | gETANOL/gBIOMASA.h |
| UI | μ moles SUSTRATO/mgPROTEÍNA.min |
| vvm | volumenAIRE/volumenMEDIO.min |