



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

Regulación Metabólica de la Glucólisis y Vías
Fermentativas en *Escherichia coli*
Etanológica.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Virginia Montserrat Orencio Trejo

Director de Tesis: Dr. Alfredo Martínez Jiménez.



Cuernavaca, Mor. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

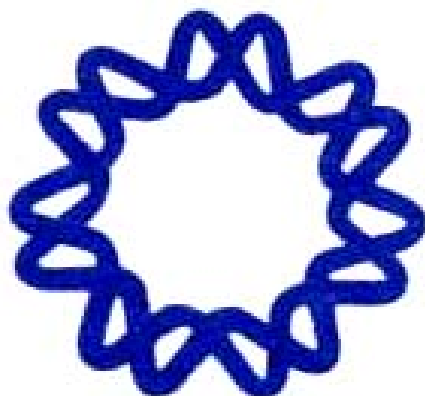


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

Para la realización del mismo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca 153671. También se contó con el financiamiento de los proyectos: CONACYT – SAGARPA 2004-C01-224, CONACYT – EDO. DE MORELOS 2004-C02-048 y PAPIIT – DGAPA – UNAM IN220908.

Director del Proyecto:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

Comité Tutorial:

Dra. Beatriz Palmeros Sánchez.

Dr. Mario Soberón Chávez.

Jurado Asignado:

Presidente:

Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Secretario:

Dra. Laura A. Palomares Aguilera.

Vocal:

Dr. Miguel Lara Flores.

Suplente:

Dra. Cinthia Nuñez López.

Suplente:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez.

DEDICATORIAS.

A Dios con amor y gratitud por la fortaleza, el valor y el consuelo en momentos adversos. Por permitirme existir en este tiempo y espacio...

A mis papás Ceci y Ray por apoyarme en todo momento y dejarme volar. No hubiera llegado hasta aquí sin ustedes... mi cariño, agradecimiento y respeto por siempre.

A Argel, mi compañero, mi apoyo, mi alma gemela... gracias por todo tu amor y por ser el cómplice de mis sueños, esto te pertenece tanto como a mí.

A las grandes influencias de mi vida... mi tío Jorge, quien le dio significado a la palabra "agradecimiento" y cuyo apoyo ha sido determinante para mis objetivos académicos, espero poder retribuirte aunque sea un poco por todo lo que me has dado. A mi querida madrina Enriqueta por su cariño constante, gracias a ti hace muchos años descubrí que existía la palabra "posgrado" y decidí que eso sería una meta en mi futuro.

A los hermanos que he adoptado en el camino y que han dejado una huella profunda en mi vida... mis amigos de siempre.

AGRADECIMIENTOS.

A los miembros del jurado por la revisión de este trabajo, gracias por sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Alfredo Martínez por su asesoría, dirección y apoyo a lo largo de estos cinco años.

Al Dr. Guillermo Gosset por abrirme las puertas de su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutorial por sus aportaciones y críticas constructivas, tanto al proyecto como a mi formación académica. Un agradecimiento muy especial a la Dra. Beatriz Palmeros quien además de compartir sus conocimientos, me transmitió la emoción de “hacer investigación”.

Al personal técnico, académico y administrativo del laboratorio Bolívar/Gosset: Georgina Hernández, Noemí Flores, Ramón de Anda, Silvia Velázquez, Delia Caro y Mercedes Enzaldo, quienes con su trabajo diario, nos ayudan a realizar el nuestro. Especialmente, quiero agradecer a nuestra querida “Mechita” por los varios cientos de cajas y soluciones que hicieron mi trabajo más eficiente, gracias por tu compromiso con todos los miembros de nuestro grupo.

A mis compañeros y amigos en el laboratorio, a los que ya no están y a los que llegaron recientemente, gracias por sus muestras de solidaridad en el día a día.

A la UNAM por abrir sus puertas y brindarme la oportunidad de formarme académicamente.

TABLA DE CONTENIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS.	viii
ÍNDICE DE TABLAS.	ix
NOMENCLATURA.	xi
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.	7
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	15
Condiciones y Medios de Cultivo.	16
Métodos Analíticos.....	18
Preparación del extracto celular para ensayos enzimáticos.	23
Protocolos para la determinación de actividades enzimáticas.	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Caracterización de cuatro cepas silvestres de <i>E. coli</i> en condiciones no aireadas.	36
Construcción de la cepa etanológica derivada de <i>E. coli</i> C.....	41
Regulación metabólica a nivel enzimático.	44
Regulación Metabólica a nivel transcripcional.	52
Cultivos con 100 g/L de glucosa.	59
6. CONCLUSIONES.	64

7. PERSPECTIVAS.	65
8. BIBLIOGRAFÍA.	66
9. APÉNDICES	75
Apéndice A. Metabolic regulation analysis of an ethanologenic <i>Escherichia coli</i> strain based on RT-PCR and enzymatic activities.	76
Apéndice B. Estado del arte para la obtención de etanol a partir de residuos agroindustriales.	90
Apéndice C. Ingeniería metabólica, residuos agroindustriales y etanol carburante.	102
Apéndice D. Producción de compuestos aromáticos con importancia industrial: Una aplicación de la ingeniería de vías metabólicas en bacterias.	110

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Sistema de minifermentadores (fleakers) utilizados en este proyecto.	18
Figura 2. Caracterización de cepas silvestres en medio mineral M9 con 20 g/L de glucosa.....	38
Figura 3. Distribución del carbono en las cepas silvestres de <i>E. coli</i> al final del cultivo (48 h). Datos presentados en porcentaje de carbono.....	40
Figura 4. Producción de etanol de las cepas <i>E. coli</i> C, KO11 y CCE14 a las 30 h en medio M9 con 40 g/L de glucosa.....	44
Figura 5. Valores de Actividades enzimáticas (UI/mg prot) de PDC _{Zm} y ADH _{Zm} en las cepas KO11 y CCE14.....	45
Figura 6. Actividades enzimáticas específicas de la cepa etanológica CCE14, normalizadas con respecto a la cepa progenitora <i>E. coli</i> C.	47
Figura 7. Caracterización de la cepa <i>E. coli</i> C y las cepas etanológicas CCE14 y KO11, en medio mineral M9 con 40 g/L de glucosa.	50
Figura 8. Valores de RT-PCR de la cepa CCE14, normalizados con respecto a la cepa parental <i>E. coli</i> C durante la fase exponencial.....	54

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> usadas y construidas durante este trabajo.	15
Tabla 2. Plásmidos usados y construidos durante este trabajo.	15
Tabla 3. Iniciadores utilizados para los estudios de RT-PCR y para amplificación de productos de PCR para secuenciación nucleotídica.	21
Tabla 4. Constantes cinéticas y crecimiento celular en condiciones no aireadas.	36
Tabla 5. Velocidades específicas de formación de ácidos orgánicos, glicerol y etanol (q_p) en fase exponencial.	37
Tabla 6. Velocidades específicas de formación de ácidos orgánicos, glicerol y etanol (q_p) en fase estacionaria.	37
Tabla 7. Constantes cinéticas y crecimiento celular de las cepas estudiadas en cultivos no aireados.	42
Tabla 8. Velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos y etanol, en fase exponencial y condiciones no aireadas.	42
Tabla 9. Velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos y etanol, en fase estacionaria y condiciones no aireadas.	43
Tabla 10. Crecimiento no aireado en medio M9 con 100 g/L de glucosa.	60
Tabla 11. Velocidades específicas de formación de ácidos y etanol (q_p) en fase exponencial.	60
Tabla 12. Velocidades específicas de formación de ácidos y etanol (q_p) en fase estacionaria.	61

Tabla 13. Rendimiento de etanol respecto al teórico máximo con 100 g/L de glucosa.
.....62

NOMENCLATURA.

Símbolo	Definición
<i>cat</i>	Gen que codifica la enzima cloramfenicol acetil transferasa
Cm	Cloramfenicol
DCW	Peso celular seco (por sus siglas en inglés: Dry cell weight)
DO _{xnm}	Densidad óptica determinada a una longitud de onda específica (x)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
g	Gramos
h	Horas
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
p	Plásmido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PP	Vía metabólica de las pentosas fosfato
R	Resistente
wt	Forma silvestre
::	Inserción o fusión de una construcción genética en un locus determinado
Δ	Eliminación de un fragmento del cromosoma bacteriano o de algún gen determinado

METABOLITOS.

Ac CoA	Acetil coenzima A
ADP	Adenosin difosfato
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
DHAP	Deoxiarabino heptolosonato-7-fosfato
Ery 5P	Eritrosa 5-fosfato
Fru 6P	Fructosa 6-fosfato
Glc	Glucosa
Glc-6P	Glucosa 6-fosfato
Gly 3P	Gliceraldehído 3-fosfato
KDPGNT	2-ceto-3-deoxygluconato-6-fosfato
NAD ⁺	Nicotin adenin dinucleotido oxidado
NADH+H ⁺	Nicotin adenin dinucleotido reducido
PEP	Fosfoenolpiruvato
6-P-Glc-lactona	6-fosfogluconolactona
PIR	Piruvato
Ril 5P	Ribulosa 5-fosfato
S 7P	Sedoheptulosa 7-fosfato
Xil 5P	Xilulosa 5-fosfato

ENZIMAS Y GENES.

Enzima	Gen	Definición
ACK	<i>ack</i>	Acetato cinasa
ADH	<i>adhE</i>	Alcohol deshidrogenasa de <i>E. coli</i>
ADH II	<i>adhB</i>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Z. mobilis</i>
CRP	<i>crp</i>	Regulador transcripcional
EDA	<i>eda</i>	2-ceto 3-deoxifosfogluconato aldolasa
EDD	<i>edd</i>	Fosfogluconato deshidratasa
ENO	<i>eno</i>	Enolasa
FBA	<i>fbaA</i>	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa
FRD	<i>frdA</i> <i>frdB</i> <i>frdC</i> <i>frdD</i>	Fumarato reductasa
FNR	<i>fnr</i>	Regulador transcripcional
FUM	<i>fumA</i> <i>fumB</i> <i>fumC</i>	Fumarato reductasa
FRUR	<i>fruR</i>	Regulador transcripcional
GALP	<i>galP</i>	Galactosa permeasa
GAPDH	<i>gapA</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLK	<i>glk</i>	Glucocinasa

GND	<i>gnd</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa
IHF	<i>ihfB</i>	Regulador transcripcional dual
LAMB	<i>lamB</i>	Receptor de maltosa de alta afinidad
LDH	<i>ldhA</i>	Lactato deshidrogenasa
MDH	<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa
MGLB	<i>mglB</i>	Transportador ABC de galactosa
MLC	<i>mlc</i>	Represor transcripcional
OMPf	<i>ompF</i>	Porina
PDC	<i>pdC</i>	Piruvato decarboxilasa
PFK	<i>pfkA</i>	Fosfofructocinasa
PFL	<i>pflB</i> <i>pflD</i>	Piruvato formato liasa
PGI	<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa
PGK	<i>pgk</i>	Fosfoglicerato cinasa
PGL	<i>pgl</i>	6-fosfogluconolactonasa
PGM	<i>pgmA</i>	Fosfoglicerato mutasa
PYK	<i>pykA</i> <i>pykF</i>	Piruvato cinasa
RPE	<i>rpe</i>	Ribulosa fosfato epimerasa
RPI	<i>rpiA</i> <i>rpiB</i>	Ribosa-5-fosfato isomerasa
TKT	<i>tktA</i> <i>tktB</i>	Transcetolasa

TAL	<i>talA</i> <i>talB</i>	Transaldolasa
TPI	<i>tpiA</i>	Triosafosfato isomerasa
ZWF	<i>zwf</i>	Glucosa-6 fosfato-1-deshidrogenasa

RESUMEN.

Con el objetivo de construir una cepa etanológica modelo para estudiar la regulación metabólica de la glucólisis y metabolismo del piruvato, se analizaron distintos linajes de *Escherichia coli*. Esta caracterización permitió elegir una candidata con base en las velocidades específicas de crecimiento, consumo de glucosa y de formación de productos de fermentación. Posteriormente, se construyó la nueva cepa etanológica denominada CCE14, derivada del linaje seleccionado de *E. coli* C, integrándose a cromosoma los genes piruvato decarboxilasa (*pdh*) y alcohol deshidrogenasa (*adh*) de *Zymomonas mobilis*. Con esta cepa se obtuvo una mayor velocidad de producción de etanol, así como un incremento del 20% en el rendimiento de etanol a partir de glucosa en comparación con cepas de *E. coli* previamente construidas, como la KO11, la cual es derivada de *E. coli* W.

Se realizó un estudio de regulación metabólica en la nueva cepa basado en la medición de actividades enzimáticas, perfiles de fermentación y de transcriptoma mediante análisis de RT-PCR, de las vías relacionadas al metabolismo central de carbono. El estudio demostró que el flujo glucolítico es controlado por reacciones fuera de la glucólisis, específicamente, por las vías fermentativas.

En comparación con cepas construidas anteriormente, CCE14 tiene una mayor velocidad de producción de etanol en medio mineral originada por los elevados niveles de transcripción y de actividades enzimáticas de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} . Los resultados demuestran que los cambios en los niveles de transcrito y actividades enzimáticas desencadenan un alto flujo glucolítico y una baja producción de ácidos orgánicos. Así mismo, se induce un estado metabólico en el que las células responden con un incremento en el transporte de glucosa, la síntesis de ATP y el balance de $NAD-NADH+H$.

Los resultados también demuestran que las actividades enzimáticas de la glucólisis, presentes en las cepas silvestres *E. coli* W y C bajo condiciones de fermentación, son suficientes para contener con los incrementos en el consumo de glucosa y en las velocidades de formación de productos de fermentación al ser modificadas para la producción de etanol.

ABSTRACT.

Different lineages of *Escherichia coli* were analyzed in order to construct an ethanologenic strain to serve as a model for the study of metabolic regulation of glycolysis and pyruvate metabolism, and to determine the steps that control the ethanol production rate. Based on the specific rates of glucose consumption and the formation of fermentation products, a new ethanologenic strain denominated CCE14, derived from *E. coli* C, has integrated into its chromosome the pyruvate decarboxylase (*pdc*) and the alcohol dehydrogenase (*adh*) genes from *Zymomonas mobilis*. This *E. coli* derivative had a higher ethanol production rate and a 20% increase in the ethanol yield from glucose in comparison with previous engineered *E. coli* strains, such as KO11, derived from *E. coli* W.

A metabolic regulation study was performed, based upon measurements of enzymatic activities, fermentation performance and transcriptome by RT-PCR analysis of pathways and regulators related to central carbon metabolism. This study demonstrated that the glycolytic flux is controlled by reactions outside glycolysis, *i.e.*, the fermentative pathways.

In comparison with previous engineered *E. coli* strains, CCE14 had a higher ethanol production rate in mineral medium as a result of enhanced transcription and enzymatic activity levels of PDC_{Zm} and ADH_{Zm}. The results show that these changes in transcript levels and enzymatic activities resulted in a high glycolytic flux and a low organic acid production. It also induces a metabolic state in which cells respond increasing glucose transport, ATP synthesis, and NAD-NADH+H turnover rates.

The results shows that glycolytic enzymatic activities, present in wild type *E. coli* W and C under fermentative conditions, are sufficient to contend with increases in glucose consumption and product formation rates when strains are modified for ethanol production.

1. INTRODUCCIÓN.

La necesidad de diversificar las fuentes de energía a futuro, que además sean sustentables y más amigables con el medio ambiente, plantea la necesidad de desarrollar microorganismos capaces de metabolizar una amplia variedad de azúcares y convertirlos eficientemente en productos de interés. En lo que se refiere a los combustibles, existen varias alternativas para obtenerlos mediante tecnologías renovables. Desde el punto de vista biotecnológico, una de las opciones con mayor viabilidad para sustituir o complementar a la gasolina es el etanol carburante (Ingram *et al.*, 1999). Este compuesto puede ser producido mediante tecnologías biológicas sustentables, originando un ciclo artificial del CO₂ y evitando su incremento neto en la atmósfera. Por otro lado, no es tóxico ni cancerígeno, además de que es fácil de almacenar y transportar (Greene *et al.*, 2004).

Una alternativa factible económicamente para la producción de etanol mediante procesos biológicos, es la utilización de residuos lignocelulósicos como los desechos agroindustriales. Estos residuos son abundantes, contaminan de cierta manera y tienen un uso marginal en el planeta (Martinez *et al.*, 2002). Los materiales lignocelulósicos constituyen aproximadamente el 90% del peso seco de las plantas, y representan la fuente de energía más abundante en el planeta (Jarboe *et al.*, 2007). Un ejemplo es el bagazo de caña, el cual es generado en nuestro país y en algunos casos es un problema de contaminación. El bagazo de caña producido en México potencialmente podría ser convertido, mediante el uso de tecnologías biológicas y químicas, en aproximadamente 7 millones de litros de etanol por día (Martinez *et al.*, 2002). Este residuo está compuesto por dos fracciones: la hemicelulosa y la celulosa, las cuales representan del 30-40 y el 30-50% del total, respectivamente (Ingram *et al.*, 1999). Específicamente, la fracción de la hemicelulosa contiene, además de glucosa y manosa, 85% de pentosas, principalmente xilosa y un pequeño porcentaje de arabinosa (Martinez *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2001).

Desafortunadamente, los microorganismos naturalmente productores de etanol, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* no metabolizan azúcares de cinco carbonos (Ingram *et al.*, 1998; Bothast *et al.*, 1999; Ingram *et al.*, 1999), por lo que no es posible utilizarlos en la producción de etanol a partir de xilosa o arabinosa. En contraste, *E. coli* es capaz de metabolizar las hexosas (como glucosa, manosa, fructosa, etc), las pentosas (xilosa, arabinosa, ribosa, etc.), así como mezclas de éstas, presentes en los residuos agroindustriales. No obstante, produce etanol en bajas cantidades.

Actualmente, gracias a las herramientas de la biotecnología moderna, es posible modificar, modular y diseñar vías metabólicas en una amplia variedad de microorganismos. Particularmente mediante la ingeniería de vías metabólicas, la cual se define como la modificación y/o introducción de nuevas reacciones bioquímicas para el mejoramiento directo de propiedades celulares mediante tecnología de ADN recombinante (Stephanopoulos *et al.*, 1998; Stephanopoulos, 1999), es posible obtener microorganismos etanologénicos capaces de metabolizar diversos azúcares que naturalmente no metabolizaban, o bien convertir microorganismos no productores en productores de etanol (Aristidou y Penttilä, 2000).

En años relativamente recientes se han generado cepas de *Z. mobilis* y de *S. cerevisiae* capaces de utilizar xilosa. En el caso de *Z. mobilis*, se han integrado en cromosoma 4 genes de *E. coli* involucrados en la isomerización y fosforilación de la xilosa, así como en su incorporación a la vía de las pentosas. Dicha estrategia dio como resultado una bacteria capaz de transportar y metabolizar xilosa en etanol con rendimientos relativamente altos. Sin embargo, la velocidad de síntesis de etanol fue al menos 10 veces menor comparada con la mostrada a partir de glucosa (Zhang *et al.*, 1995). Adicionalmente, se han desarrollado bacterias de *Z. mobilis* que fermentan arabinosa (Deanda *et al.*, 1996). Por otro lado, las cepas modificadas de *S. cerevisiae* producen etanol a partir de xilosa con velocidades y rendimientos de conversión bajos, además de requerir glucosa y aireación (Ho *et al.*, 1998; Bothast *et al.*, 1999; Aristidou y Penttilä, 2000).

E. coli produce etanol de forma natural en condiciones de fermentación, aunque en bajas cantidades. En años relativamente recientes, se han construido varias cepas etanológicas a partir de esta bacteria gracias a la introducción de la vía metabólica presente en *Z. mobilis* (Ohta *et al.*, 1991; Hespell *et al.*, 1996). La vía está integrada por la enzima piruvato decarboxilasa (PDC_{Zm}) que transforma el piruvato en acetaldehído y CO_2 , seguido por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH_{Zm}) que transforma el acetaldehído en etanol con la reducción del $NADH + H$ a NAD^+ .

No obstante los avances en la construcción y modificación de cepas etanológicas, no hay reportes de cómo estos microorganismos reacomodan su metabolismo en respuesta a la inserción de la vía metabólica heteróloga para la producción de etanol. De acuerdo a lo anterior, es necesario generar conocimiento acerca de la regulación genética, bioquímica y de la fisiología del metabolismo celular en cepas de *E. coli* tanto silvestres como modificadas. Esta información nos permitiría conocer qué controla la tasa de consumo de sustratos y la distribución de flujos metabólicos en cepas de interés (Fraenkel, 1992; Emmerling *et al.*, 1999; Al Zaid Siddiquee *et al.*, 2004).

El metabolismo se refiere al conjunto de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en la célula y consiste de numerosas vías interrelacionadas, conectadas por metabolitos de una vía común y por cofactores que interactúan a varios niveles de regulación genética y metabólica (Al Zaid Siddiquee *et al.*, 2004). Debido a lo anterior, los estudios de este tipo son complejos. Afortunadamente, la biología molecular ha logrado separar sistemas celulares complejos en modelos segregados, los cuales pueden ser estudiados y mejor comprendidos.

Existen numerosos estudios que han explorado los efectos de alterar niveles de enzimas individuales o flujos enteros de una vía metabólica específica, cualquiera de las dos estrategias han sido una manera de estudiar cómo se lleva a cabo el control metabólico, lo que además abre la posibilidad de generar organismos con características metabólicas específicamente alteradas (Fraenkel, 1992). No obstante,

estos cambios en la fisiología celular pueden afectar el metabolismo, muchos de los ajustes metabólicos dan como resultado cambios en la concentración de metabolitos y en las actividades enzimáticas, así como en la distribución de flujos metabólicos (Tao *et al.*, 2001). También se ha observado que algunas inactivaciones o mutaciones en el metabolismo central impiden al microorganismo crecer en algunas fuentes de carbono. Sin embargo, muchas de estas alteraciones pueden potencialmente ser compensadas por otras enzimas o por la redirección de flujos del carbono en rutas alternativas (Al Zaid Siddiquee *et al.*, 2004; Saier *et al.*, 1996).

Otra forma de obtener información acerca del estado fisiológico de las células es el análisis del perfil de expresión genética. Esta es una herramienta utilizada para comparar cambios globales en la expresión de genes que ocurren como respuesta a estímulos ambientales, o para comparar los efectos de cambios genéticos realizados. Este análisis tiene el potencial de identificar conexiones entre rutas regulatorias o metabólicas (Kabir *et al.*, 2003). Sin embargo, el estado fisiológico está determinado a nivel de proteína, por lo que el estudio de la expresión del mRNA debe ser complementado con mediciones de las actividades enzimáticas para tener un mejor entendimiento de los fenómenos observados. Es necesario considerar que las regulaciones enzimáticas y transcripcionales son diferentes. La técnica semi-cuantitativa RT-PCR refleja la abundancia relativa del transcrito, la cuál está influenciada tanto por la actividad transcripcional, como por la estabilidad del RNAm (Kabir *et al.*, 2003). Además, ofrece numerosas ventajas respecto a otras técnicas. La cantidad necesaria de RNAm para llevar a cabo la cuantificación es menor, es una técnica reproducible, es posible analizar múltiples RNAm's al mismo tiempo, además de ser relativamente rápida (Kabir *et al.*, 2003). En contraste, la actividad de las enzimas puede ser regulada por uniones reversibles, efectores, modificaciones covalentes y alteraciones de la concentración de enzimas. Sin embargo, se considera que en gran parte, los niveles de expresión del RNAm reflejan la actividad enzimática (Martin, 1987).

2. ANTECEDENTES.

El metabolismo fermentativo constituye una base fundamental de la biotecnología. Los compuestos orgánicos endógenos usados por las células como aceptores de electrones bajo condiciones de falta de oxígeno son convertidos en compuestos bioquímicos, que aunque son productos de desecho para la célula, pueden representar moléculas de valor para la sociedad (Gottschalk, 1986).

Como ya se mencionó anteriormente, se han construido cepas etanológicas recombinantes de *E. coli* mediante la introducción de vías heterólogas para producir etanol por técnicas de ingeniería de vías metabólicas. Una de las estrategias más utilizadas ha sido la integración en cromosoma de los genes que codifican para la piruvato descarboxilasa (*pdh*) y alcohol deshidrogenasa (*adh*) de *Zymomonas mobilis* (Ohta *et al.*, 1991; Hespell *et al.*, 1996). Existen varias razones por las que los genes de *Z. mobilis* son utilizados como vía heteróloga para producir etanol en otros microorganismos como *E. coli*. Está reportado que PDC tiene una K_M menor por piruvato en comparación a las enzimas que compiten por éste (Brau y Sahm, 1986; Ingram y Conway, 1988). Adicionalmente, se ha comprobado que la estabilidad de los RNAm's de PDC y de ADH son elevadas (Mejia *et al.*, 1992), por lo que grandes cantidades de estas proteínas son producidas por la célula, promoviendo un alto flujo glucolítico (Ingram *et al.*, 1998). Otras estrategias han estado encaminadas a la interrupción de vías que compiten con el piruvato por la producción de etanol (Ingram *et al.*, 1998; Ingram *et al.*, 1999); la construcción de cepas que eliminen el fenómeno de represión catabólica y puedan metabolizar pentosas y hexosas simultáneamente (Nichols *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2003; Dien *et al.*, 1999); así como cepas que producen etanol por la vía homóloga con rendimientos mayores a las cepas progenitoras (Kim *et al.*, 2007).

Una de las cepas más exitosas, utilizada en demostraciones a escala piloto para producir etanol a partir de hidrolizados de residuos agroindustriales, es la cepa KO11 (Ohta *et al.*, 1991; Lindsay *et al.*, 2003). Esta cepa derivada de *E. coli* W (Jarboe *et al.*,

2007), tiene integrado en cromosoma los genes *pdh* y *adh* de *Z. mobilis* bajo el control del promotor de la piruvato formato-liasa (*pfl*) (Ohta *et al.*, 1991; Ingram *et al.*, 1999). En *E. coli*, el gen *pfl* es transcrito por 7 promotores, los cuales son coordinadamente inducidos de 12 a 15 veces en condiciones anaeróbicas, siendo indispensable la intervención de las proteínas reguladoras FNR y ARCA (Sawers y Böck, 1988; Sawers y Böck, 1989; Sawers y Suppmann, 1992). PFL es una enzima homodimérica, que cataliza la conversión del piruvato en formato y acetil CoA, éste último, indispensable para el crecimiento en condiciones anaerobias (Sawers y Böck, 1988).

En la cepa KO11, la vía heteróloga para la producción de etanol fue integrada en el cromosoma por recombinación homóloga doble, reestableciendo la actividad de PFL. Con esta cepa creciendo en medio rico, se obtienen rendimientos de conversión de una amplia variedad de azúcares en etanol cercanos al teórico (ligeramente mayores al 90%) incluyendo glucosa, manosa, xilosa, arabinosa, o mezclas de los mismos (Nichols *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando se utilizan medios mínimos o hidrolizados de residuos agroindustriales, el rendimiento de etanol de la cepa KO11 decae a niveles del 70% respecto al teórico máximo. Por otra parte, al utilizar glucosa o xilosa como fuente de carbono, la velocidad específica de crecimiento y el flujo glucolítico se incrementan en un 40 y 50% respectivamente, en comparación con la cepa progenitora (Tao *et al.*, 2001). Este fenómeno se repite en diferente grado con otras cepas etanologénicas de *E. coli* (Huerta-Beristain *et al.*, 2008).

Por otro lado, mediante estudios de micro-arreglos genéticos con la cepa KO11, se ha reportado que durante la fermentación de glucosa o xilosa, se induce en común la sobreexpresión de 6 genes involucrados en la vía glucolítica (*pfkA*, *fbaA*, *tpiA*, *gapA*, *pgk* y *pykF*), así como los genes *xyIA* y *xyIB*, involucrados en el metabolismo de la xilosa (Tao *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002). En estos estudios también se demostró que las actividades enzimáticas de XYLA y XYLB se incrementan alrededor de 2.5 veces en la cepa KO11 con respecto a la cepa *E. coli* B (Tao *et al.*, 2001). Esto permite

relacionar un incremento en la expresión de genes con el incremento en la actividad enzimática.

Se ha demostrado que utilizando células en reposo (células en las cuales se ha arrestado el crecimiento, denominadas “resting cells”), la sobreexpresión de la enzima piruvato cinasa de *Bacillus stearothermophilus* (Pyk_{Bs}), en la cepa KO20 de *E. coli* (homóloga de KO11) se logra incrementar en 10% el consumo específico de glucosa y 15% la velocidad específica de producción de etanol. Además, con la sobreexpresión simultánea de fosfofructocinasa homóloga de *E. coli* (Pfk_{Ec}) y Pyk_{Bs}, se logró un incremento del 25% en la velocidad específica de consumo de glucosa, de 35% en la velocidad específica de producción de etanol y una disminución en la formación de D-lactato (50%) (Emmerling *et al.*, 1999; Emmerling *et al.*, 2000).

En nuestro laboratorio se transformó la cepa KO11 con el plásmido pLOI1594 (Martinez *et al.*, 1999), el cual contiene el gen *pdc* de *Zymomonas mobilis*, permitiendo incrementar cerca de 5 veces la actividad de piruvato descarboxilasa utilizando medio mínimo suplementado con glucosa (Huerta-Beristain *et al.*, 2008). Los valores de la velocidad específica de crecimiento y de consumo de glucosa no cambiaron en la cepa KO11/pLOI1594 respecto a KO11 durante la fase del cultivo en fase exponencial. Sin embargo, la velocidad específica de producción de etanol se incrementó en un 24%, reduciéndose la formación de ácidos orgánicos. Adicionalmente, durante la fase estacionaria del cultivo, la velocidad específica de consumo de glucosa y de producción de alcohol se incrementaron en 30% en la cepa KO11/pLOI1594 con respecto a la cepa KO11, así como también se incrementó en un 20% el rendimiento etanol/glucosa. Estos datos sugieren que -en parte- el flujo glucolítico y de formación de etanol no están controlados dentro de la misma glucólisis.

Tradicionalmente se le ha atribuido el control de la glucólisis a las enzimas PFK y PYK, sin embargo se ha reportado que aunque estas enzimas tienen un papel

importante en la vía, no son las que controlan directamente el flujo glucolítico (Schaaff *et al.*, 1989; Müller *et al.*, 1997; Koebman *et al.*, 2002b; Plaxton, 2004).

Debido a que en condiciones anaerobias el rendimiento de ATP por molécula de glucosa es menor comparado a condiciones aerobias, se ha propuesto que una estrategia para incrementar la velocidad glucolítica consiste en el recambio de ATP, canalizando el flujo a través de la vía que conlleva a su generación (Cornish-Bowden *et al.*, 1995). Datos reportados en la literatura para *E. coli* en condiciones aerobias, sugieren que el control del flujo de carbono en la vía glucolítica se encuentra fuera de la misma y que ésta se relaciona a la alta demanda de ATP, que origina un incremento en el flujo glucolítico (Koebman *et al.*, 2002a); A su vez, Smits y colaboradores (2000) reportaron que el flux de la glucólisis en *S. cerevisiae* se incrementa cuando hay una mayor demanda de ATP o bien, cuando se induce por condiciones de estrés un mayor consumo de ATP (Taherzadeh *et al.*, 1997; Garay-Arroyo *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que en *Lactococcus lactis* el flujo glucolítico en condiciones anaerobias no está controlado por la demanda de ATP (Koebman *et al.*, 2002b), sino por el transporte de glucosa (Papagianni *et al.*, 2007).

En conjunto, los datos presentados en los párrafos precedentes sugieren que el flujo glucolítico en cepas silvestres de *E. coli* puede ser incrementado, aunque no se conoce exactamente qué mecanismos están involucrados. Sin embargo, la reducción de otros productos de fermentación parece ser un factor que permite incrementar el flujo hacia la producción de etanol. Los estudios de micro arreglos sugieren que varios pasos enzimáticos controlan el flujo glucolítico en cepas silvestres y/o etanológicas de *E. coli*. Sin embargo, el control del “flux” glucolítico parece ser que al menos en KO11 no está dentro de la glucólisis (Huerta-Beristain *et al.*, 2008) y que una mayor actividad de la enzima PDC permite canalizar una mayor porción de piruvato a la formación de etanol e incrementar el flujo glucolítico.

Es importante mencionar, que con el objetivo de obtener mutantes con altos niveles de expresión de los genes heterólogos *pd_{cm}* y *adh_{cm}* para así incrementar el

rendimiento de etanol, la cepa KO11 fue sometida a presión de selección con elevadas concentraciones de cloramfenicol de hasta de 600 µg/mL (Ohta *et al.*, 1991). Está reportado que uno de los factores que influyen en la velocidad y tipo de mutaciones que ocurren en poblaciones bacterianas, está determinada por la presión de selección en antibióticos (Martinez y Baquero, 2000). En el caso de la cepa KO11, no se conoce la naturaleza de las mutaciones generadas al ser sometida a estos niveles de presión selectiva, por lo que esta cepa no es un buen modelo para realizar estudios de ciencia básica.

Lo anterior permite considerar la construcción de una nueva cepa etanológica, que no sea sometida a presión de selección y que tenga un fondo genético conocido. Esta cepa generaría conocimiento básico acerca de los factores que determinan una conversión eficiente de glucosa en etanol.

En este mismo contexto, existen reportes sobre qué sucede al sobreexpresar algunas enzimas del metabolismo central, o bien al inactivar otras. Sin embargo, no existe un estudio completo de regulación metabólica de toda la vía glucolítica y de producción de etanol en condiciones anaerobias en cepas de *E. coli* silvestres y etanológicas. Esto representaría información detallada de qué pasos pudieran tener un mayor control de la vía glucolítica y de producción de etanol en estas condiciones. Por otro lado es importante para nuestro grupo el generar cepas etanológicas propias para estudios tanto básicos como de desarrollo tecnológico. Para este fin es necesario analizar distintos linajes de *E. coli*, para posteriormente elegir la mejor candidata con base en la velocidad específica de crecimiento en cultivos no aireados, así como los niveles de síntesis de productos de fermentación. Esta información indicaría cuáles vías competirían por la producción de etanol y las harían blanco de manipulación genética.

De tal manera, los objetivos principales de este proyecto se enfocaron a la construcción de una cepa etanológica de *Escherichia coli* con un fondo genético conocido. Así mismo, realizar un estudio de la regulación metabólica de la glucólisis y

del metabolismo del piruvato con células silvestres y etanológicas, con el objetivo de incrementar la velocidad específica de producción de etanol.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

HIPÓTESIS.

La caracterización de una cepa etanológica de *E. coli*, construida con un fondo genético conocido y seleccionada con base en altas velocidades de producción y rendimientos de etanol, permitirá establecer los puntos clave metabólicos y regulatorios relacionados en el flujo glucolítico y de formación de etanol, mediante el estudio de los niveles de transcrito, así como el análisis de las actividades enzimáticas.

OBJETIVO GENERAL.

Llevar a cabo un estudio de la regulación metabólica de las vías glucolítica y de fermentación en una cepa etanológica de *E. coli* con alta velocidad de producción y rendimiento de etanol.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Estudiar distintas cepas silvestres de *E. coli* con la finalidad de elegir un fondo genético adecuado para la construcción de una cepa etanológica.
- Construir una cepa etanológica de *E. coli* mediante la integración en cromosoma de los genes *pd_{cm}* y *adh_{cm}* de *Z. mobilis* sobre el fondo genético seleccionado.
- Determinar las velocidades específicas de consumo de glucosa y de acumulación de productos de fermentación en la cepa silvestre y en su derivada etanológica.

- Determinar y comparar las actividades enzimáticas de los pasos involucrados en la glucólisis y del metabolismo de piruvato en condiciones no aireadas entre la cepa silvestre y su derivada etanológica.
- Medir y analizar mediante RT-PCR los niveles de transcrito de la glucólisis, vía de las pentosas fosfato, Entner-Doudoroff, vías fermentativas y reguladores globales tanto en la cepa silvestre como en su derivada etanológica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Las cepas de *E. coli* evaluadas, así como los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en las tablas 1 y 2, respectivamente. Finalmente, la cepa *E. coli* C se utilizó como cepa progenitora y la cepa etanológica KO11 se utilizó como control positivo.

Tabla 1. Cepas de *E. coli* usadas y construidas durante este trabajo.

cepa	Características Relevantes	Referencia
W3110 Trp ⁺	F', λ , INV (<i>rnnD-rnnE</i>)1 Rec A ⁺ , Lac ⁺	Jensen, 1993
JM101	<i>SupE</i> , <i>thi</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), F'	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
MG1655	F', λ , <i>ilvG-rfb-50 rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> C	Silvestre	ATCC 8739
CCE14	<i>E. coli</i> C: <i>pflB::pdc adhB cat</i>	Este trabajo Orencio-Trejo <i>et al.</i> , 2008
KO11	<i>E. coli</i> W: <i>pflB::pdc adhB cat, Δfrd</i>	Ohta <i>et al.</i> , 1991 Jarboe <i>et al.</i> , 2007

Tabla 2. Plásmidos usados y construidos durante este trabajo.

Plásmido	Características Relevantes	Referencia
pLOI510	Cm ^R Derivado de pLOI295 que lleva los genes de <i>pdc</i> y <i>adh</i> de <i>Z. mobilis</i> flanqueados por fragmentos de reconocimiento del gen <i>pflB</i> para integrarse en el cromosoma de <i>E. coli</i> .	Ohta <i>et al.</i> , 1991
pTrc99A	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
pPPec	Ap ^R Derivado de pTrc99a que lleva los genes <i>pfkA</i> y <i>pykF</i> de <i>E. coli</i> .	Emmerling <i>et al.</i> , 1999
pTrc-gapdh	Ap ^R Derivado de pTrc99A que lleva el gen <i>gapA</i> de <i>E. coli</i> .	Este trabajo

Condiciones y Medios de Cultivo.

Generación de bancos celulares.

Con el propósito de obtener inóculos bajo las mismas condiciones a lo largo de todo el estudio, así como disminuir variaciones en los cultivos y fenómenos de mutación, se generaron bancos de células de las cepas *E. coli* C, KO11 y CCE14. Cada una de las cepas se creció en placas conteniendo medio Luria con glucosa (2%). En el caso de las cepas KO11 y CCE14, las placas se prepararon con cloramfenicol (Cm) 40 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Las cajas fueron incubadas a 30 °C por 24 horas. Posteriormente, se transfirieron 3 colonias a un tubo de ensayo estéril conteniendo el mismo medio líquido y se incubaron a 37 °C y 250 rpm alrededor de 3 horas. De esta suspensión se tomaron muestras de 1 mL y se mezclaron en crioviales con un volumen similar de glicerol al 80%. Los crioviales se almacenaron a -70 °C en un ultracongelador.

Condiciones de Crecimiento.

Las células congeladas en glicerol se sembraron en placas conteniendo medio Luria Bertani con glucosa (20 g/L) para la cepa silvestre y Cm en una concentración de 40 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las cepas etanológicas KO11 y CCE14, respectivamente. Se incubaron a 35 °C alrededor de 14 horas y se resembraron de manera sucesiva por 2 días. A partir de esas células se tomaron 3 colonias y se resuspendieron en un tubo de vidrio con 1 mL de M9 y se adicionaron al matraz que contenía el medio de cultivo para el inóculo. El crecimiento del inóculo se realizó en matraces de 500 mL, conteniendo 200 mL de medio M9, con 20 g/L de glucosa como fuente de carbono, temperatura de 35 °C y una agitación de 120 rpm. Los inóculos se incubaron alrededor de 14 horas, hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 1.0. Todos los cultivos fueron inoculados centrifugando (5,000 rpm, 10 min y temperatura ambiente) la

cantidad suficiente de inóculo para obtener una DO_{600} inicial de 0.1 (0.037 g_{DCW}/L), las células fueron transferidas a cada cultivo resuspendiéndolas en el medio respectivo.

Medios de Cultivo.

La composición del medio mínimo M9 (Maniatis *et al.*, 1982) para cultivo en minifermentadores, contiene por litro: 6 g Na_2HPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 1 g NH_4Cl ; 0.5 g $NaCl$; 2 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1M; 0.1 mL de $CaCl_2$ 0.1 M; 0.1 mL de Tiamina 1 mg/mL (esterilizada por filtración); 40 g de glucosa como fuente de carbono; y cloramfenicol a las concentraciones ya mencionadas para las cepas etanológicas.

Condiciones de Cultivo.

Los cultivos no aireados se realizaron en sistemas de mini-fermentadores o mini-fleakers (Beall *et al.*, 1992), con un volumen de trabajo de 200 mL. La temperatura se controló a 35 °C y el pH a 7.0 mediante la adición automática de KOH 2 N. Para garantizar el mezclado de los nutrientes, los cultivos se mantuvieron a una velocidad de agitación de 100 rpm. Es importante mencionar que los cultivos inician en condiciones aerobias y posteriormente se transforman en anaerobios gracias al crecimiento celular. Las actividades enzimáticas fueron verificadas en extractos celulares cosechados durante el crecimiento exponencial (6 h), así como durante la fase estacionaria (20 h). Los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado.

El sistema de mini-fermentadores o Fleakers (Figura1) consta de:

- a) Un control de temperatura, el cual está integrado por un baño con agua, un sensor de temperatura y un termocirculador de agua.
- b) Un control de pH, integrado por 6 electrodos, 6 controladores y 6 válvulas (solenoides) para la adición de base.

- c) Un sistema de agitación o parrilla magnética para 6 magnetos (rango de 50-850 rpm).
- d) 6 Mini-fermentadores o fleakers con un volumen nominal de 250 mL, cuyo sistema de agitación consiste en un agitador magnético en forma de cruz de 1 pulgada, y en la tapa contienen puertos para electrodo de pH, venteo, adición de base y toma de muestra.



Figura 1. Sistema de minifermentadores (fleakers) utilizados en este proyecto.

Métodos Analíticos.

Concentración celular.

La densidad óptica fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU-70) y convertida a peso seco de células (DCW: Dry cell weight), de acuerdo a una curva de calibración: $1 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.37 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$. Todas las muestras fueron centrifugadas

(5,000 rpm y temperatura ambiente); el paquete celular se desechó y el sobrenadante se congeló para su posterior análisis.

Determinación de glucosa y ácidos orgánicos.

La determinación de glucosa presente en el sobrenadante se realizó con un analizador enzimático, utilizando D-glucosa oxidasa inmovilizada (YSI Modelo 2700; Yellow Springs Instruments, Ohio USA). Los resultados fueron confirmados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Los productos de fermentación como ácidos orgánicos (acético, fórmico, succínico, láctico, pirúvico, etc.) y glicerol, también fueron determinados por HPLC. Para lo anterior se utilizó un cromatógrafo Waters (modelo U6K, Millipore Co., Milford, MA) y H₂SO₄ 5 mM como fase móvil (0.5 mL/min) a 50 °C. La separación se llevó a cabo isocráticamente usando la columna Aminex HPX-87H (Biorad). La detección de los compuestos separados, se llevó a cabo simultáneamente con un detector de arreglo de diodos (Waters 996) y un detector de índice de refracción (Waters 410). El análisis y procesamiento de datos se realizó con el sistema Millennium (Versión 3.01 Waters). Las temperaturas interna y externa de la columna fueron ajustadas a 45 y 50 °C respectivamente. Los sobrenadantes de las muestras a analizar se filtraron con membranas de 0.45 µm y se inyectaron automáticamente con ayuda del autoinyector (Waters 717). Para la confirmación de la glucosa y los productos analizados por HPLC se inyectaron estándares de glucosa, ácidos orgánicos, etanol e intermediarios metabólicos. Los datos obtenidos de las concentraciones de cada uno de los compuestos medidos, se calcularon con un método de Calibración-Interpolado del mismo software.

Determinación de etanol.

La determinación de etanol se llevó a cabo por cromatografía de gases (cromatógrafo de gases Agilent, Serie 6850, Wilmington, D.E.) utilizando como estándar interno 1-butanol. Se utilizó helio como fase móvil (5.0 mL/min, 19.05 psi y 65 cm/s) a través de una columna capilar (Innowax 19091 N-133E) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y con un espesor de película de 0.25 µm (J&W

Scientific). El volumen de sobrenadante inyectado automáticamente fue de 0.2 μ l. La detección de los compuestos separados se llevó a cabo con un detector de ionización de llama (FID-1A) a 250 °C. El análisis y procesamiento de datos se realizó con el programa Agilent Cerity QA/QC. Las temperaturas del horno fueron ajustadas con rampas de temperatura de 80 hasta 200 °C y la del detector a 250 °C.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el método de fenol caliente equilibrado en agua (Flores *et al.*, 2004). El RNA total se trató con DNasa y se cuantificó por densitometría en geles en agarosa al 1.2%. El cDNA se sintetizó por el método de síntesis de primera cadena de DNA utilizando iniciadores o “primeros” específicos (Tabla 3). Este cDNA se usó como templado para los ensayos de RT-PCR. La reproducibilidad del método se determinó a través de dos experimentos separados de síntesis de cDNA a partir de dos fermentaciones diferentes de cada cepa.

PCR de tiempo real (RT-PCR).

El PCR de tiempo real se realizó con el ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin Elmer/Applied Biosystems), utilizando el kit SYBR Green PCR Master Mix. (Perkin Elmer/Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 60 s de forma intercalada. Los iniciadores para la amplificación específica (Tabla 3) se diseñaron con el programa Primer Express software (PE Applied Biosystems). El tamaño de todos los amplímeros fue de 101 pb. La concentración final de los iniciadores, en un total de 15 μ L fue de 0.2 μ M. Se agregaron 5 ng de cDNA a cada reacción. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada gen de cada cepa. Se incluyó siempre un control sin templado y con la mezcla de reacción para cada gen. La técnica de cuantificación utilizada para analizar los datos fue el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por Livak and Shmittgen (2001).

Todos los datos se normalizaron utilizando el gen *ihfB* como control interno (“housekeeping gene”). Este gen codifica para una proteína involucrada en el curvamiento necesario para la recombinación sitio-específica y replicación del DNA. También está relacionada en regulación transcripcional y traduccional. La normalización se realizó con el fin de ajustar la concentración de cDNA de las muestras, ya que se detectó el mismo nivel de expresión del gen *ihfB* en todas las cepas en las condiciones de cultivo del presente estudio y estudios previos con otras variedades de *E. coli* (Flores *et al.*, 2005a). Posteriormente, se hizo una segunda normalización considerando como 1.0 el nivel de transcripción de todos los genes para cepa *E. coli* C, excepto los genes *pdz_{Zm}* y *adh_{Zm}*, en los cuales se consideró como 1.0 el nivel de transcripción de la cepa etanológica KO11. Por lo tanto, los datos están reportados como valores de expresión relativa, comparados al nivel de expresión de la cepa *E. coli* C y en el caso de *pdz_{Zm}* y *adh_{Zm}* a la cepa KO11. Los datos presentados en la sección de resultados son los promedios de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Los valores de expresión obtenidos por RT-PCR para cada gen difieren en menos del 30%. Sin embargo, para validarlos fue aplicada la prueba *t*-student con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

Tabla 3. Iniciadores utilizados para los estudios de RT-PCR y para amplificación de productos de PCR para secuenciación nucleotídica.

Gen	Nombre prímero	Secuencia del primerero
Glucólisis		
<i>ptsG</i>	ptsGa	5'- AAAAGCGACAGGTACCAGCG -3'
	ptsGb	5'- CGCGCAGACGGGTAATACAT -3'
<i>glk</i>	glka	5'- GAAGCGGTCATTTCGCGTTTA -3'
	glkb	5'- GTCATCGCCACCCAGTCAC -3'
<i>pgi</i>	pgia	5'- ACTAACGGTCAGCACGCGTT -3'
	pgib	5'- TCAGAGAGCGGGTTATGGGT -3'
<i>pfkA</i>	pfka	5'- CCATGTAGGAACCGTCACCG -3'
	pfkb	5'- GTTGGCGGATGAAAATGTCC -3'
<i>fbaA</i>	fbaAa	5'- GGAAATCGAACTGGGTTGCA -3'
	fbaAb	5'- CGTAATCAACGTCTTCCGGC -3'
<i>tpiA</i>	tpiAa	5'- AACTCCGGCTCAGGCACAG -3'
	tpiAb	5'- AGCCGCCGTACTGAATGATC -3'
<i>gapA</i>	gapAa	5'- GGCTCCGCTGGCTAAAGTTA -3'
	gapAb	5'- GGCCATCAACGGTTTTCTGA -3'
<i>pgk</i>	pgka	5'- AGATTACCTCGACGGCGTTG -3'
	pgkb	5'- TGGACAGGGTTTCGTCGTCT -3'
<i>gpmA</i>	gpmAa	5'- AGGCGTAAGCGAAGCAAAAAG -3'
	gpmAb	5'- GGGTATGGATAGCGGTTTC -3'
<i>eno</i>	enoa	5'- GTTTCGTGCGGTATGGCAGCT -3'
	enob	5'- GCCTTACCCAGGAAACGG -3'
<i>pykA</i>	pykAa	5'- CGTTACCACGTTAGGCCAG -3'

<i>pykF</i>	pykAb	5'- GCGAGCCGTGAGAAAAGTTC -3'
	pykFa	5'- TGTCTGGTGAATCCGCAAAA -3'
	pykFb	5'- CTCGAGACGGCTGTTCATCA -3'

Vía de las pentosas fosfato

<i>zwf</i>	zwfa	5'- GCACGCGTAGTCATGGAGAA -3'
	zwfb	5'- CGGTAAACCTGGCACTCCTC -3'
<i>gnd</i>	gnda	5'- GATCGGCGTAGTCGGTATGG -3'
	gndb	5'- TCTTCTCACGGAACGGTTG -3'
<i>rpe</i>	rpea	5'- GCCAATGGTGCTGAAATCCT -3'
	rpeb	5'- CAGCGAAATCAGGCACAATG -3'
<i>rpiA</i>	rpiAa	5'- GATGGGCGGCACCTTCAGTAT -3'
	rpiAb	5'- GCCTTTCATGTACCGAGCG -3'
<i>rpiB</i>	rpiBa	5'- GAGAGGTTGATGGCGGGATT -3'
	rpiBb	5'- AGGTTTCGCTACAGACGACCG -3'
<i>tktA</i>	tktAa	5'- AGTCCTGTGGCGTGATTTCC -3'
	tktAb	5'- AGATCAGCATGGAGCCGTG -3'
<i>tktB</i>	tktBa	5'- CCCGAAAAGACCTTGCCAAT -3'
	tktBb	5'- AATATCAGCCATGCCATCG -3'
<i>talA</i>	talAa	5'- CTCAAATCGTACCCGGTTCG -3'
	talAb	5'- TACAAGTCCACCAGATGGCG -3'
<i>talB</i>	talBa	5'- ACCGTAGTGGCCGACACTG -3'
	talBb	5'- GGAATCTGCGCTGCGTTAAG -3'
<i>eda</i>	edaa	5'- ATCCGTGCTATCGCCAAAGA -3'
	edab	5'- AACTGTGCACCCGCTTCAGT -3'
<i>edd</i>	edda	5'- GTACCGCTGATGGCACGTCT -3'
	eddb	5'- GCTTTGAGCAGTTCACGCAC -3'

Metabolismo fermentativo

<i>ackA</i>	ackAa	5'- CTGGTTCTGAACTGCGGTAGTTC -3'
	ackAb	5'- GGCAGGTGAAAACATTTCGG -3'
<i>adhE</i>	adhEa	5'- AAGTCCCTGTGTGCTTTCGG -3'
	adhEb	5'- TGCAGAGCCTGACCATCAGA -3'
<i>frdA</i>	frdAa	5'- TCTCTCAGGCCTTCTGGCAC -3'
	frdAb	5'- TTTTCTCTCGCCGAGGTGAC -3'
<i>frdB</i>	frdBa	5'- TTGAGGTGGTGCGCTATAACC -3'
	frdBb	5'- GCCCAGCGCATCCAGTAAT -3'
<i>frdC</i>	frdCa	5'- ACCGAAAGCGGCCAATATC -3'
	frdCb	5'- GGATTACGATGGTGGCAACC -3'
<i>frdD</i>	frdDa	5'- TGGTTCGCGTATTCCTGTTC -3'
	frdDb	5'- CCGCAGGTACGTGGATTTTC -3'
<i>fumA</i>	fumAa	5'- ATGTTCGATCAACTGCAAGCG -3'
	fumAb	5'- GAAGCCGCCGTGTTTTTAC -3'
<i>fumB</i>	fumBa	5'- GTACCCTCGGTACTGCAGCC -3'
	fumBb	5'- AGCGCTTGCTAACTGACGG -3'
<i>fumC</i>	fumCa	5'- CCCTAACGACGACGTGAACA -3'
	fumCb	5'- GAGGAATGAGTTGCTTGCGC -3'
<i>ldhA</i>	ldhAa	5'- GGCGTGATGATCGTCAATACC -3'
	ldhAb	5'- ACGTCCATACCCAACGAACC -3'
<i>mdh</i>	mdha	5'- CGGGTCTGCAACCCTGTCTA -3'
	mdhb	5'- CGTAGGCACATTCGACAACG -3'
<i>pflB</i>	pflBa	5'- AAGGTTCCCTGCAAAGCGTACA -3'
	pflBb	5'- GTAAACGTGCAACACGCCCT -3'
<i>pflD</i>	pflDa	5'- AAAGTCCGCGCTCGCTTAAT -3'
	pflDb	5'- TCTTTGCAGTAGTGGCGCAA -3'
<i>pta</i>	ptaa	5'- ACAATGTTGATCCGGCGAAG -3'
	ptab	5'- CATATCGATCGCACGAGTCCG -3'
<i>poxB</i>	poxBa	5'- AAAAGCCGATCGCAAGTTTC -3'
	poxBb	5'- GGTGAATGGCTTTCTCGCTC -3'
<i>pdc_{zm}</i>	pdc-zma	5'- GACAAAGTTGCCGTCCCTCGT -3'
	pdc-zmb	5'- ATGGTAGCAACTGCGCCAC -3'
<i>adh_{zm}</i>	adh-zma	5'- TTACCCCGATGGTTCCGT -3'
	adh-zmb	5'- TTCAAATGCGTGGGTGAGAG -3'

Algunos transportadores y reguladores relacionados al transporte de glucosa

<i>galP</i>	galPa	5'- CATGTATTACGCGCCGAAAA -3'
	galPb	5'- TGGCAAGTACGTTGGTCAGG -3'
<i>lamB</i>	lamBa	5'- AACTTCCTCTGGCGGTTGC -3'
	lamBb	5'- ACCTGTCCAACCAATACCGG -3'
<i>mglB</i>	mglBa	5'- CCAGCATGTTATTCGGTGCC -3'
	mglBb	5'- AGCCTTGCGCACTACAGACA -3'
<i>crp</i>	crpa	5'- ACCCGTCAGGAAATTGGTCA -3'
	crpb	5'- TTACCGTGTGCGGAGATCAG -3'
<i>mlc</i>	mlca	5'- GGTCCAGTCTCGCGTATCGA -3'
	mlcb	5'- TCTTGCACCAGGTGTGCTTC -3'

Otros reguladores

<i>fnr</i>	fnra	5'- CGGAAAAGCGAATTATACGGC -3'
	fnrb	5'- TTCGTTGAGTGTGAACGGGA -3'
<i>fruR</i>	fruRa	5'- TCTTGTGATCCCCGATCTGG -3'
	fruRb	5'- AGCAGGCAATCAGCAGTTGA -3'
<i>ihfA</i>	ihfAa	5'- GGCGAACAGGTGAAACTCTCTG -3'
	ihfAb	5'- GTAATGGGAATATCCTCGCCC -3'
<i>ihfB</i>	ihfBa	5'- GCCAAGACGGTTGAAGATGC -3'
	ihfBb	5'- GAGAAACTGCCGAAACCGC -3'

Preparación del extracto celular para ensayos enzimáticos.

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford. Los ensayos enzimáticos fueron realizados mediante métodos descritos anteriormente (Martínez *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2003). Para todos los ensayos enzimáticos, las células fueron cosechadas de los mini-fermentadores a las 6 horas (fase exponencial) y 20 horas (fase estacionaria) por centrifugación a 12,000 rpm de 3-5 min a 4 °C. A continuación, se lavaron 2 veces en amortiguador de cosecha y permeabilización Tris-HCl 100 mM pH 7.0 (Tris base 0.1 M; DTT 2 mM; EDTA 0.1 mM; MnSO₄ 5 mM; KCl 20 mM). Posteriormente, los paquetes celulares se resuspendieron en 1 mL de amortiguador de permeabilización y se sonicaron (Sonicador Soniprep 150) con 4 pulsos de 15 s cada uno con una amplitud de 14-16 micrones, separando cada pulso con 1 minuto y manteniéndolos en hielo con etanol. Finalmente, se removieron los restos celulares centrifugando 10 minutos a 10,000 rpm y a 4 °C. El extracto crudo resultante, se usó para determinar la actividad enzimática o se guardó a -20 °C. Todas las operaciones se llevaron a cabo en hielo.

La actividad enzimática específica es reportada como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}})$], la cual se define como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 μmol de sustrato a un producto específico por minuto por mg de proteína.

Cálculos:

Actividad volumétrica:

$$U_{\text{ENZIMA}} / \text{mL} = [(\Delta A_{340\text{nm}} / \text{min})(1\text{mL})] / [(6.22)(V_{\text{EC}})].$$

340nm = Longitud de onda empleada.

1 mL = Mezcla final de reacción.

$6.22 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ = coeficiente de extinción milimolar de NAD^+ , NADH y NADP a 340 nm. (SIGMA quality control test for alcohol dehydrogenase and Worthington Enzyme Manual, 1972).

V_{EC} = Volumen del extracto celular empleado, (0.1 o 0.05 mL).

Actividad específica:

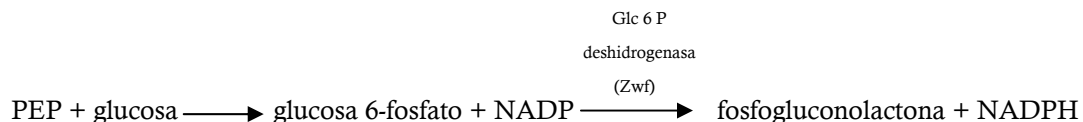
$$\text{UI} / \text{mg}_{\text{proteína}} = (\text{actividad volumétrica UI} / \text{mL}) / (\text{mg}_{\text{proteína}} / \text{mL})$$

Determinación de proteínas por el Método de Bradford ($\text{mg}_{\text{proteína}} / \text{mL}$).

Protocolos para la determinación de actividades enzimáticas.

Glucosa PEP fosfotransferasa (PTS).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 8.4 en Tris-HCl 0.1 M (Tris-HCl 0.1M; MgCl_2 0.01M).

Mezcla de reacción:

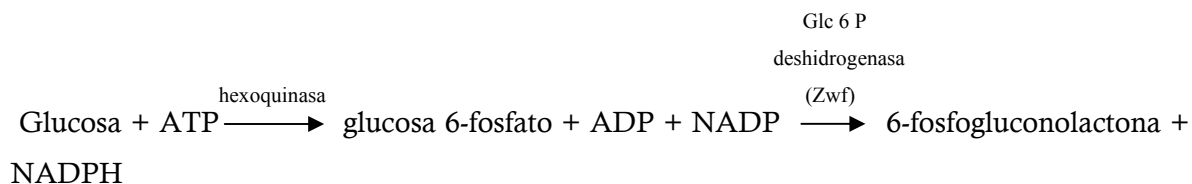
DTT 1 mM; NADP⁺ 1 mM; Glucosa 10 mM; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) 3 U; Fosfoenolpiruvato (PEP) 10 mM.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad del sistema de fosfotransferasa (PTS) es una reacción acoplada con la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ZWF) que cataliza la reacción desde glucosa-6-fosfato a fosfogluconolactona, monitoreando la reducción de NADP a 340 nm, como lo describen Peng y Shimizu, (2003).

Hexoquinasa (HEX).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.5 en Tris-HCl 0.1 M (Tris-HCl 0.1 M; MgCl₂ 0.06 M).

Mezcla de reacción:

DTT 1 mM; NADP⁺ 0.5 mM; ATP 2 mM; Glucosa 15 mM; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) 2 U.

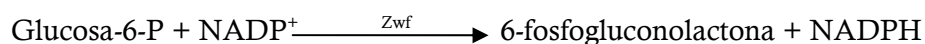
Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de la enzima hexoquinasa (HEX) es una reacción acoplada con la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

(ZWF) que cataliza la reacción desde glucosa-6-fosfato a fosfogluconolactona, monitoreando la reducción de NADP a 340 nm, como lo describen como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (ZWF).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.8 en Tris-HCl 0.1 M (Tris-HCl 0.1M; MgCl₂ 0.006 M).

Mezcla de reacción:

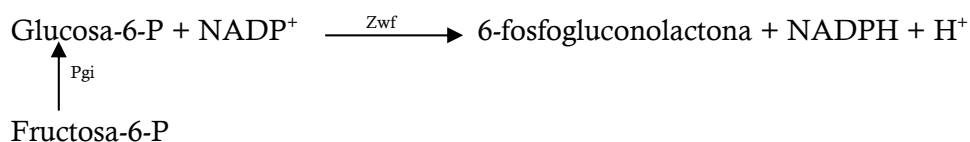
DTT 1 mM; NADP⁺ 1 mM; Glucosa 6-fosfato 2 mM.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de ZWF es una reacción en la cual se monitorea la reducción de NADP⁺ a 340 nm, (no está acoplada) como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Fosfoglucosa isomerasa (PGI).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.8 en Tris-HCl 0.1 (Tris-HCl 0.1M; MgCl₂ 0.2 M).

Mezcla de reacción:

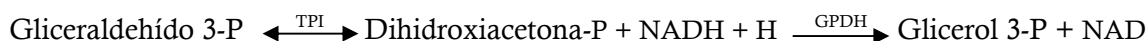
NADP⁺ 0.5 mM; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) 1 U; Fructosa 6-P sal de sodio 2 mM .

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de PGI es una reacción acoplada con la reacción catalizada por ZWF, monitoreando la reducción de NADP⁺ a 340 nm como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Fosfofructocinasa (PFK).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.0 en Imidazol 0.05 M.

Mezcla de reacción:

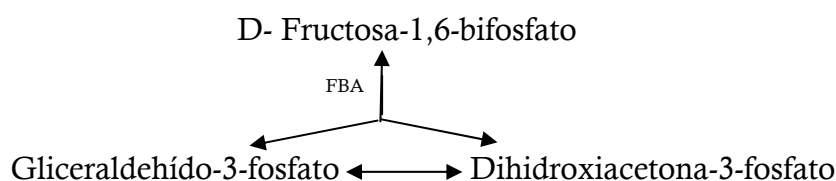
ATP 0.05 mM; MgCl₂ 5 mM; EDTA 1 mM; NADH 0.25 mM; Fructosa 6-P sal de sodio 0.25 mM; Aldolasa 0.5 U; Glicerofosfato deshidrogenasa 0.5 U; Triosa fosfato isomerasa 0.5 U.

Resumen del ensayo:

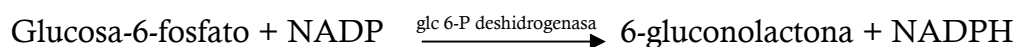
El ensayo de actividad de PFK es una reacción acoplada con la reacción catalizada por la aldolasa, gliceraldehído 3P deshidrogenasa y triosa fosfato isomerasa monitoreando la oxidación de NADH a 340 nm como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (FBA).

Reacción:



Determinación de Actividad:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.0 en Imidazol 0.05 M (Imidazol 0.05M; KCl 0.1 M; MgCl₂ 0.01 M).

Mezcla de reacción:

EDTA 1 mM; NADP 0.25 mM; Fructosa 1,6 bifosfato 2 mM; Fosfoglucosa isomerasa 0.5 U; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) 0.5 U.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de FBA es una reacción acoplada con la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, monitoreando la oxidación de NADP a 340 nm como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Triosa fosfato isomerasa (TPI).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.8 en Trietanolamina 0.3 M.

Mezcla de reacción:

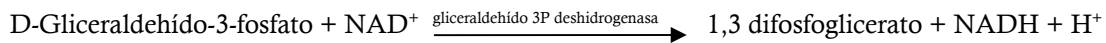
NADH 0.2 mM; Glicerofosfato deshidrogenasa 1 U; Gliceraldehído 3-Fosfato 5 mM.

Resumen del ensayo:

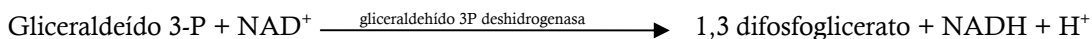
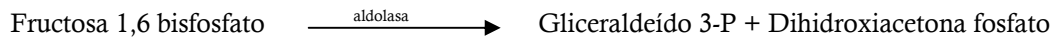
El ensayo de actividad de TPI es una reacción acoplada con la reacción catalizada por glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) que cataliza la reacción desde dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato, monitoreando la oxidación de NADH + H a 340 nm, como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Reacción:



Determinación de Actividad:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 8.1 en Tricina 0.1 mM, K₂HPO₄ 5 mM, Arsenato de sodio 20 mM y DTT 2 mM.

Mezcla de reacción:

Fructosa 1,6 bisfosfato 2 mM; NAD⁺ 1 mM; Aldolasa 1 U.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH) es una reacción acoplada con la reacción catalizada por la aldolasa que cataliza la reacción desde fructosa 1,6 bisfosfato a dihidroxiacetona-P y gliceraldehído 3-P, monitoreando la reducción del NAD a 340 nm como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Fosfoglicerato cinasa (PGK).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.8 en Trietanolamina 0.1 M (Trietanolamina 0.1 M; MgSO₄ 0.002 M).

Mezcla de reacción:

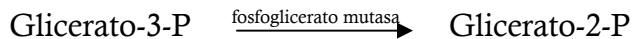
EDTA 1 mM; ATP 1 mM; 3-Fosfoglicerato 10 mM; GAPDH 20 U/mL; NADH 0.3 mM.

Resumen del ensayo:

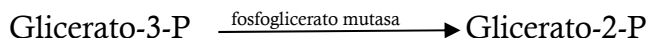
El ensayo de actividad de PGK es una reacción reversible acoplada con la reacción catalizada por GAPDH, monitoreando la oxidación del NADH a 340 nm como lo describen Peng y Shimizu (2003).

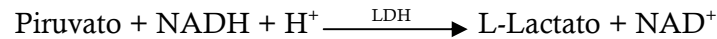
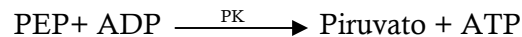
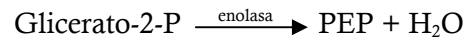
Fosfoglicerato mutasa (PGM).

Reacción:



Determinación de actividad:





Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.8 en Tris-HCl 0.1 M (Tris-HCl 0.1M; MgCl₂ 0.01 M).

Mezcla de reacción:

NADH 0.3 mM; ADP 1 mM; Enolasa 1 U; Piruvato kinasa 1 U; Lactato deshidrogenasa 1 U; 3-Fosfoglicerato 1 mM.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de la fosfoglicero-mutasa (PGM) es una reacción acoplada con la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH) que cataliza la reacción desde piruvato a lactato, monitoreando la oxidación de NADH + H a 340 nm, como lo describen Maitra y Lobo (1971).

Piruvato cinasa (PYK).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.5 en Tris-HCl 0.1 M (Tris-HCl 0.1M; MgCl₂ 0.015 M).

Mezcla de reacción:

ADP sal de sodio 5 mM; DTT 1 mM; KCl 10 mM; Fosfoenolpiruvato 0.5 mM; NADH sal de sodio 0.25 mM; LDH 10 U.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de PYK es una reacción acoplada con la reacción catalizada por la LDH, monitoreando la oxidación de NADH a 340 nm como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Piruvato formato liasa (PFL).

Reacción:



Determinación de actividad:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 6.5 en Tris-HCl 0.1 M (Tris-HCl 0.1 M; DTT 0.01 M).

Mezcla de reacción:

NAD⁺ 1 mM; CoA 0.2 mM; L-malato 5 mM; Citrato sintasa 4 U, Malato deshidrogenasa 20 U; Piruvato de sodio 50 mM.

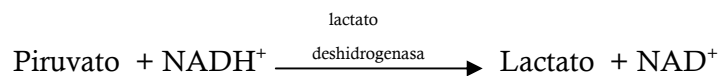
Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de la enzima piruvato formato liasa (PFL) es una reacción acoplada con la reacciones catalizadas por las enzimas citrato sintasa que

cataliza la reacción de acetil-CoA a oxalacetato y por la enzima malato deshidrogenasa que cataliza la reacción de oxalacetato a malato, monitoreando la reducción del NAD a 340 nm, como lo describen Peng y Shimizu (2003).

Lactato deshidrogenasa (LDH).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 7.0 en fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0.1 M.

Mezcla de reacción:

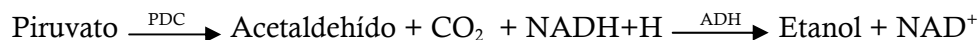
NADH 0.15 mM; piruvato de sodio 0.75 mM.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es medida directamente con la adición de piruvato, monitoreando la oxidación de NADH a 340 nm como lo describen Peng y Shimizu (2003) y Van der Werf *et al.* (1997).

Piruvato decarboxilasa (PDC).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 6.5 en K-MES-MgCl₂ (K-Mes 0.05M; MgCl₂ 0.005 M).

Mezcla de reacción:

NADH 0.15 mM; Tiamina pirofosfato (TPP) 0.1 mM; Piruvato 5 mM; Alcohol deshidrogenasa (ADH) 10 U.

Resumen del ensayo:

El ensayo de actividad de la piruvato decarboxilasa (PDC) es una reacción acoplada a la alcohol deshidrogenasa (ADH) monitoreando la reducción de NAD a 340 nm, como lo describe Hoppner *et al.* (1983) y Conway *et al.* (1987).

Alcohol deshidrogenasa (ADH).

Reacción:



Condiciones:

El ensayo se desarrolla a 30 °C y pH de 8.5 en Tris-HCl (Tris-HCl 0.03 M + 0.288 mL de etanol absoluto por cada 5 mL de amortiguador de enzima).

Mezcla de reacción:

NAD 20 mM.

Resumen del ensayo:

La actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) es monitoreada por la reducción del NAD⁺ a 340 nm, como lo describe Conway *et al.* (1987).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Caracterización de cuatro cepas silvestres de *E. coli* en condiciones no aireadas.

Para iniciar con el primer objetivo particular del proyecto y construir una cepa etanológica, se analizaron varias cepas silvestres. Una de ellas fue la cepa silvestre *E. coli* C, así como otras provenientes del linaje de *E. coli* K-12 (W3110, JM101 y MG1655) (Tabla 1). Este estudio se realizó con la finalidad de elegir una cepa silvestre que en condiciones no aireadas presentara una alta velocidad específica de crecimiento y de consumo de glucosa, así como la localización de un producto de fermentación mayoritario. El encontrar un producto mayoritario indicaría que el promotor de el/los genes que codifican para las enzimas involucradas en esa vía en particular, son fuertes y por lo tanto, blanco para la integración en cromosoma de los genes piruvato decarboxilasa (*pdh_{Zm}*) y alcohol deshidrogenasa (*adh_{Zm}*) de *Z. mobilis*.

La caracterización se llevó a cabo en minifermentadores en condiciones no aireadas, en medio mineral M9 con 40 g/L de glucosa. Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad específica de consumo de glucosa (q_{Glc}), y la velocidad específica de formación de productos de fermentación (q_p) (Tablas 4, 5 y 6).

Tabla 4. Constantes cinéticas y crecimiento celular en condiciones no aireadas.

Cepa	μ		q_{Glc} Fase		q_{Glc} Fase		Y	
			Exponencial		Estacionaria		Biomasa/glucosa	
W3110	0.32	± 0.01	1.06	± 0.09	0.50	± 0.01	0.20	± 0.01
JM101	0.41	± 0.02	2.11	± 0.14	0.67	± 0.02	0.06	± 0.02
MG1655	0.30	± 0.02	2.61	± 0.05	0.49	± 0.05	0.11	± 0.05
<i>E. coli</i> C	0.51	± 0.02	3.95	± 0.10	0.97	± 0.15	0.12	± 0.15

μ = Velocidad específica de crecimiento (1/h).

q_{Glc} = Velocidad específica de consumo de glucosa (g glc / g_{DCW} · h).

\pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

Y = Rendimiento

Tabla 5. Velocidades específicas de formación de ácidos orgánicos, glicerol y etanol (q_p) en fase exponencial.

Cepa	Acetato	Formato	Succinato	Lactato	Glicerol	Piruvato	Etanol
W3110	0.64 \pm 0.02	1.12 \pm 0.002	0.15 \pm 0.004	0.07 \pm 0.006	0.11 \pm 0.01	0	0.43 \pm 0.01
JM101	0.70 \pm 0.05	1.12 \pm 0.09	0.12 \pm 0.02	0.04 \pm 0.003	0.12 \pm 0.01	0.03 \pm 0.008	0.27 \pm 0.18
MG1655	0.60 \pm 0.05	0.85 \pm 0.10	0.10 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0	0	0.40 \pm 0.05
<i>E. coli</i> C	1.15 \pm 0.15	1.96 \pm 0.19	0.20 \pm 0.02	0.09 \pm 0.05	0	0	0.72 \pm 0.09

q_p = Velocidad específica de formación de producto (g producto /g_{DCW}. h).

\pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

Tabla 6. Velocidades específicas de formación de ácidos orgánicos, glicerol y etanol (q_p) en fase estacionaria.

Cepa	Acetato	Formato	Succinato	Lactato	Glicerol	Piruvato	Etanol
W3110	0.07 \pm 0.01	0.16 \pm 0.09	0.02 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01	0.02 \pm 0.002	0.02 \pm 0.002	0.07 \pm 0.07
JM101	0.007 \pm 0.02	0.07 \pm 0.14	0.05 \pm 0.02	0.48 \pm 0.02	0	0	0.06 \pm 0.01
MG1655	0.06 \pm 0.02	0.12 \pm 0.05	0.02 \pm 0.05	0.23 \pm 0.05	0	0	0.08 \pm 0.003
<i>E. coli</i> C	0.08 \pm 0.02	0.21 \pm 0.10	0.06 \pm 0.15	0.73 \pm 0.15	0	0.09 \pm 0.03	0.09 \pm 0.002

q_p = Velocidad específica de formación de producto (g producto /g_{DCW}. h).

\pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

La cepa W3110 presenta una μ menor comparada con las cepas JM101 y *E. coli* C. Además, las q_{Glc} 's en fase exponencial y estacionaria fueron las más bajas respecto a las otras cepas evaluadas (Tabla 4), lo que hace evidente que la cepa W3110 no crece bien en condiciones anaerobias. En fase exponencial, W3110 produce formato a una mayor velocidad, seguido de acetato. En fase estacionaria, W3110 presentó la segunda mayor velocidad de producción de formato (Tabla 6), llegando una concentración final similar a la de la cepa *E. coli* C, pero en el doble de tiempo (Figura 2 E). Así mismo, como se muestra en la Figura 3, la cepa W3110 destina la mayor cantidad de carbono hacia la síntesis de biomasa respecto a las otras cepas evaluadas. Esta característica no es deseable, ya que el objetivo es convertir la mayor cantidad posible de carbono en etanol.

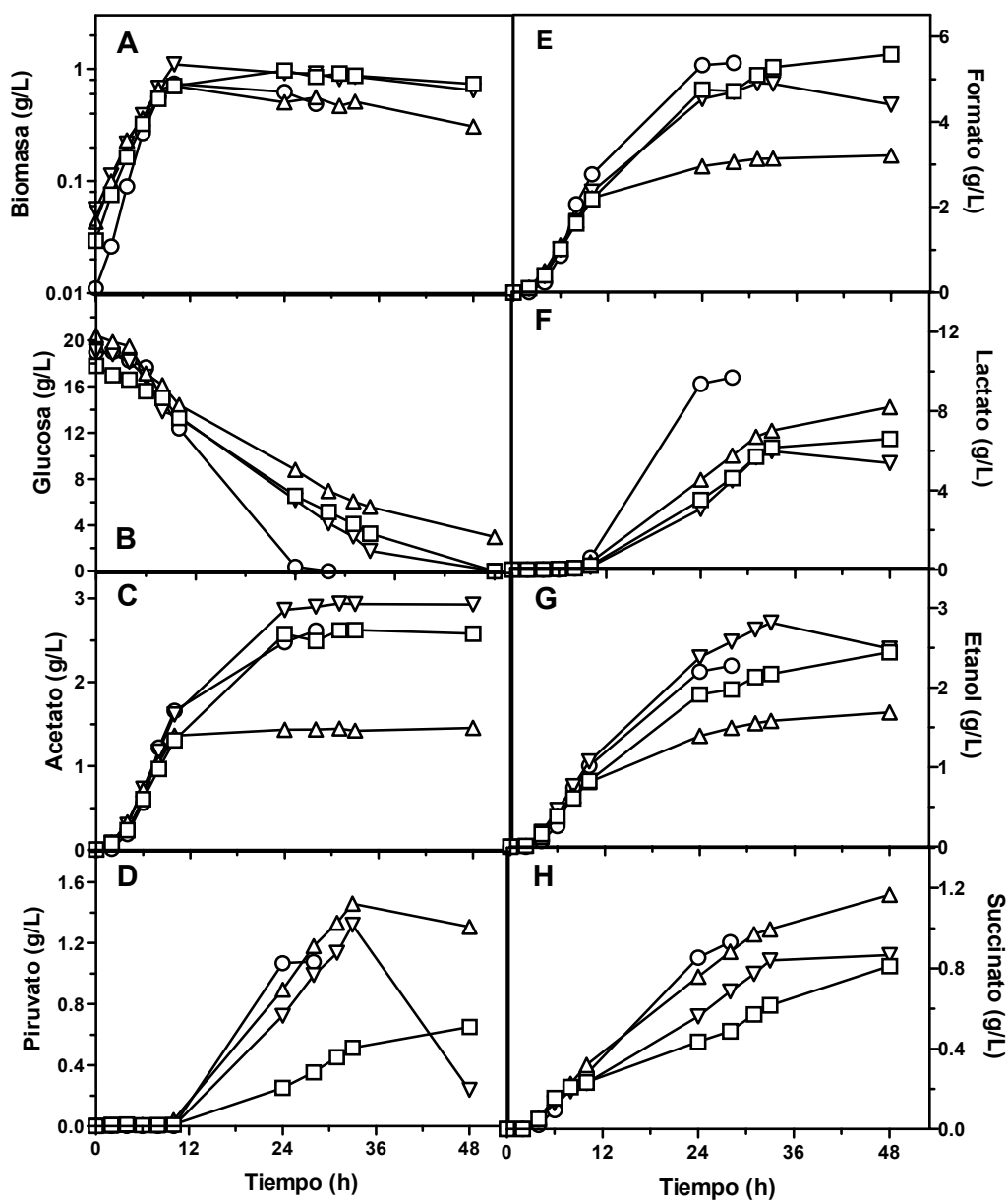


Figura 2. Caracterización de cepas silvestres en medio mineral M9 con 20 g/L de glucosa.

W3110 (□), JM101 (Δ), MG1655 (∇), *E. coli* C (O).

Biomasa (A), glucosa (B), acetato (C), piruvato (D), formato (E), lactato (F), etanol (G) y succinato (H).

La cepa JM101 presentó una q_{Glc} tanto en fase exponencial como estacionaria relativamente bajas respecto a la cepas *E. coli* C y MG1655. Por otro lado, destina la menor cantidad de carbono hacia la síntesis de biomasa respecto a las demás cepas evaluadas (Figura 3). Respecto a la producción de ácidos orgánicos ($q_{ácidos}$) durante la fase exponencial, la cepa JM101 produjo acetato a una velocidad similar a W3110 y mayor a la cepa MG1655 (Tabla 5). La $q_{formato}$ fue similar a la de la cepa W3110. En general, las velocidades específicas de producción de succinato, lactato y glicerol fueron bajas (Tabla 5). Sin embargo, la cantidad de carbono acumulado como piruvato es la mayor respecto al de las otras cepas evaluadas (Figura 2 D). En fase estacionaria, la cepa JM101 presentó la segunda mayor $q_{lactato}$, llegando a una concentración final de alrededor de 8 g/L (Figura 2 F). Esto concuerda con el balance de carbono presentado en la Figura 3, donde se observa claramente que esta cepa destina la mayor parte del carbono hacia la producción de lactato. De acuerdo a lo anterior, la cepa JM101 podría ser considerada una buena candidata para la producción de etanol, ya que destina el carbono principalmente hacia un solo producto, el cual podría ser un blanco para modificación genética. Sin embargo, en los cultivos realizados se observaron agregados celulares que podrían representar dificultades adicionales en el futuro, por lo que esta cepa fue descartada.

La cepa MG1655 presentó una μ baja respecto a las cepas JM101 y *E. coli* C, no obstante, la q_{Glc} fue la segunda mayor en fase exponencial (Tabla 4). Sin embargo, la q_{Glc} en fase estacionaria fue, junto con la obtenida en la cepa W3110, la menor de todas las cepas evaluadas. Esta característica es importante y desfavorable en este caso, ya que los cultivos para producción de etanol son realizados en medio mineral con concentraciones elevadas de glucosa, por lo que la fase estacionaria es larga. Como se observa en la Figura 3, la cepa MG1655 no destina el carbono de forma mayoritaria hacia un solo producto, más bien lo destina de forma balanceada hacia la producción de lactato, etanol (por la vía homóloga), formato y acetato (Figura 2 F-G-E-C). Debido a esta distribución de carbono, sería difícil determinar un blanco de modificación genética para integrar la vía etanológica heteróloga, por lo que esta cepa también fue descartada.

Cepas	Carbono recuperado (%)
W3110	104.13
JM101	105.82
MG1655	108.83
E. coli C	108.96

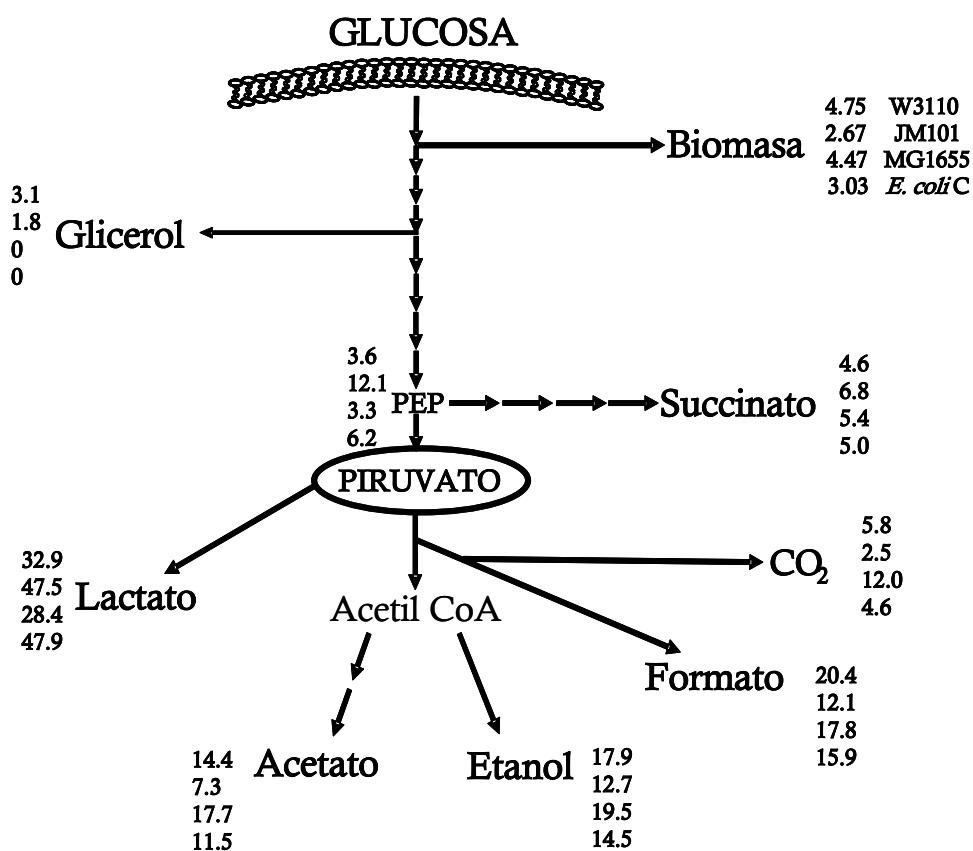


Figura 3. Distribución del carbono en las cepas silvestres de *E. coli* al final del cultivo (48 h). Datos presentados en porcentaje de carbono.

La cepa *E. coli C* presentó la μ más alta, así como la mayor q_{Glc} en ambas fases del cultivo (Tabla 4). Como se observa en las Figuras 2 y 3, esta cepa no canaliza mucho carbono hacia la síntesis de biomasa y no produce glicerol. En contraste, destina la mayor cantidad de carbono hacia la producción de lactato y formato, que

llegan a ser de alrededor de 10 y 6 g/L respectivamente (Figura 2 F-E). Estas concentraciones finales son alcanzadas en la mitad del tiempo respecto a las demás cepas evaluadas, lo que da por resultado un tiempo de cultivo significativamente menor (Figura 2 A). Esta característica es muy importante al pensar en una cepa de producción. De acuerdo con la producción final de formato, se consideró al promotor del gen de la piruvato formato liasa (*pfl*) como un blanco potencial para hacer la integración en cromosoma de la vía heteróloga para la producción de etanol. Dadas estas características, *E. coli* C se seleccionó como progenitora para construir la nueva cepa etanológica.

Construcción de la cepa etanológica derivada de *E. coli* C.

Como parte del objetivo general del proyecto y con la finalidad de contar con una cepa etanológica en un fondo genético adecuado y conocido, se construyó una nueva cepa etanológica proveniente de *E. coli* C. Esto se llevó a cabo integrando a cromosoma los genes piruvato decarboxilasa (*pdc_{Zm}*) y alcohol deshidrogenasa (*adh_{Zm}*) de *Z. mobilis* bajo el promotor de la piruvato formato liasa (*pfl*). Para la integración en cromosoma se utilizó el plásmido pLOI510 (Tabla 2). Este vector tiene un tamaño de 12.6 Kb y contiene los genes *pdc_{Zm}*, *adh_{Zm}* y *cat* flanqueados por sitios de reconocimiento para el gen de *pfl* (Ohta *et al.*, 1991). Para garantizar que la selección de colonias resistentes a cloramfenicol tuvieran integrados en cromosoma los genes heterólogos, a este plásmido se le escindió la parte de la secuencia que contenía el origen de replicación mediante una digestión con la enzima *SaI*I. Posteriormente, la secuencia que contenía los genes *pdc_{Zm}* y *adh_{Zm}* se ligó, dando como resultado un plásmido de 8.6 Kb. Finalmente, una cantidad de alrededor de 3 µg de plásmido se electroporó en la cepa *E. coli* C.

Las colonias obtenidas con la estrategia antes mencionada se seleccionaron en cajas Petri, con medio LB glucosa (20 g/L) y cloramfenicol de 20 µg/mL. Posteriormente, se eligieron al azar algunas de ellas y se evaluó la producción de CO₂

en tubos con medio LB glucosa (20 g/L). La evaluación de la producción de etanol se realizó en mini-fermentadores (*fleakers*). La cepa finalmente seleccionada fue denominada **CCE14** (*E. coli* C etanológica).

Crecimiento y producción de ácidos orgánicos.

Se realizaron cultivos no aireados con la nueva cepa CCE14, en medio M9 con 40 g/L de glucosa en mini-fermentadores (*fleakers*), bajo condiciones controladas de temperatura (35 °C), agitación (100 rpm) y pH (7.0). La evaluación se realizó comparándola con la cepa parental *E. coli* C y utilizando a la cepa etanológica KO11 como control positivo. Los resultados se muestran en las Tablas 7, 8 y 9.

Tabla 7. Constantes cinéticas y crecimiento celular de las cepas estudiadas en cultivos no aireados.

Cepa	μ	q_{Glc}		Densidad celular máxima
		Fase Exponencial	Fase Estacionaria	
<i>E. coli</i> C	0.42 \pm 0.005	2.73 \pm 0.02	1.11 \pm 0.11	1.28 \pm 0.07
CCE14	0.38 \pm 0.01	3.68 \pm 0.12	1.20 \pm 0.10	1.07 \pm 0.09
KO11	0.45 \pm 0.01	3.49 \pm 0.09	0.97 \pm 0.06	1.39 \pm 0.04

μ = Velocidad específica de crecimiento (1/h).

q_{Glc} = Velocidad específica de consumo de glucosa (g glc/g_{DCW} h).

Densidad celular máxima obtenida al inicio de la fase estacionaria = (g_{DCW}/L).

\pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

Tabla 8. Velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos y etanol, en fase exponencial y condiciones no aireadas.

Cepa	Acetato	Formato	Succinato	Etanol
<i>E. coli</i> C	0.95 \pm 0.08	1.21 \pm 0.03	0.29 \pm 0.03	0.58 \pm 0.05
CCE14	0.39 \pm 0.04	0.67 \pm 0.04	0.28 \pm 0.04	2.08 \pm 0.01
KO11	0.79 \pm 0.04	1.59 \pm 0.02	ND	1.63 \pm 0.01

q_p = Velocidad específica de producción (g producto/g_{DCW} h).

\pm Desviación Estándar de tres experimentos independientes.

ND No detectado.

Tabla 9. Velocidades específicas de producción de ácidos orgánicos y etanol, en fase estacionaria y condiciones no aireadas.

Cepa	Acetato	Formato	Succinato	Lactato	Piruvato	Etanol
<i>E. coli</i> C	0.14 ±0.07	0.26 ±0.06	0.04 ±0.01	0.26 ±0.04	0.25 ±0.02	0.12 ±0.06
CCE14	0.04 ±0.08	0.05 ±0.04	0.06 ±0.01	0.01 ±0.015	ND	0.68 ±0.01
KO11	0.10 ±0.01	0.19 ±0.02	ND	0.03 ±0.05	0.01 ±0.001	0.37 ±0.03

q_p = Velocidad específica de producción (g producto/g_{DCW} h).

± Desviación estándar de tres experimentos independientes.

ND No detectado

Con los datos presentados en las tablas anteriores es posible conocer el perfil de producción de ácidos orgánicos y etanol de la cepa CCE14. La μ fue similar para las tres cepas, sin embargo, comparadas con la cepa silvestre, la q_{Glc} en fase exponencial fue mayor en 28 y 34 % en las cepas etanológicas KO11 y CCE14 respectivamente. Durante la fase estacionaria, la cepa etanológica CCE14 tuvo la mayor q_{Glc} . El rendimiento biomasa/glucosa ($Y_{x/s}$) para la cepa CCE14 fue ligeramente menor a las demás, relacionado con el hecho de que alcanzó una menor concentración celular (Tabla 7).

Como se observa en la Tabla 8, durante la fase exponencial la nueva cepa etanológica produjo acetato y formato a velocidades menores a las que presentaron las cepas *E. coli* C y KO11, mientras que produjo succinato a la misma velocidad que la cepa progenitora. Sin embargo, produjo etanol a una velocidad mayor a la cepa etanológica KO11.

En fase estacionaria, la cepa CCE14 produjo ácidos orgánicos, pero a baja velocidad, mientras que la velocidad específica de producción de etanol (q_{EtOH}) fue 80% mayor que la velocidad de la cepa KO11 y 400% mayor que la de la cepa progenitora (Tabla 9). Al final del cultivo, la producción de etanol de la cepa CCE14 fue mayor en un 20% comparada con la cepa KO11 (Figura 4). Considerando que por cada gramo de glucosa pueden producirse 0.51 g de etanol y de que el cultivo se alimentó con 40 g/L

de glucosa, los rendimientos de etanol respecto al teórico máximo fueron de 15, 90 y 70%, para *E. coli* C, CCE14 y KO11, respectivamente.

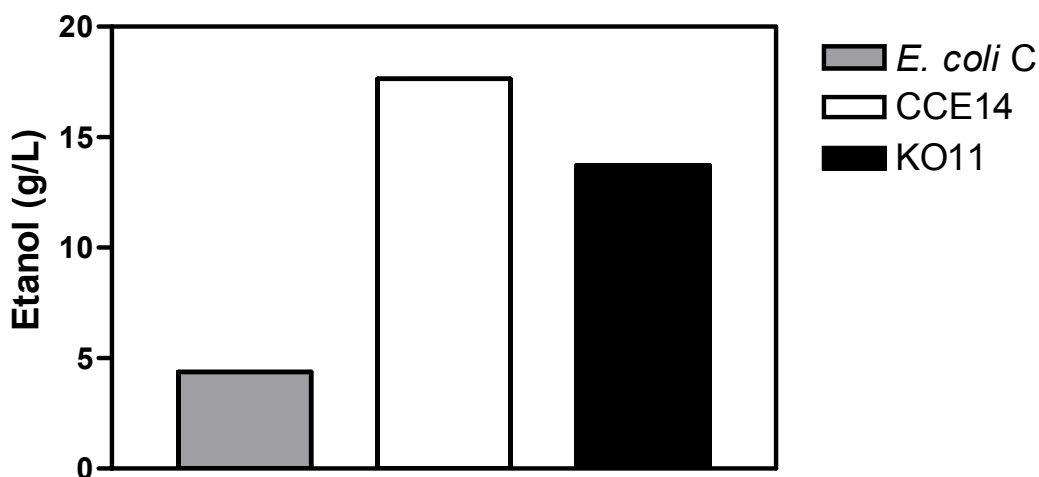


Figura 4. Producción de etanol de las cepas *E. coli* C, KO11 y CCE14 a las 30 h en medio M9 con 40 g/L de glucosa.

Regulación metabólica a nivel enzimático.

Como parte de los objetivos particulares del proyecto, se montaron los protocolos para determinar las actividades enzimáticas de la glucólisis y del metabolismo del piruvato en condiciones no aireadas (Peng *et al.*, 2003; Conway, 1987). Los ensayos fueron realizados en las tres cepas, a las 6 horas durante la fase de crecimiento exponencial, y a las 20 horas durante la fase estacionaria. Los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado y se muestra el resultado de tres experimentos independientes.

Actividades enzimáticas de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} .

Las actividades enzimáticas de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} , tanto en la fase exponencial como en la estacionaria en la cepa CCE14 fueron alrededor de 5 y 4 veces mayores que en KO11 (Figura 6). Aunque la vía heteróloga para la producción de etanol fue integrada en cromosoma utilizando la misma estrategia para ambas cepas etanológicas, se encontraron diferencias significativas tanto en los niveles de actividad enzimática, como en los de transcrito de ambos genes (como se mostrará posteriormente). Este fenómeno puede deberse a que los linajes de los cuales provienen las cepas KO11 y CCE14 son diferentes. Es posible también que estas diferencias estén relacionadas a la presión de selección a la cuál fue sometida la cepa KO11.

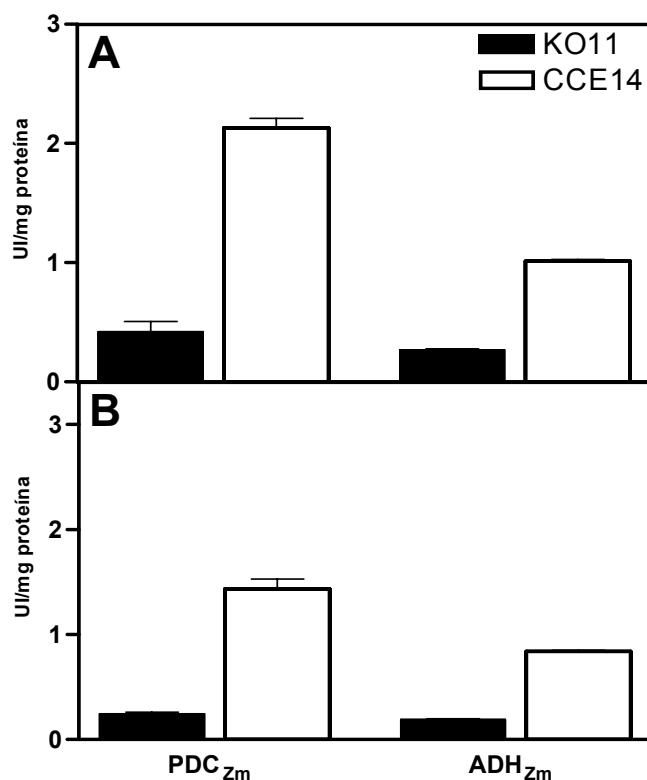


Figura 5. Valores de Actividades enzimáticas (UI/mg prot) de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} en las cepas KO11 y CCE14.

Fase exponencial (A), Fase estacionaria (B).

Efecto de la actividad enzimática de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} sobre las enzimas de glucólisis y fermentación.

Durante la fase exponencial (Figura 6), en la cepa CCE14 las enzimas con niveles de actividad mayores respecto a la cepa progenitora *E. coli* C fueron PTS, PGK y ZWF. Estos datos correlacionan con el hecho de que la cepa etanológica consume la glucosa a una velocidad mayor (Tabla 7), mientras que el incremento en la actividad de PGK sugiere que la sobreexpresión de los genes que codifican para PDC_{Zm} y ADH_{Zm} modifican el balance de ATP/ADP. Está reportado que en condiciones aerobias, una alta demanda de ATP causa un incremento en el flujo glucolítico en *E. coli* (Koebmann *et al.*, 2002a). Dentro del mismo contexto, se ha demostrado que en *Lactococcus lactis* el control de la glucólisis reside en gran parte, en procesos fuera de la vía, tales como el transporte de glucosa (Papagianni *et al.*, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos, es evidente que la vía heteróloga de producción de etanol incrementa el flujo glucolítico, de ahí el incremento en la producción y consumo de ATP. El ATP también es producido cuando hay formación de acetato, sin embargo, CCE14 no produce acetato durante la fase exponencial. Al parecer, las células tratan de aumentar la formación de ATP a través de un incremento en la síntesis de PGK, aunque no se observó aumento en el nivel de actividad de PYK. Al observar este comportamiento de PYK y pensando que se podría incrementar aún más el flujo glucolítico, la cepa CCE14 fue transformada con el plásmido pPEC, que sobreexpresa los genes *pfkA* y *pykF* de *E. coli* (Tabla 2) (Emmerling *et al.*, 1999). Con esta cepa (CCE14/pPEC) se llevaron a cabo cultivos con 40 g/L de glucosa bajo las condiciones ya descritas (datos no mostrados). En resumen, no se observaron cambios en la velocidad específica de crecimiento, el consumo de glucosa ni el rendimiento de etanol en relación a la cepa CCE14 sin el plásmido, por lo que se descartó una posible limitación en la glucólisis por la enzima PYK.

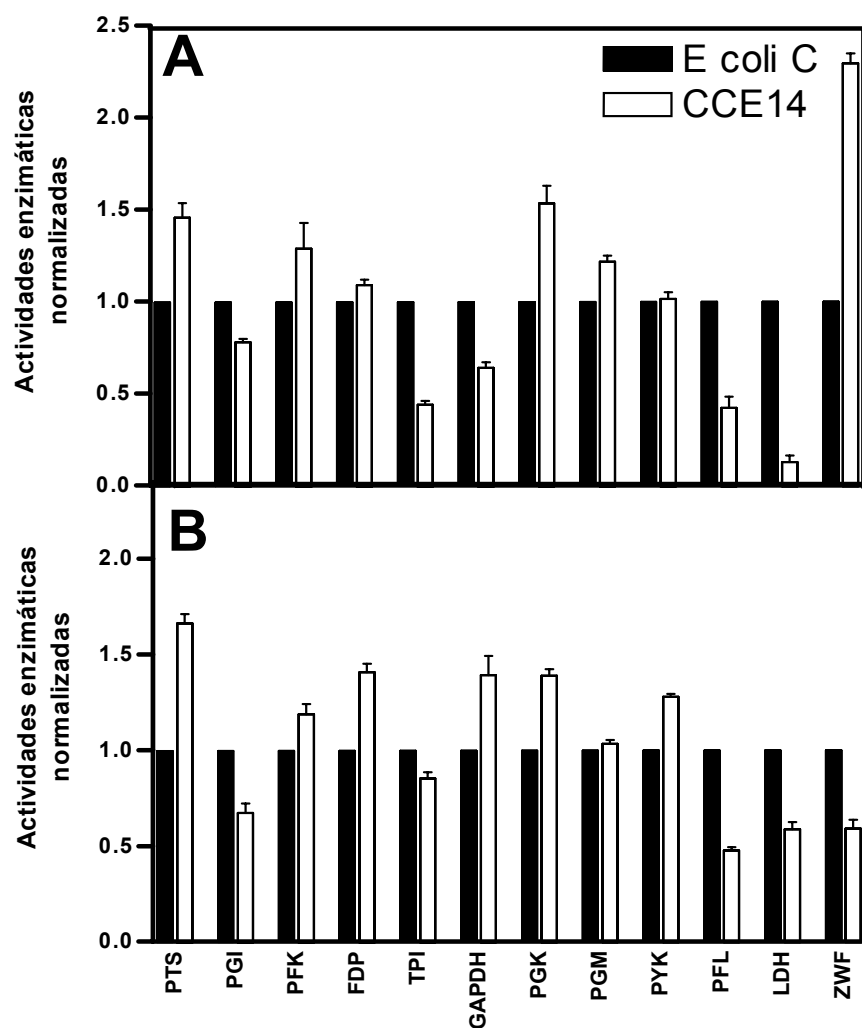


Figura 6. Actividades enzimáticas específicas de la cepa etanológica CCE14, normalizadas con respecto a la cepa progenitora *E. coli C*.

Fase exponencial (A), Fase estacionaria (B).

En la fase exponencial, las enzimas TPI, GAPDH, LDH y PFL presentaron niveles de actividad por debajo de los de la cepa progenitora (Figura 6 A). Esto correlaciona con la reducción en la producción de formiato y lactato (Figura 7 D-G). A pesar de la baja actividad de TPI en la cepa CCE14, ésta parece no afectar el flujo glucolítico. Así mismo, en los cultivos realizados no se detectó glicerol, lo que indicaría una baja tasa de interconversión entre dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato.

Al observar el bajo nivel de actividad de GAPDH en CCE14 respecto a la cepa progenitora durante la fase exponencial (Figura 6 A), se construyó un plásmido para sobreexpresar el gen *gapA* de *E. coli* (Tabla 2). Lo anterior se hizo pensando en favorecer la generación del NADH necesario para balancear el NAD⁺ producido en la reacción catalizada por la enzima ADH_{zm}. La cepa CCE14 fue transformada con este plásmido (CCE14/ pTrc-gapdh) y se llevaron a cabo cultivos con 40 g/L de glucosa (datos no mostrados). No se observaron modificaciones en la velocidad específica de crecimiento, sin embargo, la velocidad de consumo de glucosa y el rendimiento de etanol disminuyeron en alrededor de 10% en relación a la cepa CCE14. Estos resultados sugieren que el plásmido y su inducción dieron como resultado una carga metabólica para la bacteria. Información publicada posteriormente reportó que más allá de incrementar el NADH disponible en la célula, el consumo de éste gracias a la expresión de una NADH oxidasa heteróloga, puede favorecer el incremento del flujo glucolítico (Vemuri *et al.*, 2005).

Durante la fase estacionaria, la comparación entre CCE14 y la cepa progenitora indicó que el nivel de la enzima lactato deshidrogenasa fue menor en la cepa etanológica. Está reportado que LDH se activa alostéricamente por piruvato (Tarmy *et al.*, 1968), de esta forma la acumulación de piruvato en *E. coli* C correlaciona con la producción de lactato (Figura 7 C-G). En contraste, KO11 y CCE14 no almacenaron piruvato y el lactato se produjo durante la fase estacionaria del cultivo (Figura 7 C-G). Específicamente, en CCE14 los bajos niveles de lactato correlacionan con la disminución de la actividad específica de la enzima LDH (Figura 6).

En fase estacionaria, las enzimas PTS, FDP, GAPDH, PGK y PYK presentaron niveles de actividad mayores en la cepa CCE14 respecto a *E. coli* C. Sin embargo, se observó un incremento en el nivel de actividad de PYK y GAPDH en CCE14 comparado con la cepa KO11 (datos no mostrados). Estas diferencias entre las cepas etanológicas fueron consistentes con el incremento del 80% en la (q_{EtOH}) en la cepa CCE14 respecto a KO11 en fase estacionaria (Tabla 9).

El incremento en el nivel de actividad de PYK y GAPDH en la cepa CCE14 respecto a KO11, indica una relación entre la sobreexpresión de la vía heteróloga que da como resultado una alta producción de etanol, con la generación de ATP e intercambio de poder reductor.

Está reportado que el flujo a través de GAPDH está regulado por la velocidad de recambio de NADH/NAD⁺ intracelular (De Graef *et al.*, 1999; Garrigues *et al.*, 1997). Así mismo, el NADH es un inhibidor competitivo de GAPDH (Zhu *et al.*, 2005). De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos en este estudio, es posible que en fase exponencial, la baja actividad de GAPDH en la cepa CCE14 esté relacionada con los altos niveles de NADH. En fase estacionaria, el incremento en el nivel de actividad de GAPDH podría estar relacionado al balance redox de la célula, ya que se observaron incrementos en los niveles de actividad de las enzimas ADH_{Zm} (que permite el recambio NADH+H⁺-NAD) y PDC_{Zm}.

Los resultados sugieren que la elevada velocidad de producción de etanol está directamente relacionada a los altos niveles de actividad de PDC_{Zm} y ADH_{Zm}, lo que a su vez origina altas velocidades de transporte de glucosa, síntesis de ATP y recambio de poder reductor. Estos resultados también demuestran que las actividades enzimáticas, tanto de *E. coli* W como de *E. coli* C bajo condiciones de fermentación, son suficientes para contender con los incrementos en las velocidades de consumo de glucosa y formación de productos.

Efecto de la actividad enzimática de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} sobre el perfil de fermentación y flujos de carbono.

El perfil de fermentación se presenta en la Figura 7. La Figura 7 A-B muestra los resultados obtenidos para la formación de células y el consumo de glucosa. Como se describe en la Tabla 7, durante la fase exponencial las velocidades de consumo de glucosa de las dos cepas etanologénicas fueron mayores comparadas con la cepa

silvestre, en un 28% y 34% para KO11 y CCE14, respectivamente. Esto indica que el flujo glucolítico se incrementó como resultado de la expresión de *pdz_{Zm}* y *adh_{Zm}*. Estos resultados correlacionan con reportes de la cepa KO11 en presencia de xilosa (Tao *et al.*, 2001) y glucosa en medio LB, donde la velocidad de consumo de glucosa fue 50% mayor para KO11 respecto a la cepa *E. coli* B (Gonzalez *et al.*, 2002).

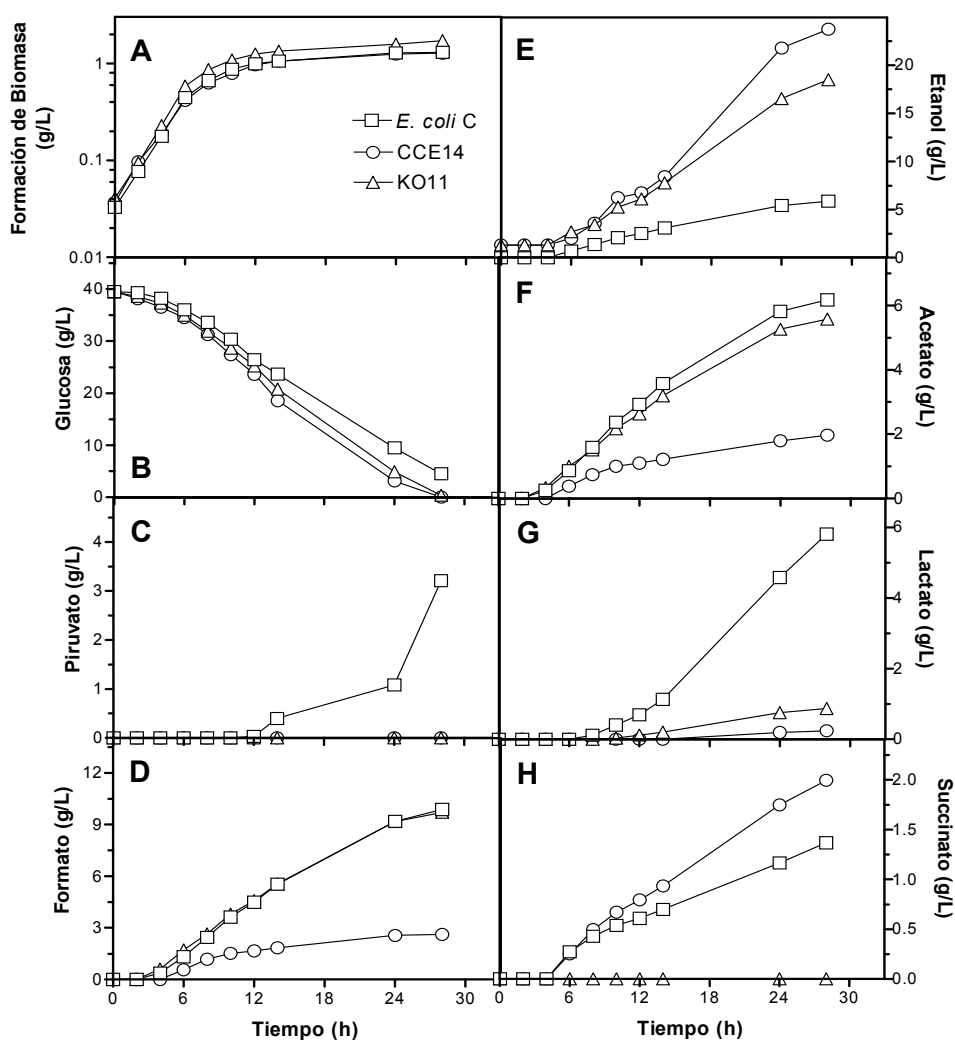


Figura 7. Caracterización de la cepa *E. coli* C y las cepas etanológicas CCE14 y KO11, en medio mineral M9 con 40 g/L de glucosa.

Formación de biomasa (A), glucosa (B), piruvato (C), formato (D), etanol (E), acetato (F), lactato (G) y succinato (H).

Aunque la μ fue similar en las tres cepas, el crecimiento celular máximo al inicio de la fase estacionaria fue similar sólo para las cepas KO11 y *E. coli* C, y menor para la cepa CCE14 (Tabla 7). Estos resultados, y los datos presentados en la Figura 7 indican que CCE14 dirige un mayor flujo de carbono hacia la producción de etanol que a la síntesis de biomasa.

La Figura 7 C muestra que no hay producción de piruvato en las cepas etanológicas, sin embargo la cepa progenitora produce una cantidad considerable (alrededor de 3 g/L) durante la fase estacionaria (Figura 7 C). La producción de formato al término de la fermentación en la cepa KO11 y en *E. coli* C fue similar (alrededor de 9 g/L) (Figura 7 D), mientras que en CCE14 fue menor a 2 g/L. Estos resultados, aunados al hecho de que PDC_{Zm} posee una K_M menor por piruvato (0.4 mM) respecto a las otras enzimas que compiten por éste mismo metabolito en condiciones de fermentación (Brau y Sahn, 1986; Neale *et al.*, 1987), indican que existe un fenómeno de competencia en el nodo de piruvato. De este modo, los altos niveles de actividad tanto de PDC_{Zm} como de ADH_{Zm} permiten dirigir el carbono de forma más eficiente a través de la vía heteróloga para la producción de etanol, en comparación con las vías para producir ácidos orgánicos.

Aunque el flujo glucolítico en las cepas CCE14 y KO11 fue similar durante la fase exponencial (las primeras 6 horas del cultivo), la q_{EtOH} fue 27% mayor en la cepa CCE14 (Tabla 7). Es claro que el incremento en la producción de etanol en la cepa CCE14 fue a expensas de la producción de ácidos orgánicos (Tablas 8 y 9; Figura 7), ya que no hubo formación de piruvato o lactato. Dentro del mismo contexto, las producciones de acetato y formato fueron significativamente menores comparadas a las de las cepas KO11 y *E. coli* C, mientras que para ésta última el formato y el acetato fueron los productos mayoritarios (Figura 7 E-D-F).

Estos resultados indican que el flujo glucolítico puede ser controlado por la mayor conversión del piruvato en etanol, a través de la actividad enzimática de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} en *E. coli* etanológica. También es posible sugerir que otras vías

fermentativas que permitan la regeneración del NAD^+ , como se lleva a cabo en la reacción catalizada por ADH_{Zm} , pueden tener el mismo efecto.

Durante la fase estacionaria, la cepa CCE14 produce etanol 80% más rápido que la cepa KO11 (Tabla 9). En relación con lo anterior, las actividades enzimáticas específicas de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} fueron 6 y 4.7 veces mayores respectivamente para CCE14 (Figura 5). Como fue mencionado, el rendimiento de etanol respecto al teórico máximo al término de la fermentación fue de 15, 90 y 70% en *E. coli* C, CCE14 y KO11, respectivamente.

Regulación Metabólica a nivel transcripcional.

Se analizaron los niveles de transcrito de 50 genes involucrados en el metabolismo central de carbono en la cepa CCE14. El análisis fue llevado a cabo durante la fase exponencial y los valores fueron normalizados respecto a la cepa progenitora *E. coli* C. Debido a que la cepa progenitora no tiene la vía heteróloga para la producción de etanol, los niveles de transcrito de los genes pdc_{Zm} y adh_{Zm} fueron normalizados con respecto a la cepa KO11 y se analizaron tanto en fase exponencial como estacionaria. La prueba *t*-student con un valor de $\alpha \leq 0.05$ fue aplicada en los valores normalizados, para determinar diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes analizados. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Transcrito de pdc_{Zm} y adh_{Zm} .

Se encontró relación entre los incrementos en los niveles de transcrito de pdc_{Zm} y adh_{Zm} , 4.51 y 9.06 veces respectivamente (Figura 8), y los valores de actividad enzimática, 5.07 y 3.77 veces respectivamente (Figura 5), para la cepa CCE14 en comparación con KO11. Se ha reportado que el RNAm de pdc_{Zm} y adh_{Zm} es más

estable que otros transcritos en *Z. mobilis*, lo que favorece la producción de altos niveles de estas enzimas etanológicas (Mejia *et al.*, 1992).

En fase estacionaria también se encontró una correlación para los transcritos (3.66 y 4.78 respectivamente para *pd_c_{zm}* y *adh_{zm}*) y los niveles de actividad enzimática (5.96 y 4.40 respectivamente) para la cepa CCE14 en relación a KO11. A pesar de que los valores absolutos de la actividad enzimática de PDC_{zm} y ADH_{zm} bajan alrededor de un 50% durante la fase estacionaria (Figura 5), el incremento en la velocidad específica de producción de etanol (Tablas 8 y 9) correlaciona con los altos niveles de transcrito y los elevados niveles de actividad enzimática en la cepa CCE14 en relación a KO11. Lo anterior coincide con reportes en la literatura en donde se ha observado que tanto en fase exponencial como en estacionaria, estas enzimas permanecen en altas concentraciones (An *et al.*, 1991). Esta característica es muy importante, ya que se ha reportado que grandes cantidades tanto de PDC como de ADH son necesarias para la producción de etanol (Ingram y Conway, 1988).

Los resultados de la Figuras 5 y 6 claramente muestran que los incrementos en los niveles de actividad de las enzimas participantes en la vía heteróloga para la producción de etanol dirigen el flujo de carbono en la cepa CCE14. Estos resultados también confirman que son esenciales altos niveles de ambas enzimas para incrementar la velocidad de producción de etanol. Las células ajustan su metabolismo a lo largo de la vía glucolítica para abastecer el flujo de carbono necesario y la concentración de piruvato es sustancialmente reducida por los altos niveles de expresión de los genes heterólogos *pd_c_{zm}* y *adh_{zm}*. Los incrementos entre los niveles de transcritos y de actividad enzimática demuestran la eficiente traducción de PDC_{zm} y ADH_{zm} cuando son sobreexpresadas.

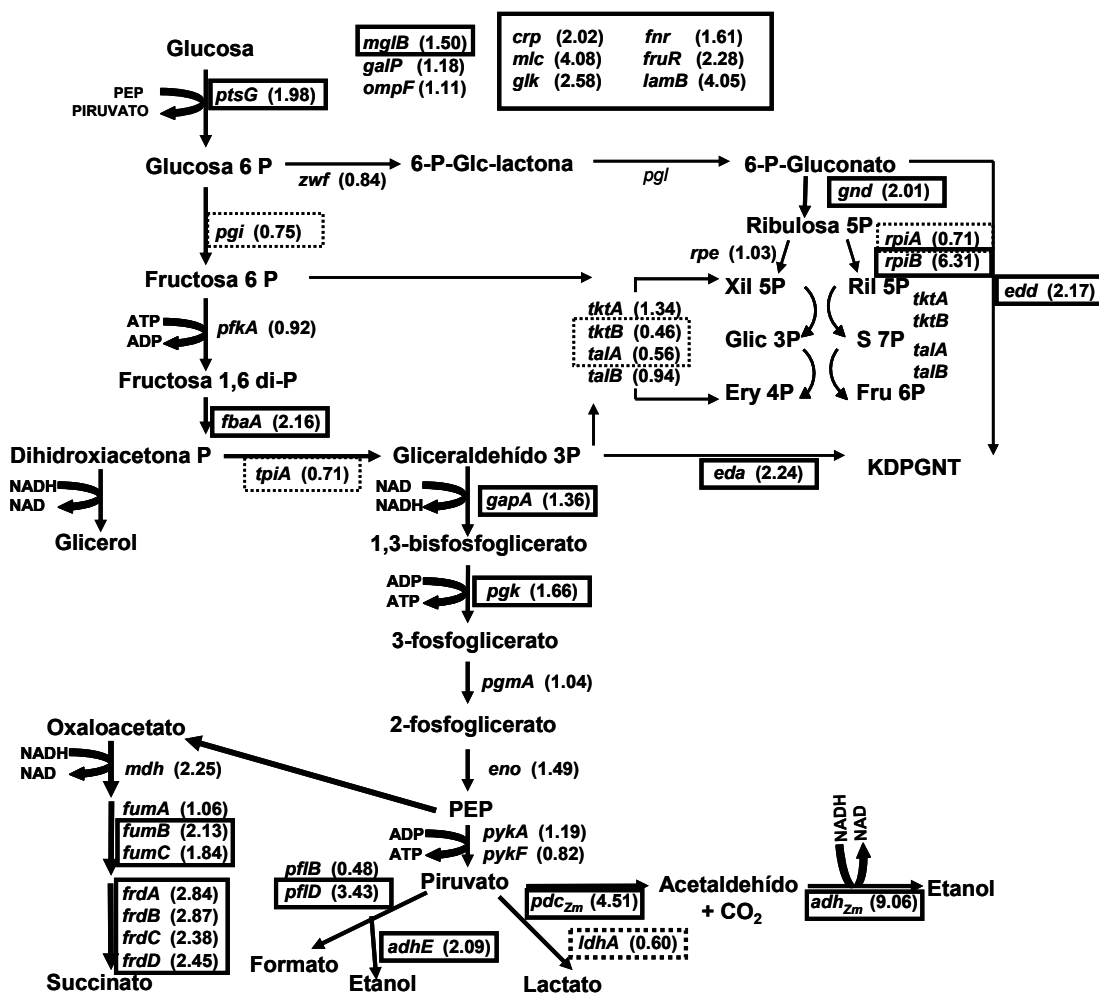


Figura 8. Valores de RT-PCR de la cepa CCE14, normalizados con respecto a la cepa parental *E. coli* C durante la fase exponencial.

Los niveles de transcrito de los genes sobreexpresados están encerrados en línea continua. Los niveles de transcrito de los genes expresados a un valor bajo están encerrados en línea punteada. Los genes que no están enmarcados no tuvieron cambio significativo.

Transporte de Glucosa y Fosforilación.

Como se mencionó anteriormente, la q_{Glc} (Tabla 7) y el nivel de actividad enzimática de PTS, responsable del transporte de glucosa (Figura 6), fueron 30 y 50% mayores respectivamente en la cepa CCE14 en relación a la cepa *E. coli* C en fase

exponencial. Con los datos anteriores de velocidad y actividad enzimática se demostró que no había limitación por transporte en la cepa CCE14. Para corroborar estos datos, se midieron los niveles de transcrito de *ptsG*, así como otros genes relacionados a la regulación del metabolismo de glucosa (Figura 8). Los resultados indicaron que el gen *ptsG*, el represor transcripcional *mIc* (Nam *et al.*, 2001), el transportador de glucosa de alta afinidad *lamB* (Flores *et al.*, 2005), la glucosa cinasa *glk*, así como *mglB* y *crp*, presentaron niveles más altos de transcrito en la cepa CCE14 en relación a *E. coli* C (Figura 8). Está reportado que cuando *E. coli* silvestre crece en concentraciones micromolares de glucosa, sintetiza galactosa y maltodextrinas (Flores *et al.*, 2005). Estos carbohidratos sirven como autoinductores que desreprimen la síntesis de los sistemas de transporte de alta afinidad por glucosa, como *mglB* y *lamB*, responsables del transporte de glucosa en estas condiciones (Flores *et al.*, 2005). En el mismo contexto, se ha demostrado que en cultivos de *E. coli* silvestre llevados a cabo en quimiostato, genes como *mglB* y *lamB* están sobreexpresados en respuesta a condiciones de glucosa no limitantes a glucosa limitantes (Hua *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha reportado que el transcrito de *crp* es alto cuando la célula detecta limitación de glucosa (Postma *et al.*, 1996). Los cultivos realizados en este proyecto se llevaron a cabo en una concentración relativamente alta de glucosa (40 g/L). Sin embargo, los resultados de los niveles de transcrito obtenidos, aunados a los datos de la literatura sugieren que la cepa CCE14 detecta una limitación parcial de glucosa. Este comportamiento es quizá debido al incremento en las velocidades tanto glucolítica como fermentativa, de ahí la posibilidad de que se induzca una respuesta, que permita a la célula introducir más glucosa a través de la sobreexpresión de los genes de transporte regulados por CRP, así como la inducción de transportadores alternos de glucosa. Debido a los altos niveles en que se transcriben estos genes, es posible sugerir que otros sistemas podrían estar involucrados en la fosforilación de glucosa en la cepa CCE14. De forma interesante, en esta cepa el nivel de transcrito de *glk* (gen que codifica para la glucosa cinasa GLK, proteína que fosforila glucosa) fue significativamente alto, probablemente como consecuencia de la sobreexpresión de genes heterólogos, como fue propuesto por Arora y Pederson (1995).

Glucólisis.

En general, sólo se detectaron pequeños cambios en los niveles de transcrito de los genes relacionados a la glucólisis. Por ejemplo, en la cepa CCE14 los niveles de transcrito de *fbaA*, *gapA* y *pgk* fueron más altos que los de la cepa *E. coli* C (Figura 8). En *E. coli*, el gen *gapA* es transcrito por al menos 4 promotores, tres son reconocidos por la RNA polimerasa $E\sigma^{70}$ y uno de ellos por la RNA polimerasa $E\sigma^{32}$. Esta región regulada diferencialmente permite la producción de grandes niveles de transcrito en una amplia variedad de condiciones (Charpentier *et al.*, 1994). Por otro lado, en γ -proteobacterias como *E. coli* los genes *pgk* y *fba* son co-transcripcionalmente expresados utilizando dos promotores, aunque sólo uno de ellos es requerido para obtener una alta producción de las proteínas PGK y FBA en presencia de glucosa (Bardey *et al.*, 2005). Se ha propuesto que cuando la glucosa está presente en el medio de cultivo, los genes *ptsG*, *gapA* y *pgk* son coordinadamente activados por un mecanismo dependiente de la proteína EII^{Glc} , la cual a su vez, es codificada por el gen *ptsG* (Charpentier *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos con la cepa CCE14 correlacionan con los resultados antes descritos, dados los incrementos encontrados en los niveles de transcrito de los genes *fbaA*, *pgk* y *ptsG*.

Al comparar los datos de transcrito (Figura 8) con los de actividad enzimática (Figura 6), se observó que sólo el nivel de actividad enzimática de PGK fue mayor, e incluso la actividad de GAPDH fue menor en la cepa CCE14 comparada con la de *E. coli* C. Como se discutió anteriormente, es posible que a pesar del alto nivel de transcrito del gen *gapA*, la baja actividad enzimática de GAPDH en fase exponencial esté relacionada a un nivel elevado de NADH, que se une de forma competitiva a esta enzima e inhibe la reacción (Zhu *et al.*, 2005).

Debido a que algunos de los transcritos y actividades enzimáticas no mostraron la misma tendencia en la glucólisis, es posible que se lleven a cabo fenómenos de control postranscripcional o cortes de RNA, permitiendo la producción de RNAm's individuales con una estabilización selectiva (Mejia *et al.*, 1992). Estos procesos

permiten la adaptación de la expresión de genes a variaciones en las condiciones ambientales (Kimata *et al.*, 2001). También es posible suponer que los niveles tanto de transcrito como de las enzimas son suficientes para llevar a cabo su función catalítica.

Vía Pentosas Fosfato y Entner-Doudoroff.

El gen *zwf*, que codifica para la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, juega un papel importante en la distribución de carbono en el nodo de glucosa 6-fosfato. Esta enzima dirige el flujo de carbono hacia el brazo oxidativo de la vía de las pentosas fosfato (PPP), dependiendo de la disponibilidad de NADP⁺. En la cepa CCE14, el nivel de transcrito del gen *zwf* no cambió respecto al de la cepa *E. coli* C (Figura 8), sin embargo, el nivel de actividad enzimática de ZWF se incrementó 7 veces en CCE14 (Figura 6). De forma similar, el nivel de transcrito del gen *gnd*, el cual codifica para la enzima fosfogluconato deshidrogenasa, fue 2.01 veces mayor respecto a la cepa progenitora. Está reportado que la actividad específica de la enzima codificada por el gen *gnd* es independiente de la naturaleza de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento (Kornberg, 1973), por lo que no es de extrañarse que este gen se encuentre en un nivel más alto. De forma contrastante, el nivel de transcrito del gen *rpiB* que codifica para una de las isoenzimas de la ribosa-P isomerasa fue más alto 6.31 veces, mientras que el de la otra isoenzima, codificada por el gen *rpiA* fue menor 0.71 veces. Las enzimas transcetolasas, codificadas por los genes *tktA* y *tktB*, y las transaldolasas, codificadas por los genes *talA* y *talB* interconectan la glucólisis con el brazo oxidativo de la vía de las pentosas. Los resultados obtenidos muestran que en la cepa CCE14 los niveles de transcrito de *tktB* y *talA* fueron menores 0.46 y 0.56 veces respectivamente, mientras que los transcritos de *tktA* y *talB* no sufrieron cambios respecto a la cepa *E. coli* C. Estos resultados sugieren que la vía de las pentosas fosfato es “flexible” y muy probablemente las velocidades catalíticas involucradas en esta vía sean muy similares en las dos cepas evaluadas.

Inesperadamente, el nivel de transcrito de los genes *edd* y *eda*, que codifican para las enzimas 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato aldolasa, en la vía de Entner Doudoroff (ED) fueron más altos 2.17 y 2.24 veces respectivamente en la cepa CCE14 comparados con la cepa parental (Figura 8). Estos resultados sugieren que la vía ED es funcional en estas condiciones. Esta posible funcionalidad coincide con el bajo nivel tanto de transcrito como de actividad de la enzima TPI en esta misma fase del cultivo, lo cual tiene relación con que uno de los pasos en los que la vía de ED se incorpora a la vía glucolítica es a nivel del gliceraldehído-3-P. A pesar de estas coincidencias, está reportado que para cultivos aerobios con glucosa, el flujo de carbono por ED es escaso (Flores *et al.*, 2002; Conway 1992). Adicionalmente, el rendimiento de ATP a través de esta ruta es menor en comparación a la vía glucolítica (Sprenger, 1996). Considerando los datos anteriores, aunado al hecho de que en este estudio únicamente se midieron los niveles de transcrito, no es posible concluir que esta vía tenga un flujo de carbono considerable. Sin embargo sería interesante medir el nivel de actividad de EDD y EDA, así como la concentración de los metabolitos involucrados en la vía y compararlos con la cepa progenitora.

Vías Fermentativas.

Los niveles de expresión de los genes *ackA*, *adhE*, *fumB*, *fumC*, *frdABCD* y *pflD* fueron mayores en la cepa CCE14 en relación con la cepa parental. Está reportado que el transcrito de *fumB* es más abundante bajo condiciones anaerobias y que FNR es necesario como activador transcripcional (Tseng *et al.*, 2000; Patridge *et al.*, 2006; Patridge *et al.*, 2007). En relación a lo anterior, se observó que la transcripción de *fumB* y los reguladores anaerobios *fnr* y *fruR* fueron sobreexpresados en la cepa CCE14 (Figura 8). Estos resultados indican que las rutas para producir succinato, formato y etanol (por la vía nativa) son funcionales. Sin embargo, los valores de actividad enzimática de PFL y LDH, así como los niveles de transcripción de los genes *pflB* y *ldh* fueron menores en fase exponencial, aunque está reportado que FNR regula la

expresión de *pflB* (Shalel-Levanon et al., 2005). Es importante mencionar que la cepa CCE14 produce formato y lactato en bajas concentraciones respecto a la cepa progenitora y KO11 (Figura 7 D-G).

Los resultados tanto de niveles de transcrito como de actividades enzimáticas de las vías de producción de lactato y formato, parecen estar relacionados a un fenómeno de competencia por piruvato entre las enzimas PFL, LDH y PDC_{Zm}. Está reportado que la K_M de PDC_{Zm} por piruvato es un orden de magnitud menor (0.4 mM) y por tanto más afín por éste que la K_M de PFL (2.0 mM) y la de LDH (7.0 mM) por este mismo metabolito (Ingram y Conway, 1988). Adicionalmente, la K_M de ADH_{Zm} por el acetaldehído es un orden de magnitud menor a la de PDC_{Zm} (0.012 mM) por piruvato. Esta ventaja en la afinidad, aunada a las altas concentraciones tanto de PDC_{Zm} como de ADH_{Zm} en el citoplasma, dieron como resultado un sistema muy eficiente de producción de etanol en CCE14. Sería interesante evaluar si una concentración mayor de las enzimas heterólogas podrían favorecer aún más el flujo de carbono hacia etanol. Esto podría llevarse a cabo insertando en cromosoma una copia extra de *pdz*_{Zm} y *adh*_{Zm} bajo un promotor fuerte y constitutivo.

Cultivos con 100 g/L de glucosa.

Con la finalidad de evaluar a la cepa CCE14 en condiciones similares a las que se emplearían a nivel industrial, esto es, con altas concentraciones de azúcares, se realizaron cultivos de las tres cepas bajo las condiciones ya mencionadas en medio mineral M9 con 100 g/L de glucosa.

Como se observa en la tabla 10, la μ fue relativamente similar para las tres cepas. Sin embargo, en fase exponencial ambas cepas etanologénicas tienen una q_{glc} mayor a la de la cepa *E. coli* C. Este fenómeno, aunque no en las mismas proporciones,

ya se había observado en los cultivos de 40 g/L de glucosa (Tabla 7). En fase estacionaria, CCE14 tiene una q_{glc} 80% mayor a la de KO11 y 300% mayor a la de la cepa progenitora. El crecimiento celular máximo obtenido al inicio de la fase estacionaria fue menor en la cepa CCE14 (Tabla 10), lo que coincide con lo observado en cultivos con 40 g/L (Tabla 7) y que indican que la cepa CCE14 dirige un mayor flujo de carbono hacia la producción de etanol que a la síntesis de biomasa.

Tabla 10. Crecimiento no aireado en medio M9 con 100 g/L de glucosa.

Cepa	μ h^{-1}	$q_{\text{Glc exp}}$ $\text{g glc/g}_{\text{DCW}}\text{h}$	$q_{\text{Glc est}}$ $\text{g glc/g}_{\text{DCW}}\text{h}$	Densidad celular máxima
<i>E. coli</i> C	0.27 \pm 0.03	3.74 \pm 0.03	0.49 \pm 0.07	1.45 \pm 0.02
CCE14	0.22 \pm 0.02	4.37 \pm 0.05	1.85 \pm 0.03	1.16 \pm 0.05
KO11	0.25 \pm 0.04	4.46 \pm 0.04	1.03 \pm 0.01	1.52 \pm 0.02

μ = Velocidad específica de crecimiento (1/h).

q_{Glc} = Velocidad específica de consumo de glucosa (g glc/g_{DCW} h).

Densidad celular máxima obtenida al inicio de la fase estacionaria = (g_{DCW}/L).

\pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

Tabla 11. Velocidades específicas de formación de ácidos y etanol (q_p) en fase exponencial.

Cepas	succinato	lactato	formato	acetato	etanol
<i>E. coli</i> C	0.54 \pm 0.01	ND	0.90 \pm 0.05	0.57 \pm 0.02	0.46 \pm 0.03
CCE14	0.23 \pm 0.04	ND	0.42 \pm 0.06	0.31 \pm 0.05	0.93 \pm 0.01
KO11	ND	ND	1.93 \pm 0.01	1.11 \pm 0.01	0.75 \pm 0.01

q_p = Velocidad específica de producción (g producto/g_{DCW} h).

\pm Desviación estándar de tres experimentos independientes.

ND No detectado.

En relación a las q_s de ácidos orgánicos, es claro que en fase exponencial CCE14 produce formato y acetato a menor velocidad, comparado con las otras dos cepas evaluadas, y succinato a menor velocidad, comparado con la cepa progenitora. Como se mencionó anteriormente, la cepa KO11 tiene interrumpido *frdABCD* (Ohta *et al.*, 1991), por lo que no se observó producción de succinato. En el caso de la q_{EtOH} , la cepa CCE14 lo produce más rápido en 20 y 50% comparado con KO11 y *E. coli* C, respectivamente (Tabla 11). Este fenómeno coincide con lo observado en cultivos con 40 g/L (Tabla 8).

En fase estacionaria, la cepa CCE14 tiene bajas las $q_{lactato}$, $q_{formato}$ y $q_{acetato}$ comparadas con la cepa progenitora. Sin embargo, la $q_{succinato}$ es 30% mayor respecto a la cepa progenitora (Tabla 12).

Tabla 12. Velocidades específicas de formación de ácidos y etanol (q_p) en fase estacionaria.

Cepas	succinato	lactato	formato	acetato	etanol
<i>E. coli</i> C	0.04 ±0.01	0.14 ±0.01	0.02 ±0.06	0.01 ±0.07	0.03 ±0.06
CCE14	0.14 ±0.03	0.01 ±0.05	0.01 ±0.04	0.05 ±0.08	0.84 ±0.02
KO11	ND	0.09 ±0.01	0.08 ±0.03	0.13 ±0.01	0.40 ±0.05

q_p = Velocidad específica de producción (g producto/g_{DCW} h).

± Desviación estándar de tres experimentos independientes.

ND No detectado.

La velocidad de producción de etanol en la cepa CCE14 disminuyó alrededor de 20% en fase exponencial y 25% en fase estacionaria, respecto a las velocidades obtenidas en cultivos con 40 g/L de glucosa. El rendimiento (Y) de etanol al final del cultivo fue 20% mayor respecto a KO11 (Tabla 13). Sin embargo, el rendimiento en estas condiciones es menor al obtenido con 40 g/L de glucosa (Figuras 4 y 7 E), ya que la producción de etanol fue a expensas de la formación de succinato, formato y acetato.

Como se mencionó anteriormente, la K_M de la enzima PDC es menor y por lo tanto más afín por el piruvato que las otras enzimas que compiten por éste en condiciones anaerobias (Ingram y Conway, 1988). Sin embargo, debido a los resultados obtenidos, es posible inferir que existe un fenómeno que afecta a las enzimas de la vía heteróloga (PDC_{Zm} y ADH_{Zm}) y disminuyen su eficiencia en concentraciones altas de glucosa.

Al observar las tablas 11 y 12, queda claro que en CCE14 existe una tendencia hacia la producción de succinato en altas concentraciones de glucosa, fenómeno que no se observa en cultivos con concentraciones de 40 g/L (Tablas 8 y 9) (Figura 7). Es posible que a concentraciones elevadas de glucosa exista alguna limitación en el flujo de carbono por las piruvato cinasas (PYKA y PYKF), que permita una acumulación de fosfoenolpiruvato que posteriormente sea dirigido a la producción de succinato. Como ya se mencionó anteriormente, la cepa CCE14 fue transformada con el plásmido pPEC que sobreexpresa los genes *pfkA* y *pykF* de *E. coli* (Tabla 2). Con esta cepa (CCE14/pPEC) también se llevaron a cabo cultivos con 100 g/L de glucosa bajo las condiciones ya descritas (datos no mostrados). Al comparar los datos con CCE14, se observó que en fase exponencial la q_{acetato} y la q_{formato} se mantuvieron similares, sin embargo, la $q_{\text{succinato}}$ disminuyó un 40% respecto a la cepa CCE14 sin el plásmido, lo que podría indicar una posible limitación de PYK debido a las altas concentraciones de glucosa, que se ve superada al sobreexpresar esta enzima. Sin embargo, en fase estacionaria la $q_{\text{succinato}}$ fue similar y, puesto que esta fase del cultivo duró alrededor de 3.5 días, el rendimiento final de etanol fue similar tanto en CCE14 como en CCE14/pPEC.

Tabla 13. Rendimiento de etanol respecto al teórico máximo con 100 g/L de glucosa.

Cepas	Y Glucosa/etanol (%)
<i>E. coli</i> C	11.44
CCE14	76.78
KO11	61.00

Y= Rendimiento

En resumen, es necesario interrumpir los genes *frdABCD* para eliminar la producción de succinato, como se hizo en la cepa KO11 (Ohta, *et al.*, 1991). En paralelo, sería conveniente analizar de forma más detallada un posible fenómeno limitación de carbono por las piruvato cinasas, midiendo el nivel de actividad de PYK y la concentración de PEP intracelular, ya que el sólo hecho de interrumpir los genes *frdABCD* no garantiza que el carbono se canalice hacia piruvato y posteriormente a etanol. También sería necesario medir el nivel de actividad de PDC_{zm} y ADH_{zm} para confirmar si existe algún fenómeno de limitación de carbono por estas enzimas bajo concentraciones elevadas de glucosa.

6. CONCLUSIONES.

El linaje de *E. coli* C se seleccionó para la construcción de cepas etanológicas, debido a que en condiciones de fermentación presenta elevadas velocidades específicas de crecimiento, de consumo de glucosa y de formación de productos, lo que da como resultado un menor tiempo de cultivo.

El incremento en el flujo glucolítico y en la velocidad de producción de etanol en la cepa CCE14, son el resultado de la expresión cromosomal elevada de *pdc_{Zm}* y *adh_{Zm}* en el fondo genético de *E. coli* C, así como del alto nivel de actividad enzimática de PDC_{Zm} y ADH_{Zm}, responsables de la formación de etanol.

De acuerdo con el fondo genético y las características de la cepa empleada, así como con las condiciones en las que fue llevado a cabo este estudio, es posible concluir que el flujo glucolítico es controlado por reacciones fuera de esta vía, específicamente por las rutas fermentativas.

Además de los altos niveles tanto de transcrito como de actividad enzimática de PDC_{Zm} y ADH_{Zm} en la cepa CCE14, las diferencias también son el resultado de la alta velocidad de transporte de glucosa, de producción y de consumo de ATP, así como del intercambio de poder reductor NAD-NADH+H⁺. Estos ajustes dan como resultado la baja producción de ácidos orgánicos, así como el incremento en la velocidad de producción de etanol.

En los linajes de *E. coli* C y *E. coli* W, los niveles de transcrito y de actividad enzimática de la vía glucolítica son suficientes para contender con los incrementos en las velocidades de consumo de glucosa y formación de productos bajo condiciones de fermentación.

7. PERSPECTIVAS.

- Con el fin de incrementar el rendimiento de etanol, construir otras cepas etanológicas eliminando los pasos que compiten por la producción del mismo, como la formación de lactato, acetato, succinato y formato. Así mismo, integrar una copia extra de *pdc_{Zm}* y *adh_{Zm}* en el cromosoma de CCE14.
- Con el fin de aprovechar los residuos lignocelulósicos, caracterizar a la cepa CCE14 en condiciones de producción en medio mineral con xilosa y mezclas de glucosa-xilosa, así como con jarabes de hidrolizados de hemicelulosa y celulosa.
- Medir los niveles de transcrito de genes como *rpoS*, *cyaA*, *arcA* y *arcB* en la cepa CCE14, con la finalidad de elaborar un modelo regulatorio más detallado.
- Debido a las diferencias observadas entre los cultivos con 40 y 100 g/L de glucosa con la cepa CCE14, principalmente la acumulación de succinato, se sugiere, además de interrumpir la producción de succinato, incrementar los niveles intracelulares de actividad de PYK, PDC_{Zm} y ADH_{Zm}, con el propósito de canalizar el exceso de flujo de carbono hacia la formación de etanol por la vía heteróloga.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Al Zaid Siddiquee, K., Arauzo-Bravo, M.J., Shimizu, K. 2004. Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl Microbiol and Biotech.* 63 (4), 407-417.
- An, H., Scopes, R.K., Rodriguez, M., Keshav, K.F., Ingram, L.O. 1991. Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: Identification of Alcohol Dehydrogenase II as a Stress Protein. *J Bacteriol.* 173 (19), 5975-5982.
- 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 Biotechnol.* 16, 42-47.
- Aristidou, A., Penttilä, M. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion Biotechnol.* 11, 187-198.
- Arora, K.K., Pedersen, P.L. 1995. Glucokinase of *Escherichia coli*: Induction in response to the Stress of overexpressing foreign proteins. *Archives of Biochem and Biophysics.* 319 (2), 574-578.
- Bardey, V., Vallet, C., Robas, N., Charpentier, B., Thouvenot, B., Mougin, A., Hajnsdorf, E., Régnier, P., Springer, M., Bralant, C. 2005. Characterization of the molecular mechanisms involved in the differential production of erythrose-4-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase and class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 57, 1265-1287.
- Beall, D.S., Ohta, K., Ingram, L.O. 1991. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 38, 296-303.
- Becker, J., Boles, E. 2003. A Modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol.* 69 (7), 4144-4150.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254.

- Brau, B., Sahm, H.** 1986. Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. Arch Microbiol. 144, 296-301.
- Bothast, R.J., Nichols, N.N., Dien, B.S.** 1999. Fermentations with new recombinant organisms. Biotechnol Prog. 15, 867-875.
- Charpentier, B., Branlant, C.** 1994. The *Escherichia coli gapA* gene is transcribed by the vegetative RNA polymerase holoenzyme $E\sigma^{70}$ and the heat shock RNA polymerase $E\sigma^{32}$. J Bacteriol. 176, 830-839.
- Charpentier, B., Bardey, V., Robas, N., Branlant, C.** 1998. The EII^{Glc} protein is involved in glucose-mediated activation of *Escherichia coli gapA* and *gapB-pgk* transcription. J Bacteriol. 180, 6473-6483.
- Cornish-Bowden, A., Hofmeyr, J-H.S., Cardenas, M.L.** 1995. Strategies for manipulating metabolic fluxes in Biotechnology. Bioor Chem. 23, 439-449.
- Conway, T., Osman, Y.A., Donnan, E.M., Ingram, L.O.** 1987. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. J Bacteriol. 169, 949-954.
- Conway T.** 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiol Rev. 103, 1-28.
- Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., Picataggio, S.** 1996. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. Appl. Environ Microbiol. 62 (12), 4465-4470.
- De Graef, M.R., Alexeeva, S., Snoep, J.L., Mattos, M.J.T.** 1999. The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 181 (8), 2351-2357.
- Dien, B., Hespell, R.B., Wyckoff, H.A., Bothast R.** 1998. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. Enz Microbiol Technol. 23, 366-371.
- Dien, B. S. y Bothast, R. J.** 1999. Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *Escherichia coli* strain FBR3. J Ind Microbiol Biotechnol. 22, 575-581.

- Emmerling, M., Bailey, J.E., Sauer, U.** 1999. Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metabol Eng.* 1, 117-127.
- Emmerling, M., Bailey, J.E., Sauer, U.** 2000. Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 67, 623-627.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F.** 2002. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metabol Eng.* 4, 124-137.
- Flores, N., Flores, S., Escalante, A., de Anda, R., Leal, L., Malpica, R., Georgelis, D., Gosset., Bolívar, F.** 2005a. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Metabol Eng.* 7, 70-87.
- Flores, S., Flores, N., de Anda, R., González, A., Escalante, A., Sigala, J., Gosset., Bolívar, F.** 2005b. Nutrient-scavenging stress response in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphotransferase system, as explored by gene expression profile analysis. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 10, 51-63.
- Fraenkel, D.G.** 1992. Genetics and intermediary metabolism. *Annu Rev Genet.* 26, 159-177.
- Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A.A., Clark, I., Niño, I., Gosset, G., Martinez, A.** 2004. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63 (6), 734-741.
- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N.D., Coccain-Bousquet, M.** 1997. Control of the shift from Homolactic Acid to Mixed-Acid Fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant Role of the NADH/NAD⁺ Ratio. *J Bacteriol.* 179 (17), 5282-5287.
- Gonzalez, R., Tao, H., Shanmugam, K.T., Cork, S.W., Ingram LO.** 2002. Global gene expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xylose. *Biotechnol Prog.* 18, 6-20.

- Gottschalk G.** 1986. Bacterial Metabolism. 2nd edition. Springer, New York Berlin Heidelberg. 237.
- Greene, N.** 2004. Growing Energy. How biofuels can help end America's oil dependence. Natural Resources Defense Council.
- Hespell, R. B., Wyckoff, H., Dien, B. S., y Bothast, R. J.** 1996. Stabilization of pet operon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lacking lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase activities. Appl Environmen Microbiol. 62 (12), 4594-4597.
- Ho, NWY., Chen, Z., Brainard, AP.** 1998. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. Appl Environ.Microbiol. 64, 1852-1859.
- Hoppner, T.C., and H.W. Doelle.** 1983. Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 17, 152-157.
- Hua, Q., Yand, C., Oshima, T., Mori, H., Shimizu, K.** 2004. Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. Appl Environ Microbiol. 70, 2354-2366.
- Huerta-Beristain, G., Utrilla, J., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Gosset, G., Martinez, A.** 2008. Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. J Mol Microbiol Biotechnol. 15, 55-64.
- Ingram, LO. and Conway, T.** 1988. Expression of the different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 54 (2), 397-404.
- Ingram, LO., Conway, T., Clark, DP., Sewell, GW., Preston JF.** 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 53 (10), 2420-2425.
- Ingram, LO., 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.

- Ingram, L. O., Aldrich, H. C., Borges, A. C. C., Causey, T. B., Martínez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S. A., Yomano, L. P., York, S. W., Zaldivar, J., Zhou, S. 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog.* 15, 855-866.
- Jarboe, LR., Grabar, TB., Yomano, LP., Shanmugan, KT., Ingram, LO. 2007. Development of ethanologenic bacteria. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 108, 237-261.
- Kabir, Md., Shimizu, K. 2003. Gene expression patterns for metabolic pathway in *pgi* knockout *Escherichia coli* with and without *phb* genes based on RT-PCR. *J Biotechnol.* 105, 11-31.
- Kim, Y., Ingram, L.O., Shanmugan, K.T. 2007. Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanologenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Appl Environ Microbiol.* 73, 1766.
- Kimata, K., Tanaka, Y., Inada, Y and Aiba, H. 2001. Expression of the glucose transporter gene, *ptsG*, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20 (13), 3587-35-95.
- Koebmann, BJ., Westerhoff, HV., Snoep, JL., Nilsson, D., Jensen, PR. 2002a. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol.* 184 (14), 3909-3916.
- Koebmann, BJ., Andersen, H., Solem, C., JL., Jensen, PR. 2002b. Experimental determination of control of glycolysis in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82, 237-248.
- Lindsay, S. E., Bothast, R. J., Ingram, L. O. 2003. Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. *App Microbiol and Biotechnol.* 43 (1), 70-75.
- Livak, K., Shmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods.* 25, 402-408.
- Maitra, P.K., Lobo, Z. 1971. Control of glycolitic anzyme syntesis in yeast by products of the hexokinase reaction. *J Biol Chem.* 246, 489-499.
- Maniatis, T., Fritsch, EF., Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Martin, BR.** 1987. The regulation of enzyme activity. In: Martin, BR. (Ed.), *Metabolic Regulation: A Molecular Approach*. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne, pp. 12-27.
- Martinez, J.L. and Baquero, F.** 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44 (7), 1771-1777.
- Martinez, A., York, SW., Yomano, LP., Pineda, VL., Davis, FC., Shelton, JC., Ingram, LO.** 1999. Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdg*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog*. 15, 891-897.
- Martinez, A., Rodriguez M.E. York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O.** 2000. Effects of Ca(OH)₂ treatments (Overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysate. *Biotechnol Bioeng*. 69, 526-536.
- Martinez, A., Rodriguez M.E., Wells M.L., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O.** 2001. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnol Progress*. 17, 287-293.
- Martínez, A., Bolívar F., Gosset, G.** 2002. Biotecnología energética sustentable: etanol carburante para el transporte. *Revista Universidad de México*. 617. páginas centrales.
- Mejia, JP., Burnett, ME., Haejung, AN., Barnell, WO., Keshav, KF., Conway, T., Ingram, L.O.** 1992. Coordination of expression of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: a simple hypothesis based on mRNA stability. *J Bacteriol*. 174 (20), 6438-6443.
- Müller, S., Zimmermann FK., Boles, E.** 1997. Mutant studies of phosphofructo-2-kinase do not reveal an essential role of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of carbon fluxes in yeast cells. *Microbiology*. 143, 3055-3061.
- Nam, TW., Cho, SH, Shin, D, Kim JH, Jeong JY, Lee JH, Roe JH, Peterkofsky A, Kang SO, Ryu S, Seok YJ.** 2001. The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB^{Glc} recruits the global repressor Mlc. *EMBO J*. 20 (3), 491-498.
- Neale, A D., Scopes, RK., Wettenhall, REH., Hoogenraad, NJ.** 1987. Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*. Isolation, properties and genetic expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 169, 1024-1028.

- Nichols, N. N., Dien, B. S., Bothast, R. J. 2001. Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56, 120-125.
- Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.L., Shanmugan, K.T., Ingram, L.O. 1991a. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl Environ Microbiol.* 57, 893-900.
- Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.L., Shanmugan, K.T., Ingram, L.O. 1991b. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* strain M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl Environ Microbiol.* 57, 2810-2815.
- Orencio-Trejo, M., Flores, N., Escalante, A., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A. 2008. Metabolic regulation analysis of an ethanologenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities. *Biotechnol Biofuels.* 1, 8.
- Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G. 2007. Glycolysis and the regulation of glucose transport in *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in batch and fed-batch culture. *Microbial Cell Factories.* 6, 16.
- Partridge, J., Scott, C., Tang, Y., Poole, R., Green, J. 2006. *Escherichia coli* transcriptome dynamics during the transition from anaerobic to aerobic conditions. *J Biol Chem.* 281 (38), 27806-27815.
- Partridge, J., Sanguinetti, G., Dibden, D., Roberts, R., Poole, R., Green, J. 2007. Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components. *J Biol Chem.* 282 (15), 11230-11237.
- Peng, L., Shimizu, K. 2003. Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K-12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61, 163-178.
- Plaxton, W.C. 2004. Principles of Metabolic Control. In *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Edited by: Kenneth B. Storey. John Wiley & Sons, Inc. 1-23.

- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR.** 1996. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Edited by: Neidhardt FC Washington, DC: American Society for Microbiology. 1149-1174.
- Saier MH Jr.** 1996. Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. FEMS Microbiol Lett. 138, 97-103.
- Sawers, G and Bock, A.** 1988. Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol. 170, 5330-5336.
- Sawers, G. and Bock, A.** 1989. Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. J Bacteriol. 171, 2485-2498.
- Sawers, G., and Suppmann, B.** 1992. Anaerobic induction of pyruvate formate-lyase gene expression is mediated by the ArcA and FNR proteins. J Bacteriol. 174, 3474-3478.
- Schaaff, I, Heinisch, J., Zimmermann FK.** 1989. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. Yeast. 5, 285-290.
- Shalel-Levanon, S., San, K-Y., Bennet, G.N.** 2005. Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. Biotechnol Bioeng. 92 (2), 147-159.
- Smits H.P., Hauf, J., Muller, S., Hobley, T.J., Zimmermann, F.K., Hahn-Hagerdal, B., Nielsen, J., Olsson, L.** 2000. Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 16, 1325-1334.
- Sprenger GA.** 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol Lett. 145, 301-307.
- Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., Nielsen, J.** 1998. The Essence of Metabolic Engineering. In: Metabolic Engineering Principles and Methodologies. Academic Press, USA. pp. 1-79.
- Stephanopoulos, G.** 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. Metabol Eng. 1: 1-11.

- Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., Liden, G., 1997. Acetic acid friend of foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. Chem Eng Sci. 52, 2653-2959.
- Tao, H., Gonzalez, R., Martinez, A., Rodriguez, M., Ingram, LO., Preston, JF., Shanmugam, KT. 2001. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. J Bacteriol. 183 (10), 2979-2988.
- Tarmy, EM., Kaplan, NO. 1968. Kinetics of *Escherichia coli* B D-Lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. J. Biological Chemistry. 243 (10), 2587-2596.
- Tseng, C., Yu, C., Lin, H., Chang, C., Kuo, J. 2000. Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB and FumC) Activity. J Bacteriol. 183 (2), 461-467.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E. 2005. Increased recombinant protein production in *Escherichia coli* strains with overexpressed water-forming NADH oxidase and a deleted ArcA regulatory protein. Biotechnol and Bioeng. 94 (3), 538-542.
- Wick, L., Quadroni, M., Egli T. 2001. Short- and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and *vice versa*. Environ Microbiol. 3 (9), 588-599.
- Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., Picataggio, S. 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. Science. 267, 240-243.
- Zhu, J., Shimizu, K. 2005. Effect of a single-gene knockout on the metabolic regulation in *Escherichia coli* for D-lactate production under microaerobic condition. Metabol Eng. 7, 104-115.

9. APÉNDICES

Manuscritos

- A. **Montserrat Orencio-Trejo**, Noemí Flores, Adelfo Escalante, Georgina Hernández-Chávez, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez. Metabolic regulation analysis of an ethanologenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities. *Biotechnology for Biofuels*, 1, 8.
- B. **M. Orencio-Trejo**, S. Romero, A. Martínez. “Estado del arte para la obtención de etanol a partir de residuos agroindustriales”. Memorias del: III Simposio sobre Biofábricas: “La Biotecnología como Herramienta para el Desarrollo y el Bienestar”. Medellín, Colombia. 15-17 Agosto 2007. 11 Págs.
- C. Susana Romero García, **Montserrat Orencio Trejo**, Guillermo Gosset Lagarda, Alfredo Martínez- Jiménez. Ingeniería metabólica, residuos agroindustriales y etanol carburante. *Revista Ciencia y Desarrollo*. Vol.33, No. 210, Pp. 60-66. Agosto 2007.
- D. Susana Romero García, **Montserrat Orencio Trejo**, Alfredo Martínez Jiménez Guillermo Gosset Lagarda. Compuestos aromáticos e ingeniería metabólica en bacterias. Aceptado en la “*Revista Ciencia y Desarrollo*”. Octubre 2008.

Apéndice A. Metabolic regulation analysis of an ethanologenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities.

Research

Open Access

Metabolic regulation analysis of an ethanogenic *Escherichia coli* strain based on RT-PCR and enzymatic activities

Montserrat Orencio-Trejo, Noemí Flores, Adelfo Escalante, Georgina Hernández-Chávez, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset and Alfredo Martínez*

Address: Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Mor., México

Email: Montserrat Orencio-Trejo - mon@ibt.unam.mx; Noemí Flores - noemi@ibt.unam.mx; Adelfo Escalante - adelfo@ibt.unam.mx; Georgina Hernández-Chávez - ginah@ibt.unam.mx; Francisco Bolívar - bolivar@ibt.unam.mx; Guillermo Gosset - gosset@ibt.unam.mx; Alfredo Martínez* - alfredo@ibt.unam.mx

* Corresponding author

Published: 1 May 2008

Received: 12 February 2008

Accepted: 1 May 2008

Biotechnology for Biofuels 2008, **1**:8 doi:10.1186/1754-6834-1-8

This article is available from: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/1/1/8>

© 2008 Orencio-Trejo et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: A metabolic regulation study was performed, based upon measurements of enzymatic activities, fermentation performance, and RT-PCR analysis of pathways related to central carbon metabolism, in an ethanogenic *Escherichia coli* strain (CCEI4) derived from lineage C. In comparison with previous engineered strains, this *E. coli* derivative has a higher ethanol production rate in mineral medium, as a result of the elevated heterologous expression of the chromosomally integrated genes encoding PDC_{Zm} and ADH_{Zm} (pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*). It is suggested that this behavior might be due to lineage differences between *E. coli* W and C.

Results: This study demonstrated that the glycolytic flux is controlled, in this case, by reactions outside glycolysis, *i.e.*, the fermentative pathways. Changes in ethanol production rate in this ethanogenic strain result in low organic acid production rates, and high glycolytic and ethanogenic fluxes, that correlate with enhanced transcription and enzymatic activity levels of PDC_{Zm} and ADH_{Zm}. Furthermore, a higher ethanol yield (90% of the theoretical) in glucose-mineral media was obtained with CCEI4 in comparison with previous engineered *E. coli* strains, such as KOI1, that produces a 70% yield under the same conditions.

Conclusion: Results suggest that a higher ethanol formation rate, caused by a higher PDC_{Zm} and ADH_{Zm} activities induces a metabolic state that cells compensate through enhanced glucose transport, ATP synthesis, and NAD-NADH+H turnover rates. These results show that glycolytic enzymatic activities, present in *E. coli* W and C under fermentative conditions, are sufficient to contend with increases in glucose consumption and product formation rates.

Background

Fermentative metabolism constitutes a fundamental cellular capacity for industrial biocatalysis. Endogenous organic compounds used by cells as terminal electron acceptors under oxygen deprivation are converted into biochemical products that are waste products for the cell, such as ethanol, lactate, acetate, succinate, formate and hydrogen, but represent valuable molecules to society [1]. For example, renewable fuels from biomass, such as ethanol, constitute energy sources that preserve the environment since the carbon dioxide released from their combustion can be integrated into a photosynthetic cycle, which does not participate in a net carbon dioxide buildup into the atmosphere.

Metabolic engineering strategies have been used to modify microorganisms to convert all sugars arising from chemical-enzymatic hydrolysis of lignocellulose, such as xylose, arabinose, and glucose into ethanol. A wide variety of research approaches have been employed for this purpose; among the most effective attempts are the engineering of different Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli* [2-6], *Klebsiella oxytoca* [7-9] and *Zymomonas mobilis* [10,11] as well as yeast, such as *Saccharomyces cerevisiae* [12-16]. One of the most successful strategies to develop ethanologenic bacteria was developed by Ingram and co-workers [2,3,6-8,17]. In the case of *E. coli*, the W strain was engineered for ethanol production by integrating the pyruvate decarboxylase (*pdh*) and alcohol dehydrogenase (*adhII*) genes from *Z. mobilis*, under the control of the *pflB* promoter, to obtain strain KO11 [3,17]. Expression from this promoter is high under anaerobic conditions [18,19], and ethanologenic *E. coli* strains, such as KO11 and LY01 have shown to be efficient in the conversion of all sugars present in lignocellulosic hydrolysates into ethanol [20,21].

Expression profiling is a powerful tool for analyzing gene transcription at a genomic scale. It can be used to compare global relative changes in gene expression that occur in response to an environmental stimulus or to compare the effects of genetic modifications on gene expression. This type of analysis can provide important information about cell physiology and has the potential to identify connections between regulatory or metabolic pathways not previously known [22,23]. Since the physiological state and fermentation performance of a cell is dictated primarily at the protein level, transcription results should be complemented by determining specific enzyme activities to provide a better understanding of the observed phenomenon, considering that enzymatic and transcriptional regulation mechanisms are different [22].

Previous studies have shown that plasmid-encoded levels of *Z. mobilis* pyruvate decarboxylase (PDC_{Zm}) and alcohol

dehydrogenase II (ADH_{Zm}) in *E. coli* correlate with the titer and the formation rate of ethanol [24,21,25]. Furthermore, the introduction of this heterologous pathway has several effects on *E. coli* physiology under fermentative conditions, *i.e.*, increases its growth rate and glycolytic flux when cultivated in Luria Broth with xylose [26] or glucose [27]. Gene array studies have also shown that several genes from the pentose phosphate and glycolytic pathways have statistically significant higher expression levels when ethanologenic *E. coli* (strain KO11) ferments xylose [26,27].

The present study was conducted to understand the role that chromosomally integrated pdh_{Zm} and adh_{Zm} heterologous expression has on the physiology and metabolic performance of *E. coli* during glucose fermentation in mineral media. The regulation of metabolic pathways, related to central carbon metabolism and fermentation performance, was studied using mainly the measurements for both the enzymatic activities of the glycolytic and fermentative pathways, as well as transcript levels from genes coding for the enzymes involved in the glycolytic, pentose phosphate, and fermentative pathways. Glucose transporters and anaerobic regulators were also analyzed using transcriptome data. Evaluation was performed using wild type *E. coli* C as the reference strain, and a new ethanologenic strain derived from *E. coli* C, CCE14 (*E. coli* C: *pflB::pdh adhB cat*). Interestingly, strain CCE14 has ca. five-fold higher values of PDC_{Zm} and ADH_{Zm} enzymatic activities than strain KO11 (*E. coli* W: *pflB::pdh adhB cat, Δfrd*) [3,17]. The results show that not only the specific ethanol rate, but also the glucose consumption rate (glycolytic flux) are increased as pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase transcripts and enzymatic activities are increased. Moreover, glycolytic flux is controlled by reactions outside glycolysis.

Results and discussion

Effect of PDC_{Zm} and ADH_{Zm} activity levels on fermentation performance

In comparison with the KO11 strain, PDC_{Zm} and ADH_{Zm} enzymatic specific activities were on average, 5 and 4-fold larger, respectively, in CCE14 during both exponential and stationary phases (Fig. 1). Even though the heterologous pathway was integrated into the chromosome of strains KO11 and CCE14 using the same method (see materials and methods section), strong differences were encountered between PDC_{Zm} and ADH_{Zm} enzymatic activities, as well as in transcript levels (as shown below). This behavior might be due to lineage differences between KO11 and CCE14. It is noteworthy that strain KO11 was submitted to high chloramphenicol pressure selection to increase ethanol productivity [3], in spite of this additional strategy, PDC_{Zm} and ADH_{Zm} activities were higher

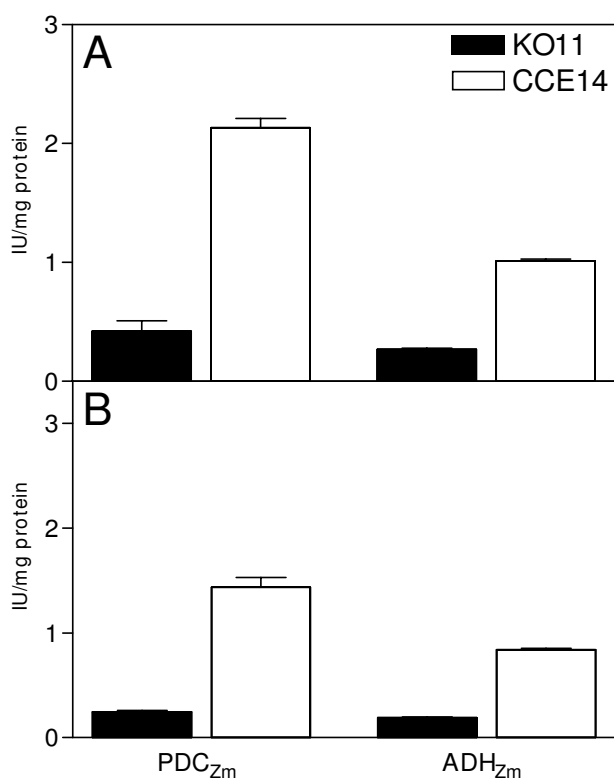


Figure 1
Specific enzyme activities values of PDC_{Zm} and ADH_{Zm} for strains KO11 and CCE14 during exponential (A) and stationary phases (B).

in CCE14, which was not further selected on high chloramphenicol.

Fermentation performance in mineral medium with 40 g/L glucose is presented in Fig. 2. Fig. 2A–B shows results obtained for cell mass formation and glucose consumption. Table 2 summarizes rates obtained during the exponential and stationary phases. The growth rates of *E. coli* C, CCE14, and KO11 were similar. During exponential growth, specific glucose consumption rates of the two ethanologenic strains (KO11 and CCE14) were 28 and 34% higher, respectively, than that obtained for *E. coli* C, indicating that the glycolytic flux increased as a result of *pdc_{Zm}* and *adh_{Zm}* expressions. This behavior correlates well with previously reported results for KO11 fermenting xylose [26] or glucose [27] in Luria Broth, where the maximum sugar consumption rate was 50% higher for KO11 than for strain W. In spite of the fact that the growth rate was similar for the three strains, the maximum cell mass obtained at the onset of the stationary phase (after 20 hours of fermentation) was similar for KO11 and *E. coli* C, and lower for CCE14 (Table 2). These results, and data

presented in Fig. 1, indicate that CCE14 directs more carbon to ethanol production than to biomass biosynthesis.

Fig 2C shows that no pyruvate was secreted by ethanologenic strains, but *E. coli* C produced a significant amount (> 3 g/L) of this metabolite during the stationary phase (Fig 2C). Furthermore, formate production by KO11 and *E. coli* C were similar, reaching up to 9 g/L when glucose was exhausted (Fig. 2D). However, formate production was lower than 2 g/L for CCE14. PDC_{Zm} was originally selected by Ohta et al [3], largely because it has a very high affinity for pyruvate (K_m for pyruvate 0.4 mM) [28,29] in comparison with all competing fermentation enzymes [24]. This fact and our results indicate that competition occurs at the pyruvate node level, and that higher levels of PDC_{Zm} and ADH_{Zm} apparently allow more efficient carbon channeling through the heterologous ethanol pathway.

Although glycolytic fluxes for CCE14 and KO11 were similar, the ethanol specific formation rate in the exponential phase (first 6 hours of fermentation elapsed time) was 21% higher for CCE14 as compared to KO11 (Table 3). During this phase, the ethanol formation rate in *E. coli* C was negligible (Fig. 2E), whereas formate (Fig. 2D) and acetate (Fig. 2F) were the main products. The increase in ethanol production rate was obtained at the expense of acid production (Table 3, Fig. 2). Pyruvate and lactate (Fig. 2C, 2G) were not produced during this phase in CCE14, whereas formate, acetate, (Fig. 2D, 2F), and succinate (Fig. 2H) production were significantly lower than for *E. coli* C and KO11. Balances for this phase indicate carbon recoveries very close to 100% for the three strains evaluated (Table 3). These results indicate that the glycolytic flux can be controlled by the efficient conversion of pyruvate into ethanol through the enzymatic activity levels of PDC_{Zm} and ADH_{Zm} in ethanologenic *E. coli*. It is hypothesized that other fermentative pathways that allow the efficient regeneration of NAD⁺ could have the same effect.

During the stationary phase, CCE14 produced ethanol 80% faster than KO11 (Table 4). Accordingly, specific enzyme activities of PDC_{Zm} and ADH_{Zm} were 6 and 4.7-fold higher for CCE14 (Fig. 1). Ethanol yields at 30 hours were 15, 70 and 90% of theoretical yield for *E. coli* C, KO11, and CCE14, respectively.

Metabolic regulation at transcript level

Transcript levels of 49 genes from the CCE14 strain were analyzed in the exponential growth phase and normalized for values obtained with *E. coli* C. Levels of *pdc_{Zm}* and *adh_{Zm}* were normalized with KO11 values and analyzed for both exponential and stationary phases. A Student's *t*-test with a *p* value of ≤ 0.05 was applied to each set of nor-

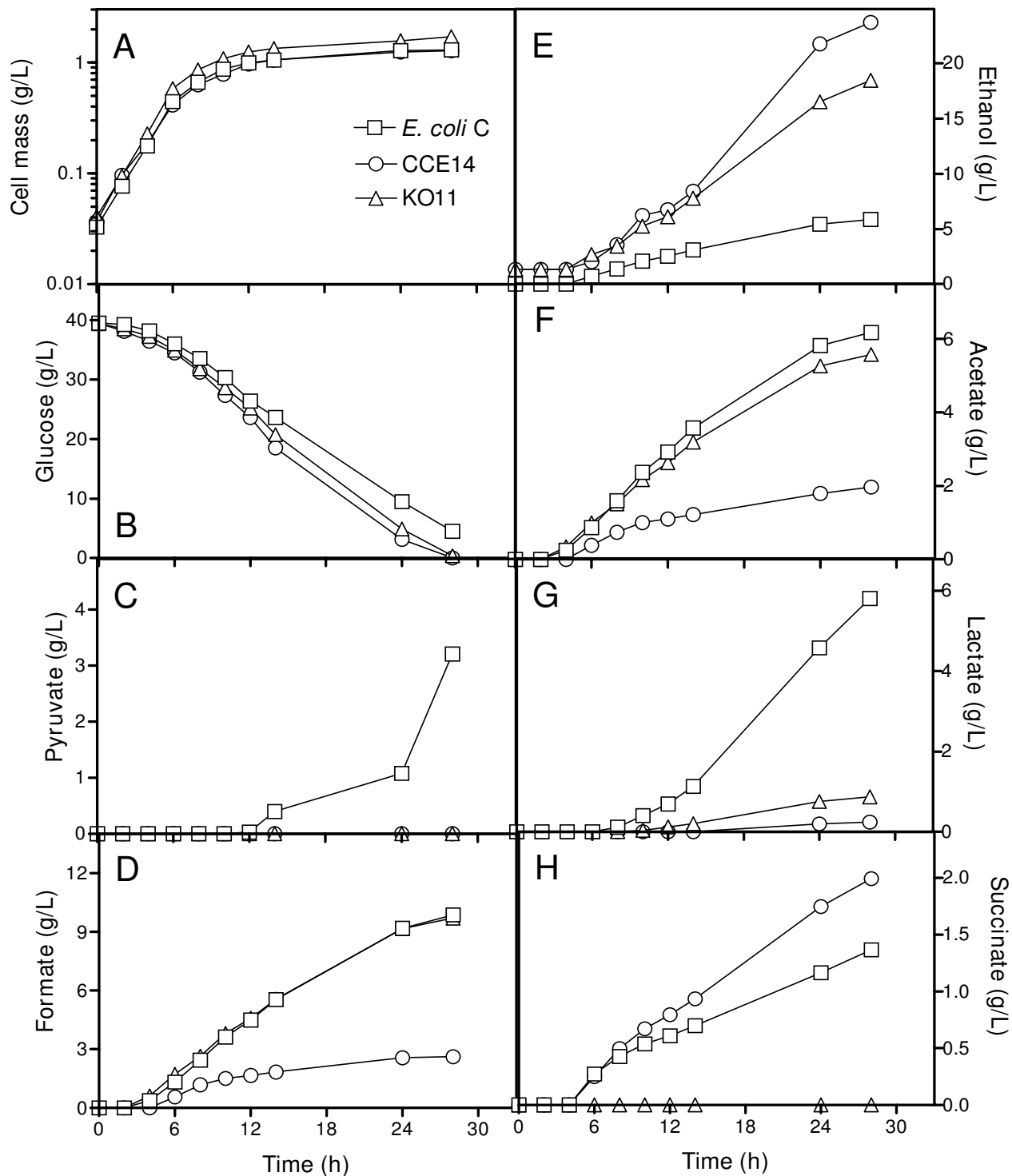


Figure 2
 Characterization of *E. coli* C and ethanologenic strains CCE14 and KO11 in M9 mineral media with 40 g/l glucose. Cell mass formation (A), Glucose (B), Pyruvate (C), Formate (D), Ethanol (E), Acetate (F), Lactate (G), and Succinate (H).

Table 2: Kinetic constants in anaerobic cultures

Strain	μ	q_{Glc} Exponential phase	q_{Glc} Stationary phase	Cell Mass
<i>E. coli</i> C	0.42 ± 0.01	2.73 ± 0.02	1.11 ± 0.11	1.28 ± 0.07
CCE14	0.38 ± 0.01	3.68 ± 0.12	1.20 ± 0.10	1.07 ± 0.04
KO11	0.45 ± 0.01	3.49 ± 0.09	0.97 ± 0.06	1.39 ± 0.09

μ = Specific growth rate (1/h).

q_{Glc} = Specific glucose consumption rate ($g_{Glc}/g_{DCW}h$).

Cell mass obtained at the onset of the stationary phase (g_{DCW}/L).

± Standard deviation of three independent experiments.

malized values in order to determine statistical significant differences in expression levels.

Interestingly, the comparison of CCE14 and KO11 gave a direct relationship between increases in both pdz_{zm} and adh_{zm} transcript values (4.51 and 9.06-fold, respectively) (Fig. 3) and specific enzyme activity levels (5.1 and 3.8-fold, respectively) (Fig. 1). It has been reported that pdz_{zm} and adh_{zm} mRNA are more stable than other transcripts in *Z. mobilis* [30]. A correlation was also found between CCE14 and KO11 during the stationary phase for transcripts (3.66-fold and 4.78-fold for pdz_{zm} and adh_{zm} , respectively) and specific enzyme activity levels (6-fold and 4.7-fold, respectively) (Fig. 1). Nevertheless, absolute values of the enzyme activity for these enzymes decreased around 50% during the stationary phase. The increase in specific ethanol formation rate (Table 4) correlated with higher transcript (Fig. 3) and specific enzyme activity (Fig. 1) levels for CCE14 in comparison to KO11. The requirements of higher PDC_{zm} enzymatic levels were demonstrated by Huerta-Beristain and co-workers [25]. These authors reported that when PDC_{zm} activity increased 7-fold, using a multicopy plasmid, the yield of ethanol from glucose increased from 70 to 85%, whereas organic acid formation rates were reduced in the KO11 strain. Accordingly, results in Fig. 1 clearly show that increases in the specific activities of the enzymes participating in the ethanologenic pathway boost the carbon flow to ethanol in strain CCE14. These results also suggest that high levels of both enzymes are essential to increase the ethanol production rate. Pyruvate pools in ethanologenic *E. coli* are substantially reduced by high-level expression of these *Z. mobilis* genes, but cells adjust their metabolism to various levels along the glycolytic pathway to fulfill the carbon

flux. Direct increments between transcripts and specific enzyme activities demonstrate the correct translation of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase when they are over expressed.

Glucose transport and phosphorylation

Genes coding for proteins related to transport and regulation of glucose such as *ptsG* (1.98-fold), transcriptional repressor coding *mlc* (4.08-fold) [31,32], high-affinity glucose transporters coding *lamB* (4.05-fold) and *mglB* (1.50-fold) [33], glucose kinase *glk* (2.58-fold), *fruR* (2.28-fold), and *crp* (2.02-fold) were more highly expressed in CCE14 than in *E. coli* C (Fig. 3). Specific glucose consumption rates (Table 2) and transport activities (Fig. 4) were on average 30 and 50% higher, respectively, for CCE14 in comparison with *E. coli* C. When glucose is phosphorylated in the course of transport, PTS proteins are dephosphorylated; unphosphorylated EIICB^{Glc} causes the formation of the Mlc-EIICB^{Glc} complex, derepressing the expression of target genes, such as *mlc* itself, as well as the *pts* operon [32]. Therefore, higher levels of *ptsG* and *mlc* correlate with increases in EIICB^{Glc} (*ptsG* product) and MLC protein. The observed transcriptional pattern is consistent with a response that results in higher synthesis capacity for more PTS proteins necessary for glucose uptake.

On the other hand, wild type *E. coli* strains, growing on micromolar concentrations of glucose, synthesize galactose and maltodextrins as autoinducers derepressing the synthesis of the high-affinity glucose transport systems (MGLB and the LAMB maltoporin), which are responsible for glucose transport under these conditions [33]. Analyses of gene expression response in wild type *E. coli* from

Table 3: Specific formation rates (q_p) for organic acids and ethanol during the exponential phase ($g_{PRODUCT}/g_{DCW}h$)

Strain	Acetate	Formate	Succinate	Ethanol	Carbon Recovery (%)
<i>E. coli</i> C	0.95 ± 0.08	1.21 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.58 ± 0.05	100.9 ± 0.41
CCE14	0.39 ± 0.04	0.67 ± 0.04	0.28 ± 0.04	2.08 ± 0.01	104.5 ± 0.22
KO11	0.79 ± 0.04	1.59 ± 0.06	ND	1.63 ± 0.01	98.7 ± 0.32

± Standard deviation of three independent experiments.

ND. Not Detected.

Table 4: Specific formation rates (q_p) for organic acids and ethanol during the stationary phase ($g_{\text{PRODUCT}}/g_{\text{DCW h}}$).

Strain	Acetate	Formate	Succinate	Lactate	Pyruvate	Ethanol
<i>E. coli</i> C	0.14 ± 0.07	0.26 ± 0.06	0.04 ± 0.01	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.12 ± 0.06
CCE14	0.04 ± 0.08	0.05 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.015	ND	0.68 ± 0.01
KO11	0.10 ± 0.01	0.19 ± 0.02	ND	0.03 ± 0.05	ND	0.37 ± 0.03

± Standard deviation of three independent experiments.
ND. Not Detected.

glucose non-limiting to glucose-limiting growth conditions, in chemostat cultures, have demonstrated that several genes including *mglB* and *lamB* are upregulated [34]. Furthermore, the *crp* transcript is higher when *E. coli* experience glucose limitation [35] and CRP regulates genes such as *mglB*, *lamB*, *glk*, and *ptsG* [36]. Our results show that even though cultures were growing in large amounts of glucose (40 g/L) throughout the exponential phase (Fig. 2), transcription results suggest that CCE14 was sensing partial glucose limitation. This response might be due to increases in the fermentation and glycolytic rates that in turn will induce a response to scavenge sugar through transport activation of alternative glucose transporters. Interestingly, *glk* transcript levels were significantly higher in CCE14. This result suggests that besides the PTS system, glucose could also be transported by MGLB and LAMB and phosphorylated by GLK. The higher *glk* transcript is also related to an elicited response due to the over expression of heterologous genes as demonstrated by Arora and Pederson [37].

As mentioned earlier, *fruR* (2.28-fold) was more highly expressed in CCE14. FRUR (or CRA) is a key regulator controlling the balance between glycolysis and gluconeogenesis [38-40]. Many gluconeogenic genes are activated by FRUR, while glycolytic genes such as *glk*, *pfkA*, *gapA*, *eno*, and *pykF* are repressed. [41,42]. However, none of the genes studied above was repressed. Probably FRUR was partially inactivated in the presence of glucose, because fructose-1-phosphate and fructose-1,6-bisphosphate bind to FRUR and inactivate its DNA-binding capacity [43,44].

Glycolytic pathway

In general, only slight changes were detected in the transcription level of genes related to glycolysis. For instance, *gapA* (1.36-fold), *fbaA* (2.16-fold), and *pgk* (1.66-fold) transcript levels were higher in CCE14 strain than in *E. coli* C (Fig. 3). In *E. coli*, the *gapA* gene is transcribed from at least four promoters, three recognized by the RNA polymerase $E\sigma^{70}$ and one by the heat shock RNA polymerase $E\sigma^{32}$. This complex region of differentially regulated promoters allows the production of large amounts of *gapA* transcripts in a wide variety of environmental conditions [45]. On the other hand, in γ -proteobacteria (*E. coli*, for example), the *pgk* and *fbaA* genes are cotranscriptionally

expressed using two transcriptional promoters, though only one is required to get a strong production of PGK and FBA proteins in the presence of glucose [46]. It has been proposed that when glucose is present in the growth medium, *pts*, *gapA*, and *pgk* genes are coordinately activated by a mechanism dependent upon the EII^{Glc} protein (coded by the *ptsG* gene) [47]. Our results correlate with these facts, given the increases found in *fbaA*, *pgk*, and *ptsG* transcript levels.

Surprisingly, only the PGK enzymatic activity was higher (1.54-fold) in CCE14, whereas GAPDH activity was lower (0.64-fold) in this strain. As mentioned previously, it is possible that in the exponential phase, in spite of a higher transcript level of *gapA*, the low GAPDH activity could be related to a redox balance between GAPDH and higher ADH_{Zm} and PDC_{Zm} transcripts and enzymatic activities.

Several glycolytic genes showed no significant changes in the transcription level, and some of the transcripts and enzymatic activities did not show the same tendency. This behavior could be related to posttranscriptional regulation and RNA segmentation, leading to the production of individual mRNAs with selective stabilization. These processes allow the adaptation of gene expression to variations in environmental conditions, as has been observed in glycolytic gene expressions in *B. subtilis* [48,49], *Z. mobilis* [50], and *L. delbrueckii* [51]. Another explanation could be that enzyme levels are sufficient to carry out their catalytic role.

On the other hand, only the *pgi* transcript from CCE14 was lower than in the wild type strain. Likewise, the PGI enzymatic activity was slightly lower than that of *E. coli* C. Despite the importance of PGI in glycolysis, little information is available about the regulation of the *pgi* gene. However, due to the results in terms of glucose consumption and ethanol formation rate, the lower transcript and enzymatic activity does not cause any reduction in the glycolytic flux.

Entner-Doudoroff and pentose pathways

The *zwf* gene, that codes for glucose 6-P dehydrogenase, plays an important role in the control of carbon distribution at the glucose 6-phosphate node. It directs carbon

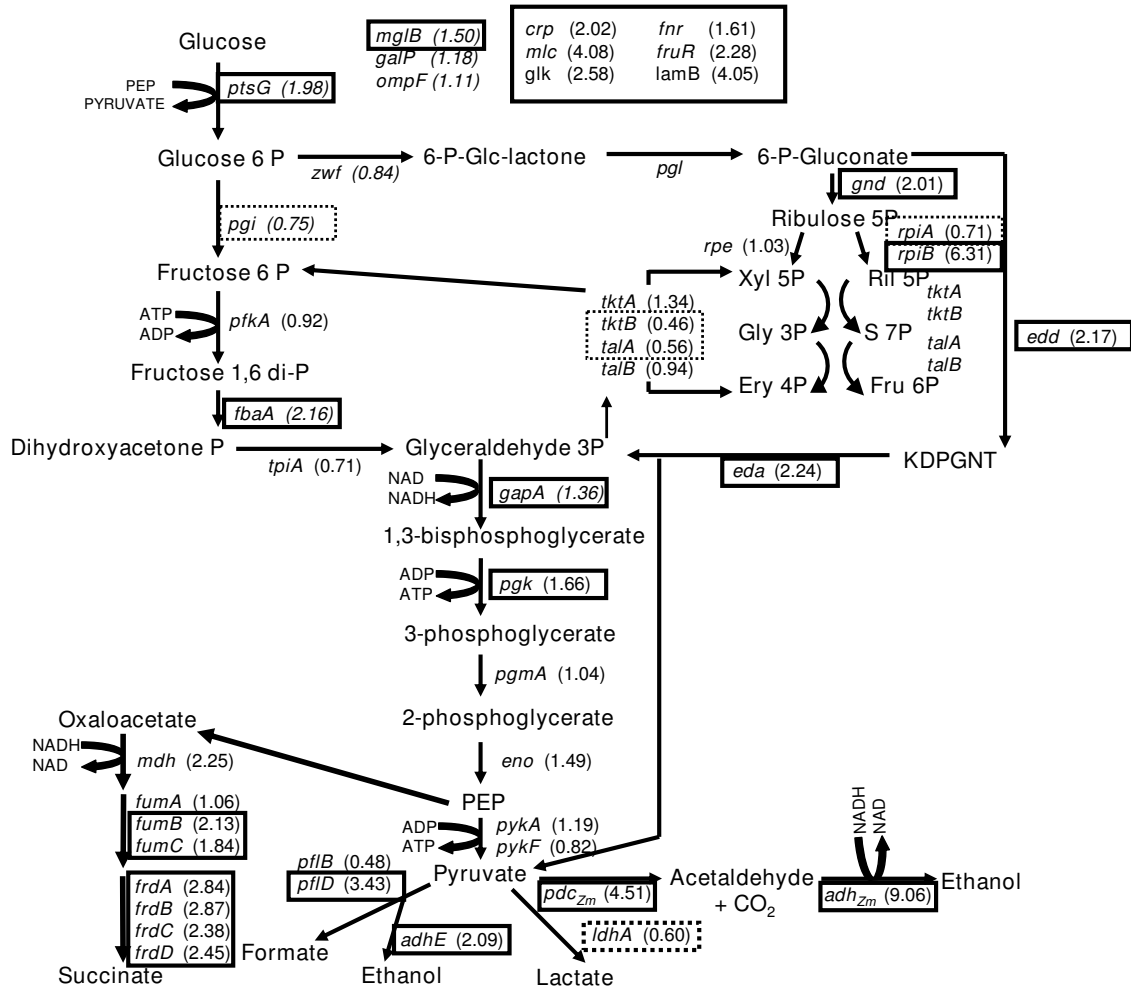


Figure 3

RT-PCR values for strain CCE14 normalized to *E. coli* C during the exponential phase. Higher values are represented in a continuous borderline and lower values are in dotted borderline. A t-student test with a *p* value of ≤ 0.05 was applied to each set of normalized values in order to determinate statistical differences in expression levels. Glucose transporter protein EIICB^{Glc} (*ptsG*), Glucokinase (*glk*), Phosphoglucose isomerase (*pgi*), Phosphofructokinase (*pfk*), Fructose bisphosphate aldolase (*fbaA*), Triose Phosphate isomerase (*tpi*), Glyceraldehyde-3P dehydrogenase (*gapA*), Phosphoglycerate kinase (*pgk*), Phosphoglycerate mutase (*pgmA*), Enolase (*eno*), Pyruvate kinase A (*pykA*), Pyruvate kinase B (*pykB*), Glucose-6P-1-dehydrogenase (*zwf*), 6-Phosphogluconate dehydrogenase (*gnd*), Ribulose phosphate epimerase (*rpe*), Ribose-5-phosphate isomerase A (*rpiA*), Ribose-5-phosphate isomerase B (*rpiB*), Transketolase A (*tktA*), Transketolase B (*tktB*), Transaldolase A (*talA*), Transaldolase B (*talB*), 2-keto-3-deoxy-phosphogluconate aldolase (*eda*), Phosphogluconate dehydratase (*edd*), Xylulose-5-phosphate (Xyl 5P), Ribulose-5-phosphate (Ril 5P), Glyceraldehyde-3-phosphate (Gly 3P), Sedoheptulose-7-phosphate (S 7P), Erytrose 4-phosphate (Ery 4P), Fructose 6-phosphate (Fru 6P), 2-keto-3-deoxy-gluconate-6-phosphate (KDPGNT), Fumarate reductase A (*frdA*), Fumarate reductase B (*frdB*), Fumarate reductase C (*frdC*), Fumarate reductase D (*frdD*), pyruvate formate lyase B (*pfkB*), pyruvate formate lyase D (*pfkD*), Malate dehydrogenase (*mdh*), Fumarase A (*fumA*), Fumarase B (*fumB*), Fumarase C (*fumC*), alcohol dehydrogenase (*adhE*), lactate dehydrogenase (*ldhA*), Transcriptional regulator CRP (*crp*), Transcriptional repressor MLC (*mlc*), Transcriptional repressor MLC (*mlc*), Transcriptional regulator FRUR (*fruR*), High affinity maltose receptor (*lamB*), Galactose ABC transporter (*mglB*), Galactose permease (*galP*), *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase (*adh_{Zm}*), *Zymomonas mobilis* pyruvate dehydrogenase (*pdC_{Zm}*).

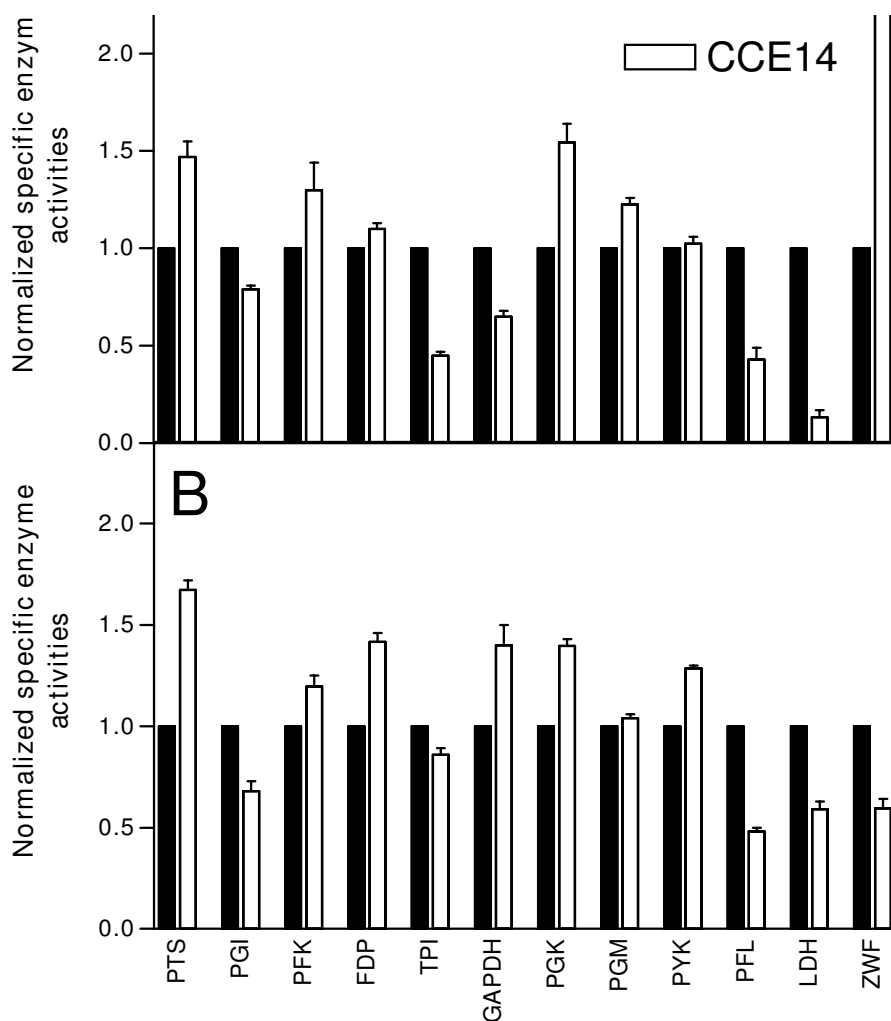


Figure 4

Specific enzyme activities for ethanologenic strain CCE14 normalized to parental strain *E. coli* C during exponential (A) and stationary phases (B) of culture. All measurements were performed in triplicate. The results presented are three independent experiments. A *t*-student test with a *p* value of ≤ 0.05 was applied to each set of normalized values in order to determine statistical differences enzyme activity levels. Glucose – PEP phosphotransferase (PTS), glucose-6-phosphate dehydrogenase (ZWF), glucose phosphate isomerase (PGI), 6-phosphofructokinase (PFK), fructose-1,6-bisphosphatase (FDP), fructose bisphosphate aldolase (FDP aldolase), triose phosphate isomerase (TPI), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 3-phosphoglycerate kinase (PGK), phosphoglycerate mutase (PGM), pyruvate kinase (PYK), pyruvate-formate lyase (PFL), lactate dehydrogenase (LDH), alcohol dehydrogenase (ADH_{Zm}) and pyruvate decarboxylase (PDC_{Zm}).

flux through the oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP) depending on $NADP^+$ availability. In the CCE14 strain, the transcript level of *zwf* was not different to that of *E. coli* C (Fig. 3); however, ZWF specific enzyme activity was 7-fold higher in CCE14 (Fig. 4). Similarly, transcription of the *gnd* gene, which codes for phosphogluconate dehydrogenase, and one of the isoenzymes that codes for ribose-P isomerase (*rpiB* gene) were higher, 2.01 and 6.31-fold, respectively; while transcript of *rpiA*

was lower, 0.71-fold. The isoenzymes transketolases (encoded by *tktA* and *tktB* genes) and transaldolase (encoded by *talA* and *talB* genes) interconnect glycolysis with the oxidative branch of PPP. Our results show that *tktB* and *talA* transcripts were lower, 0.46 and 0.56-fold, respectively, in CCE14; while *tktA* and *talB* were not different when compared to *E. coli* C. These results suggest that the pentose phosphate pathway is very flexible, and it is

likely that overall catalytic rates are similar in the two strains tested.

Unexpectedly, genes *edd* that codes for 6-phosphogluconate dehydratase and *eda* which codes for 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase in the Entner-Doudoroff pathway were more highly expressed, -2.17 and 2.24-fold, respectively, in CCE14 (Fig. 3). These results suggest that the Entner-Doudoroff pathway is functional, although it has been reported that for aerobic cultures with glucose the carbon flux through this route is not very high [52,53]. In addition, ATP yield is lower through this pathway versus the Embden-Meyerhof pathway [54].

Fermentative pathways

In the CCE14 strain, *adhE* (2.09-fold), *fumB* (2.13-fold), *fumC* (1.84-fold), *frdABCD* (2.84, 2.87, 2.38 2.45-fold), and *pflD* (3.43-fold) gene expressions were higher than in the wild type. It is known that *frdABCD* is induced under anaerobic conditions [55], though a recent study showed that this gene can be induced by glucose limitations [56].

It has been demonstrated that the *fumB* transcript is more abundant under anaerobic conditions, and that FNR is necessary as a transcriptional activator [57,58]. In agreement with these reports, the transcription of *fumB* and the anaerobic regulator *fnr* (1.61-fold) were also more highly expressed in the CCE14 strain (Fig. 3). These results indicate that the pathways to produce succinate, formate, and ethanol (for native pathway) are active, although specific enzyme activity values of PFL and LDH and transcript levels of *pflB* and *ldhA* decreased in the exponential phase. It is important to mention that CCE14 produces formate and succinate in low concentrations. These results could indicate a competition phenomenon for pyruvate between PFL and PDC_{Zm}. However, it is important to consider the disruption of routes to compete for the ethanol production in these conditions such as succinate and lactate pathways. We found that in cultures with high glucose concentrations (100 g/L), the production of succinate increases significantly in strain CCE14 (data not shown). This could be due to osmolarity problems or to a partial limitation of PYK enzyme causing PEP accumulation; hence, the carbon flux may be partially redirected towards succinate formation.

Metabolic regulation at the enzyme activity level

Enzyme activity levels for CCE14 strain were analyzed in exponential and stationary phases and normalized for values obtained with *E. coli* C (Fig. 4). Enzymatic levels for *pdC_{Zm}* and *adh_{Zm}* were normalized with KO11. A *t*-student test with a *p* value of ≤ 0.05 was applied to each set of normalized values to determine statistical differences in enzyme activity levels.

In the CCE14 strain, PTS and PGK enzymatic activities were higher, whereas TPI and PFL activities were lower during the exponential growth phase. These data correlate with the fact that ethanologenic strains consume glucose at a higher rate. In addition, increases in PGK activity suggest that the over expression of the genes coding for PDC_{Zm} and ADH_{Zm} modify the ATP/ADP balance. It is known that in aerobic conditions, a high ATP demand causes an increase in glycolytic flux in *E. coli* [59]. For *Lactococcus lactis*, the control of glycolytic flux resides to a large extent in processes outside the pathway, such as ATP consuming reactions and glucose transport [60]. As discussed above, the heterologous ethanologenic pathway increases glycolytic flux with the subsequent increases in ATP production and consumption. Therefore, it appears that cells tend to increase ATP formation through an increase in PGK synthesis; although no increase in PYK activity was found. ATP is also produced when acetate is formed; however, CCE14 does not produce acetate during the exponential phase. A decrease in PFL activity in CCE14 correlates with a strong reduction in formate production (Fig. 2D). On the other hand, the observed 50% reduction in the TPI specific enzyme activity does not reduce glycolytic flux. A large increase in ZWF specific activity was found, and was discussed above.

A comparison of enzymatic activity data between CCE14 and *E. coli* C during the stationary phase, indicates higher values of PTS, FDP, GAPDH, PGK, and PYK for the ethanologenic strain. The LDH enzymatic activity was lower in CCE14. It is known that lactate dehydrogenase is allosterically activated by pyruvate [61]. Lactate production was found only during the stationary phase of two cultures. Pyruvate formation in *E. coli* C correlates with lactate production (Fig. 2C–G), and lower levels of this metabolite in CCE14 correlate with a 40% lower LDH specific activity (Fig. 4). These results suggest that a higher ethanol formation rate, *i.e.*, higher PDC_{Zm} and ADH_{Zm} specific activities originate higher rates of glucose transport, ATP synthesis, and NAD-NADH+H turnover.

Conclusion

A higher glycolytic flux in CCE14 results from increased chromosomal expression of *pdC_{Zm}* and *adh_{Zm}* genes and higher specific enzyme activities of heterologous PDC_{Zm} and ADH_{Zm} enzymes involved in ethanol formation. These results indicate that under the conditions used in this study, the glycolytic flux is controlled by reactions outside this pathway, that is, by the fermentative heterologous route. The metabolic adjustments carried out in the cell entail low organic acid production and an increase in the ethanol formation rate, as well as higher ethanol yield (90% of the theoretical) in glucose-mineral media when compared with previous engineered efficient strains, such as KO11 (70% of the theoretical yield). In spite of the

higher PDC_{Zm} and ADH_{Zm} transcript and enzymatic activities in the CCE14 strain, the differences are mediated by higher glucose transport rates and an increase in the turnover rate of NAD-NADH+H⁺ and ATP.

Overall, these results also show that *E. coli* glycolytic enzymatic activities under fermentative conditions are sufficient to contend with increases in the rates of glucose consumption and higher transcript and enzymatic activities of the heterologous ethanol pathway. Also, the study provides the basis for the implementation of appropriate genetic modifications to increase the ethanol yield when mineral media is used; for instance, the disruption of succinate and lactate pathways that compete for ethanol production.

Methods

Bacterial strains, media and growth conditions

E. coli strains used in this work are listed in Table 1. With the purpose to have an ethanologenic strain with different PDC_{Zm} and ADH_{Zm} enzymatic levels, a new strain CCE14 was constructed integrating into the chromosome the pyruvate decarboxylase (*pdc*) and the alcohol dehydrogenase (*adh*) genes of *Zymomonas mobilis* under the control of the *pfl* native promoter. This chromosome integration was made with pLOI510 as described previously, [3]. The vector pLOI510, was constructed to allow direct selection for the integration of *pdc* and *adhB* of *Z. mobilis* genes into the *pfl* region of the chromosome by using a DNA fragment which lacks a replicon [3]. Transformants were screened for chloramphenicol resistance (20 µg/ml) and CO₂ production in tubes, and subsequently tested for ethanol production in mini-fermentors with 20 g/l of glucose.

All stock cultures were stored at -70°C in Luria Broth (LB) medium [62] containing 40% glycerol. To develop inocula, cells were transferred twice on LB-agar plates supplemented with 20 g/L of glucose-chloramphenicol (20 µg/ml), and no chloramphenicol for *E. coli* C. Single colonies were transferred to overnight cultures in shake flasks (35°C, 120 rpm), containing glucose (20 g/L) in mineral M9-medium [62]. M9-medium contains: 6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 0.5 g/L NaCl. The following components were sterilized by filtration, and then added (per liter of final medium): 2 ml of 1 M MgSO₄·7H₂O, 1

ml of 0.1 M of CaCl₂, 1 mL of 1 mg/mL thiamine-HCl. These cells were harvested in exponential growth phase by centrifugation and used to inoculate non-aerated mini-fermentors [63], containing 200 ml of M9-medium with 40 g/L of glucose. Starting OD₆₀₀ was 0.1, chloramphenicol (0, 40 and 20 µg/ml) was included for strains C, KO11 and CCE14, (respectively), cells were cultivated at 35°C, 100 rpm, and the pH was maintained at 7 by the automatic addition of 2 N KOH. All cultures were carried out in triplicate.

Analytical methods

Samples were periodically taken from cultures to measure optical density at 600 nm using a spectrophotometer (Beckman DU-70, Palo Alto, CA) and the dry cell weight was calculated using a previously determined conversion factor of 1 OD₆₀₀ = 0.37 g/L. An HPLC system (600E quaternary bomb, 717 automatic injector, 2410 refractive index, and 996 photodiode array detectors, Waters, Milford, MA) and an Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm; 9 µm) (Bio-Rad, Hercules, CA) were used to separate and quantify D-glucose, formate, acetate, succinate, and lactate concentrations. Running conditions were: mobile phase, 5 mM H₂SO₄, flow 0.5 ml/min, and temperature 50°C. Under these conditions glucose was detected by refractive index, and organic acids were identified by photodiode array at 210 nm. Ethanol was quantified by gas chromatography (Agilent 6850, Wilmington, D.E.), using 1-butanol as internal standard.

Preparation of cell extracts and enzymatic assays

Samples were taken at the mid-exponential and stationary phases. All operations were carried out at 4°C. 1 mL of cell culture was harvested by centrifugation at 10,000 × g for 10 min, washed twice with 1 mL of 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 20 mM KCl, 5 mM MnSO₄, 2 mM DTT and 0.1 mM EDTA, and then suspended in 1 mL of the same buffer. Cells were disrupted by four sonication steps (15 s each) in an ultrasonic disrupter (Soniprep 150, UK). The cell debris was removed by centrifugation; 10 min at 10,000 × g. The resulting crude extracts were used immediately for determination of enzymatic activities and protein, or stored at -20°C.

Enzyme activities were measured spectrophotometrically at 340 nm in a thermostatically controlled (30°C) spec-

Table 1: Escherichia coli strains used in this study

Strain	Relevant features	Reference
<i>E. coli</i> C	Wild type	ATCC 8739
CCE14	<i>E. coli</i> C: <i>pflB::pdh adhB cat</i>	This work
KO11	<i>E. coli</i> WV: <i>pflB::pdh adhB cat, Δfrd</i>	Ohta et al 1991 Jarboe et al 2007

trophotometer (BioMate 5, ThermoSpectronic, NY). All compounds of the reaction mixtures were pipetted into 1 cm light path cuvettes, reactions were initiated by adding the cell extract or substrate to give a final volume of 1 mL. The millimolar extinction coefficient for NAD⁺, NADH, NADP⁺ and NADPH is 6.22 cm⁻¹. mM⁻¹.

The assay conditions for glucose:PEP phosphotransferase (PTS), 6-phosphofructosekinase (PFK), fructose-1,6-bisphosphatase (FDP), glucose phosphate isomerase (PGI), fructose biphosphate aldolase (FDP aldolase), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), triose phosphate isomerase (TPI), 3-phosphoglycerate kinase (PGK), pyruvate kynase (PYK), 6-phosphogluconate dehydrogenase (ZWF), pyruvate-formate lyase (PFL), and lactate dehydrogenase (LDH) were measured based on the methods used by Peng *et al* [64]. The assay conditions used for alcohol dehydrogenase (ADH_{Zm}) and pyruvate decarboxylase (PDC_{Zm}) were based on the methods reported by Conway *et al* [65]. Phosphoglycerate mutase was measured based on the method of Maitra *et al* [66]. Protein concentration was estimated by the Bradford method, [67], with bovine serum albumin used as the standard. Each assay was performed three times for the same culture, from three independent experiments. A *t*-student test with a *p* value of ≤ 0.05 was applied to each set of normalized values in order to determinate statistical differences in enzyme activity levels.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA extraction was performed using hot-phenol equilibrated with water, precipitated with 3 M sodium acetate and ethanol, and treated with DNase kit (DNA-free™, Ambion; [33]). RNA integrity was tested by densitometry in 1.2% agarose gels. RNA quantification was performed by absorbance at 260/280 nm. cDNA was synthesized using RevertAid™ H First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Inc.) and a mixture of specific DNA primers. The sequences of the primers used for cDNA synthesis were those reported by Flores *et al* [33], except for *pdC_{Zm}* (5'-GACAAAGTTGCCGTCCTCGT and 5'-ATGG-TAGCAACTGCGCCAC) and *adh_{Zm}* (5'-TTACCCCGAT-GGTTTCCGT and 5'-TTCAAATGCGTGCGGTCAGAG) genes. cDNA obtained in this way was used as template for RT-PCR assays. Reproducibility of this procedure was determined by performing two separate cDNA synthesis experiments from the RNA extracted for each strain. Similar results were obtained for the transcription of all genes that were measured.

Real-time PCR

Real-time PCR (RT-PCR) was performed with the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA), using the SYBR Green PCR Master Mix (Perkin Elmer/Applied Biosys-

tems, Foster City, CA) and amplification conditions described by Flores *et al* [33]. The primers for specific amplification were designated using the Primer Express software (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA). The size of all amplimers was 101 bp. The final primer concentration, in a total volume of 15 μl, was 0.2 μM. Five nanograms of target cDNA for each gene was added to the reaction mixture. All experiments were performed in triplicate for each gene of each strain, obtaining very similar values. A non-template control reaction mixture was included for each gene. The quantification technique used to analyze data was the 2^{-ΔΔC_T} method described by Livak and Shmittgen [68]. The data were normalized using the *ihfB* gene as an internal control (house-keeping gene). We detected the same expression level of this gene in all the strains in the conditions in which the bacteria were grown. For each analyzed gene in all strains, the transcription level of the wild type gene, considered as one, was used as the control to normalize the data. Data is reported as relative expression levels compared to the expression levels of *E. coli* C. A *t*-student test with a *p* value of ≤ 0.05 was applied to each set of normalized values in order to determinate statistical differences in expression levels.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MOT Constructed the ethanologenic strain, carried out the kinetic, RT-PCR and enzyme characterization, the data analysis and drafted the manuscript. NF Participated in RT-PCR analysis and proofreading the manuscript. AE Participated in RT-PCR technique and proofreading the manuscript. GHC Participated in HPLC analysis. FB Reviewed and commented the manuscript. GG Reviewed and commented the manuscript. AM Conceived the study, designed and supervised the experiments, participated in results analysis and helped with manuscript preparation.

Acknowledgements

We thank Dr. Lonnie O. Ingram (University of Florida) for kindly providing strain KO11 and pLO1510. We thank Mercedes Enzaldo, Ricardo Ciria and Manuel Hurtado for technical support. We thank Jonathan C. Moore (University of Florida) for proofreading of the manuscript. This work was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) grants: CONACyT-SAGARPA 2004-C01-224, CONACyT – Estado de Morelos MOR-2004-C02-048, CONACyT 44126 and PAPIIT-DGAPA-UNAM IN220908-3. Montserrat Orencio-Trejo held a scholarship from CONACyT.

References

- Gottschalk G: **Bacterial Metabolism**. 2nd edition. Springer, New York Berlin Heidelberg; 1986:237.
- Ingram LO, Conway T, Clark DP, Sewell GW, Preston JF: **Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli***. *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**:2420-2425.
- Ohta K, Beall DS, Mejia JL, Shanmugam KT, Ingram LO: **Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II**. *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**:893-900.
- Dien B, Hespell RB, Wyckoff HA, Bothast R: **Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain**. *Enz Microbiol Technol* 1998, **23**:366-371.
- Bothast RJ, Nichols NN, Dien BS: **Fermentations with New Recombinant Organisms**. *Biotechnol Prog* 1999, **15**:867-875.
- Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO: **Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B**. *Biotechnol Lett* 2007, **29**:397-404.
- Ohta K, Beall DS, Mejia JL, Shanmugam KT, Ingram LO: **Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* strain M5A1 for ethanol production from xylose and glucose**. *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**:2810-2815.
- Wood BE, Ingram LO: **Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulose genes from *Clostridium thermocellum***. *Appl Environ Microbiol* 1992, **58**:2103-2110.
- Golias H, Dumsday GJ, Stanley GA, Pamment NB: **Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis***. *J Biotechnol* 2002, **96**:155-168.
- Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S: **Metabolic engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis***. *Science* 1995, **267**:240-243.
- Deanda K, Zhang M, Eddy C, Picataggio S: **Development of an Arabinose-Fermenting *Zymomonas mobilis* strain by Metabolic Pathway Engineering**. *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**:4465-4470.
- Ho NWY, Chen Z, Brainard AP: **Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose**. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:1852-1859.
- Becker J, Boles E: **A Modified *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Consumes L-Arabinose and Produces Ethanol**. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(7):4144-4150.
- Jeffries TW, Jin YS: **Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeast**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, **63**:495-509.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF: **Towards industrial pentose-fermenting yeast strains**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **74**:937-953.
- van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuypers M, Luttik MAH, Wisselink HW, Scheffers WA, van Dijken JP, Pronk JT: **Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status**. *Antonie van Leeuwenhoek* 2006, **90**:391-418.
- Jarboe LR, Grabar TB, Yomano LP, Shanmugam KT, Ingram LO: **Development of Ethanologenic Bacteria**. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2007, **108**:237-261 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665158?ordinalpos=5&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.ResultsPanel.Pubmed.RVDocSum>].
- Sawers G, Bock A: **Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12**. *J Bacteriol* 1988, **170**:5330-5336.
- Sawers G, Bock A: **Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression**. *J Bacteriol* 1989, **171**:2485-2498.
- Yomano LP, York SW, Ingram LO: **Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production**. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1998, **20**:132-138.
- Martinez A, York SW, Yomano LP, Pineda VL, Davis FC, Shelton JC, Ingram LO: **Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdC*, *adhB*) in *Escherichia coli***. *Biotechnol Prog* 1999, **15**:891-897.
- Kabir Md, Shimizu K: **Gene expression patterns for metabolic pathway in *pgi* knockout *Escherichia coli* with and without *phb* genes based on RT-PCR**. *J Biotechnol* 2003, **105**:11-31.
- Flores N, Escalante A, de Anda R, Báez-Viveros JL, Merino E, Franco B, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: **New Insights into the Role of Sigma factor RpoS as Revealed in *Escherichia coli* Strains Lacking the Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System**. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008, **14**:176-192.
- Ingram LO, Conway T: **Expression of Different Levels of Ethanologenic Enzymes from *Zymomonas mobilis* in Recombinant Strains of *Escherichia coli***. *Appl Environ Microbiol* 1988, **54**:397-404.
- Huerta-Beristain G, Utrilla J, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Gosset G, Martínez A: **Specific Ethanol Production Rate in Ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 Is Limited by Pyruvate Decarboxylase**. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008, **15**:55-64.
- Tao H, Gonzalez R, Martinez A, Rodriguez M, Ingram LO, Preston JF, Shanmugam KT: **Engineering a Homo-Ethanol Pathway in *Escherichia coli*: Increased Glycolytic Flux and Levels of Expression of Glycolytic Genes during Xylose Fermentation**. *J Bacteriol* 2001, **183**:2979-2988.
- Gonzalez R, Tao H, Shanmugam KT, York SW, Ingram LO: **Global Gene Expression Differences Associated with Changes in Glycolytic Flux and Growth Rate in *Escherichia coli* during the Fermentation of Glucose and Xylose**. *Biotechnol Prog* 2002, **18**:6-20.
- Brau B, Sahn H: **Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli***. *Arch Microbiol* 1986, **144**:296-301.
- Neale AD, Scopes RK, Wettenhall REH, Hoogenraad NJ: **Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: Isolation, properties and genetic expression in *Escherichia coli***. *J Bacteriol* 1987, **169**:1024-1028.
- Mejia JP, Burnett ME, Haejung AN, Barnell WO, Keshav KF, Conway T, Ingram LO: **Coordination of Expression of *Zymomonas mobilis* Glycolytic and Fermentative Enzymes: a Simple Hypothesis Based on mRNA Stability**. *J Bacteriol* 1992, **174**:6438-6443.
- Plumbridge J: **Expression of *ptsG*, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by *Mlc* and induced by growth on glucose**. *Mol Microbiol* 1998, **29**:1053-1063.
- Nam TW, Cho SH, Shin D, Kim JH, Jeong JY, Lee JH, Roe JH, Peterkofsky A, Kang SO, Ryu S, Seok YJ: **The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme *IICB^{Glc}* recruits the global repressor *Mlc***. *EMBO J* 2001, **20**:491-498.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolivar F: **Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system**. *Metabol Eng* 2005, **7**:70-87 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781417?ordinalpos=18&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.ResultsPanel.Pubmed.RVDocSum>].
- Hua Q, Yand C, Oshima T, Mori H, Shimizu K: **Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures**. *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:2354-66.
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR: **Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems**. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology* Edited by: Neidhardt FC. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1996:1149-1174.
- Báez-Viveros JL, Flores N, Juárez K, Castillo-España P, Bolivar F, Gosset G: **Metabolic transcription analysis of engineered *Escherichia coli* strains that overproduce L-phenylalanine**. *Microb Cell Fact* 2007, **6**:30.
- Arora KK, Pedersen PL: **Glucokinase of *Escherichia coli*: Induction in Response to the Stress of Overexpressing Foreign Proteins**. *Arch Biochem Biophys* 1995, **319**(2):574-578.
- Saier MH Jr: **Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria**. *FEMS Microbiol Lett* 1996, **138**:97-103.

39. Saier MH Jr, Ramseier TM: **Minireview. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria.** *J bacteriol* 1996, **178**:3411-3417.
40. Crasnier-Mednansky M, Park MC, Studley WK, Saier MH Jr: **Cra-mediated regulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase.** *Microbiology* 1997, **143**:785-792.
41. Chin AM, Feldheim DA, Saier MH Jr: **Altered transcription patterns affecting several metabolic pathways in strains of *Salmonella typhimurium* which overexpress the fructose regulon.** *J Bacteriol* 1989, **171**:2424-2434.
42. Ramseier TM, Bleding S, Michotey V, Feghali R, Saier MH Jr: **The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 1995, **16**:1157-1169.
43. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:14863-14868.
44. Bledig SA, Ramseier TM, Saier MH Jr: **FruR mediates catabolite activation of pyruvate kinase (*pykF*) gene expression in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1996, **178**:280-283.
45. Charpentier B, Branlant C: **The *Escherichia coli* *gapA* Gene Is Transcribed by the Vegetative RNA Polymerase Holoenzyme $E\sigma^{70}$ and the Heat Shock RNA Polymerase $E\sigma^{32}$.** *J Bacteriol* 1994, **176**:830-839.
46. Bardey V, Vallet C, Robas N, Charpentier B, Thouvenot B, Mouglin A, Hajnsdorf E, Régnier P, Springer M, Bralant C: **Characterization of the molecular mechanisms involved in the differential production of erythrose-4-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase and class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 2005, **57**:1265-1287.
47. Charpentier B, Bardey V, Robas N, Branlant C: **The EII^{Glc} Protein Is Involved in Glucose-Mediated Activation of *Escherichia coli* *gapA* and *gapB-pgk* Transcription.** *J Bacteriol* 1998, **180**:6473-6483 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851989?ordinal_pos=3&itool=EntrezSystem2.PEntz.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum].
48. Ludwing H, Homuth G, Schmalisch M, Dyka FM, Hecker M, Stulke J: **Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis* : evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon.** *Mol Microbiol* 2001, **41**:409-422.
49. Doan T, Aymerich S: **Regulation of glycolytic genes in *Bacillus subtilis* : binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1,6-bisphosphate.** *Mol Microbiol* 2003, **47**:1709-1721.
50. Burchhardt G, Keshav KF, Yomano L, Ingram LO: **Mutational Analysis of Segmental Stabilization of Transcripts from the *Zymomonas mobilis* *gap-pgk* Operon.** *J Biotechnol* 1993, **175**:2327-2333 [<http://jb.asm.org/cgi/reprint/175/8/2327?view=long&pmid=8468293>].
51. Branny P, de la Torre F, Garel JR: **An operon encoding three glycolytic enzymes in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaris*: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase.** *Microbiology* 1998, **144**:905-914.
52. Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolivar F: **Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ^{13}C labeling and NMR spectroscopy.** *Metabol Eng* 2002, **4**:124-137 [http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VWN3-45V8024&_user=945819&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view&_acct=C000048981&_version=1&_urlVersion=0&_userid=9458&md5=537d9456dc0f637cc3d453e1d7c6f1a].
53. Conway T: **The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology.** *FEMS Microbiol Rev* 1992, **103**:1-28 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1389313?ordinal_pos=11&itool=EntrezSystem2.PEntz.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum].
54. Sprenger GA: **Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis* : a catabolic highway with some scenic routes.** *FEMS Microbiol Lett* 1996, **145**:301-307.
55. Jones HM, Gunsalus RP: **Transcription of the *Escherichia coli* Fumarate Reductase Genes (*frdABCD*) and Their Coordinate Regulation by Oxygen, Nitrate, and Fumarate.** *J Bacteriol* 1985, **164**:1100-1109.
56. Franchini AG, Egli T: **Global gene expression in *Escherichia coli* K-12 during short-term and long-term adaptation to glucose-limited continuous culture conditions.** *Microbiol* 2006, **152**(Pt 72111-2127 [<http://mic.sgmjournals.org/cgi/content/full/152/7/2111?view=long&pmid=16804185>]).
57. Tseng C, Yu C, Lin H, Chang C, Kuo J: **Oxygen- and Growth Rate-Dependent Regulation of *Escherichia coli* Fumarase (*FumA*, *FumB* and *FumC*) Activity.** *J Bacteriol* 2000, **183**(2461-467 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133938?ordinal_pos=15&itool=EntrezSystem2.PEntz.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum]).
58. Partridge J, Scott C, Tang Y, Poole R, Green J: ***Escherichia coli* Transcriptome Dynamics during the Transition from Anaerobic to Aerobic Conditions.** *J Biol Chem* 2006, **281**:27806-27815.
59. Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR: **The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP.** *J Bacteriol* 2002, **184**:3909-3916.
60. Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G: **Glycolysis and the regulation of glucose transport in *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in batch and fed-batch culture.** *Microbial Cell Factories* 2007, **6**:16.
61. Tarmy EM, Kaplan NO: **Kinetics of *Escherichia coli* B D-Lactate Dehydrogenase and Evidence for Pyruvate-controlled Change in Conformation.** *J Biological Chemistry* 1968, **243**:2587-2596 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4297266?ordinal_pos=1&itool=EntrezSystem2.PEntz.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum].
62. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: **Molecular Cloning.** In *A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982.
63. Beall DS, Ohta K, Ingram LO: **Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*.** *Biotechnol Bioeng* 1991, **38**:296-303.
64. Peng L, Shimizu K: **Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K-12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **61**:163-178.
65. Conway T, Osman YA, Donnan EM, Ingram LO: **Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase.** *J Bacteriol* 1987, **169**:949-954.
66. Maitra PK, Lobo Z: **A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast.** *J Biol Chem* 1971, **246**:475-488.
67. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry* 1976, **72**:248-254.
68. Livak K, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.** *Methods* 2001, **25**:402-408.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Apéndice B. Estado del arte para la obtención de etanol a partir de residuos agroindustriales.



ESTADO DEL ARTE PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

Montserrat Orencio-Trejo¹, Susana Romero², Alfredo Martínez Jiménez³

RESUMEN.

En este trabajo se discute el estado del arte en la producción de etanol carburante a partir de residuos agroindustriales. Se realiza una descripción de los tratamientos más utilizados para hidrolizar la fracción hemicelulósica de los residuos. Brevemente se presentarán algunos métodos usados para la detoxificación de jarabes de hemicelulosa, ricos en pentosas. Se pondrá especial énfasis en el desarrollo de microorganismos, por medio de ingeniería de vías metabólicas, para la conversión en etanol de los azúcares provenientes de hidrolizados hemicelulósicos (xilosa, arabinosa, manosa y glucosa). Finalmente, discutirán las estrategias científicas que a consideración del autor se deben cumplir para lograr la conversión integral de los azúcares de los residuos agroindustriales en etanol.

1. INTRODUCCIÓN.

La necesidad de diversificar las fuentes de energía a futuro, que además sean sustentables y más amigables con el medio ambiente, plantea la necesidad de desarrollar microorganismos capaces de metabolizar una amplia variedad de azúcares y convertirlos eficientemente en productos de interés. Existen varias alternativas para obtener combustibles mediante tecnologías renovables. Desde el punto de vista biotecnológico, una de las opciones con mayor viabilidad para sustituir o complementar a la gasolina es el etanol carburante (Ingram *et al.*, 1999). Este es un compuesto que puede ser producido mediante tecnologías biológicas sustentables, permitiendo un reciclamiento del CO₂, y evitando su incremento neto en la atmósfera. Por otro lado, no es tóxico ni es cancerígeno, y es fácil de almacenar y transportar.

Una alternativa factible económicamente para la producción de etanol mediante procesos biológicos, es la utilización de los desechos agroindustriales. Estos residuos son abundantes, contaminan y tienen un uso marginal en el planeta. Un ejemplo de ello es el bagazo de caña el cual contiene dos fracciones, una de ellas es la hemicelulosa y la otra es la de celulosa, las cuales representan en 30-40 y 30-50% respectivamente (Ingram *et al.*, 1999). Específicamente, la fracción de la hemicelulosa contiene, además de glucosa y manosa, un 85% de pentosas,

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P. 510-3. Cuernavaca, Mor., 62250 México.

² Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P. 510-3. Cuernavaca, Mor., 62250 México.

³ Ingeniero Bioquímico Industrial, M.Sc. en Ciencias Bioquímicas, Ph.D. en Ciencias Bioquímicas. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. A.P. 510-3. Cuernavaca, Mor., 62250 México. Teléfono: (52-777) 3291601. Fax: (52-777)3172388. E-mail: alfredo@ibt.unam.mx, Página web: : <http://pbr322.ibt.unam.mx/~alfredo/>



principalmente xilosa y un pequeño porcentaje de arabinosa. Sin embargo, para que estas fracciones puedan ser utilizadas como fuente de carbono por los microorganismos, necesitan ser previamente hidrolizadas. Los jarabes resultantes deben ser acondicionados y detoxificados, para posteriormente fermentarse con la ayuda de bacterias o levaduras modificados por ingeniería de vías metabólicas, los cuales deben ser proveídos con la capacidad para fermentar todos los azúcares presentes en la lignocelulosa, a decir una amplia variedad pentosas y hexosas. Posteriormente, el etanol obtenido debe ser destilado y “secado” para poder ser utilizado como carburante. La Figura 1 presenta un esquema de este proceso aplicado al bagazo de caña de azúcar.

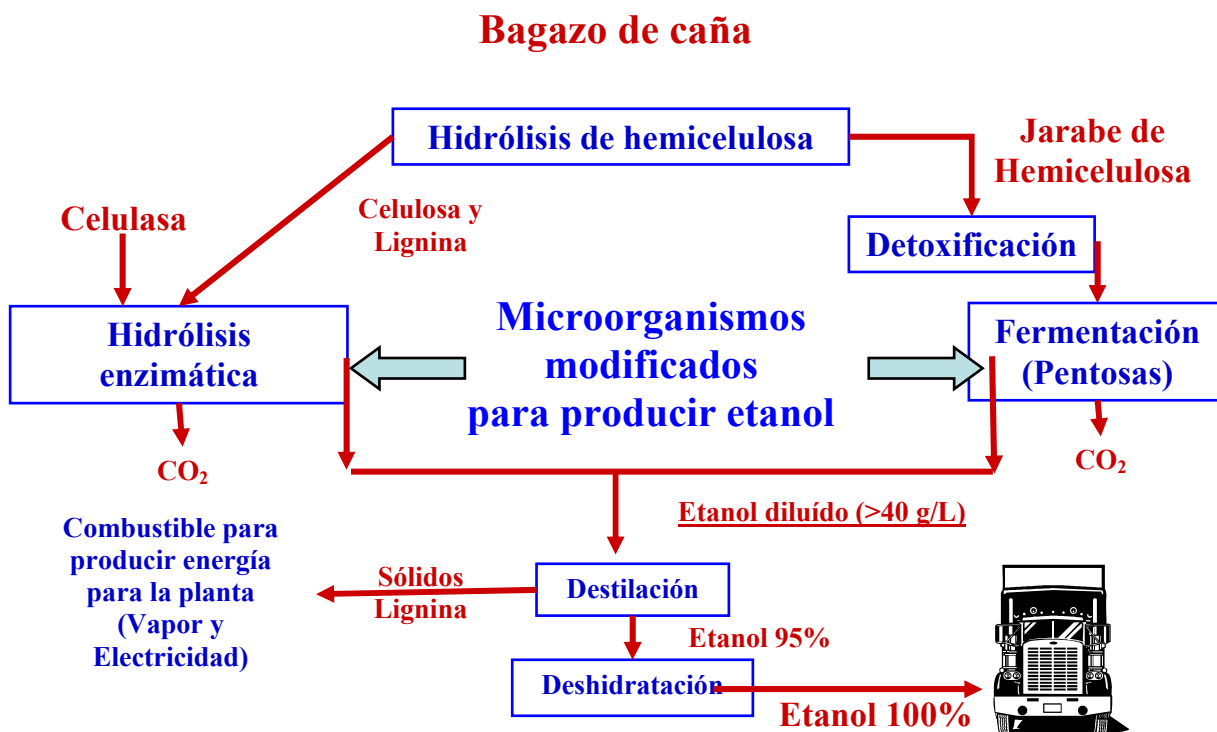


Figura 1. Esquema de Producción de etanol carburante a partir de residuos agroindustriales.

A continuación se presenta una descripción de varias de las etapas indicadas en la Figura 1, en las cuales los autores de este trabajo han participado.

2. ESTADO DEL ARTE EN ALGUNAS DE LAS ETAPAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.

Hidrólisis de la hemicelulosa.



Existen varios métodos para llevar a cabo la hidrólisis de la fracción hemicelulósica, sin embargo uno de los más estudiados y usado, por su bajo costo y facilidad relativa de implementar, es el proceso termoquímico con ácido sulfúrico diluido. Este tratamiento puede realizarse en procesos lote, con temperaturas que varían de 120-160°C, usando de 1 a 6% de ácido sulfúrico y tiempos de reacción de una a dos horas. En el caso de procesos continuos, se utilizan temperaturas de 160-240°C, 1 a 2% de ácido sulfúrico y tiempos de reacción de hasta 15 minutos.

Generación de toxinas.

Sin embargo, durante el proceso de hidrólisis ácida de esta fracción, se generan compuestos que inhiben el crecimiento de las bacterias y afectan drásticamente la producción de etanol. Entre estos compuestos se encuentran ácidos orgánicos (principalmente acético, fórmico y levulínico), furanos, a decir derivados de hexosas (hidroximetilfurfural) y pentosas (furfural). También están presentes diversos compuestos aromáticos generados de la descomposición de la lignina, como vainilla, hidroxi-benzaldehído, y siringaldehído, así como sus respectivos ácidos y alcoholes, y iones metálicos, estos últimos liberados como resultado de la corrosión del equipo y una amplia variedad de ácidos, aldehídos y alcoholes fenólicos que varían dependiendo del material lignocelulósico que se emplea y de las condiciones del proceso termoquímico. En la Figura 2 se presenta un resumen de “toxinas” que potencialmente pueden estar presentes en los hidrolizados.

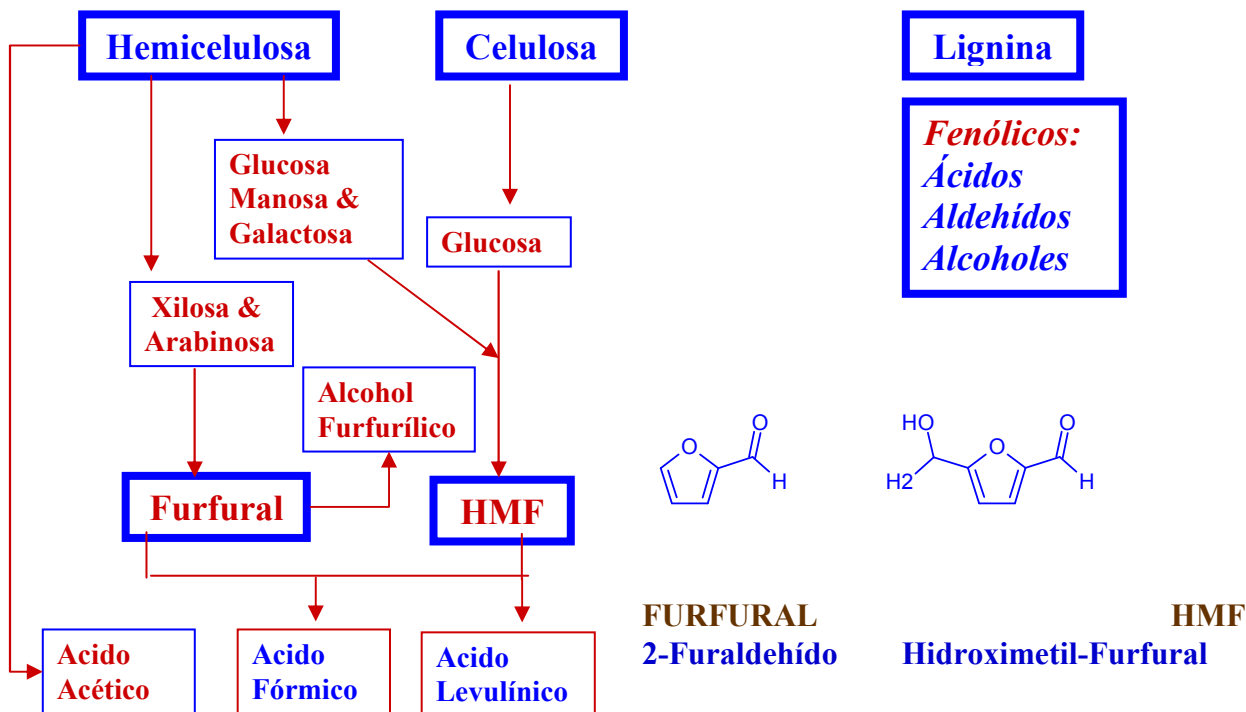


Figura 2. Composición generalizada de hidrolizados provenientes de la fracción hemicelulósica de residuos agroindustriales.



Para reducir el efecto adverso de estos compuestos en la producción de etanol, se evaluó el efecto de los aldehídos generados durante la elaboración de los hidrolizados ácidos de bagazo de caña sobre el crecimiento de cepas etanológicas de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los aldehídos aromáticos son los más inhibitorios a bajas concentraciones, sin embargo, los furanos derivados de la degradación de los azúcares muestran un fuerte efecto sinérgico de inhibición cuando se encuentra en combinación con otros aldehídos o ácidos. (Zaldivar *et al.*, 1999). De manera análoga se ha evaluado el efecto de los alcoholes generados durante la elaboración de los hidrolizados ácidos de bagazo de caña. En este caso se encontró que los alcoholes aromáticos reducen la producción de etanol mediante la inhibición del crecimiento de *E. coli*. Cuantificando la liberación de Mg intracelular durante los tratamientos con los alcoholes, se encontró que su toxicidad se debe primariamente a un efecto de disrupción de la membrana celular. Así mismo, se ha encontrado que comparando una misma concentración molar de alcoholes aromáticos, aldehídos y ácidos, los alcoholes aromáticos son menos tóxicos para el crecimiento de *E. coli* que sus respectivos aldehídos y ácidos. Un análisis global de estos datos permitió concluir que la toxicidad de estos compuestos es directamente proporcional a la hidrofobicidad de los mismos. Finalmente, las combinaciones de estos compuestos tóxicos generalmente son aditivas. Sin embargo, al combinarse con los furanos el efecto tóxico es sinérgico (Zaldivar *et al.*, 2000).

Detoxificación.

Los resultados obtenidos permitieron detectar a los furanos como compuestos clave en la toxicidad de los hidrolizados ácidos de bagazo de caña. Por esta razón se evaluaron diversos métodos para reducir, de manera sencilla y económica, la presencia de los furanos en los mismos. Entre los métodos evaluados, encontramos que uno de los tratamientos más versátiles es con hidróxido de calcio, a valores de pH entre 10 y 11. Dichos tratamientos son más efectivos a temperaturas de 60 a 70°C, que a temperatura ambiente. En condiciones óptimas, los tratamientos con hidróxido de calcio permiten reducir hasta en un 60% el contenido de furanos en los hidrolizados. Sin embargo, la reducción en los compuestos aromáticos es insignificante y los ácidos orgánicos no son destruidos durante el tratamiento. Con los tratamientos a pH 7 y temperatura ambiente el rendimiento de etanol, en base al azúcar total presente en los hidrolizados, es únicamente del 30% a 48 horas de tiempo efectivo de fermentación. En contraparte, con los hidrolizados tratados en condiciones óptimas (pH de 10 a 11 y temperatura de 60°C) la fermentabilidad de los mismos se incrementa substancialmente y se obtienen rendimientos ligeramente mayores al 90% a las 48 horas de fermentación (Martínez *et al.*, 2000a; Martínez *et al.*, 2001).

Desarrollo de un método para la determinación sencilla de furanos totales.

Como parte complementaria a este trabajo, se desarrolló un método para cuantificar de manera rápida y sencilla a los furanos presentes en los hidrolizados. La complejidad en composición



de los hidrolizados, así como el color de los mismos (café muy oscuro), requieren del uso de técnicas como cromatografía de líquidos o espectrometría de masas, para poder identificar y cuantificar a los furanos y otros compuestos presentes en los mismos. Mediante el uso de espectros de absorción en la región ultravioleta y visible, y de diluciones apropiadas en agua, se encontró que los hidrolizados tienen un espectro peculiar y que es posible correlacionar dicho espectro con la concentración total de furanos. Este método se está usando con fines de control de calidad para la producción y para la detoxificación de los hidrolizados ácidos. Aunque los furanos únicamente representan una porción de las toxinas presentes en los hidrolizados, se encontró que la cantidad de furanos presente en los mismos permite predecir su toxicidad (Martínez *et al.*, 2000 b).

3. FERMENTACIÓN DE PENTOSAS Y GLUCOSA CON BACTERIAS.

Ingeniería de vías metabólicas en *Escherichia coli* para la producción de etanol a partir de pentosas y hexosas.

Por medio de Ingeniería de Vías Metabólicas (Modificación y/o introducción de nuevas reacciones bioquímicas para el mejoramiento directo de propiedades celulares mediante tecnología de ADN recombinante), se han construido cepas recombinantes a partir de *E. coli* mediante la introducción de vías heterólogas para producir etanol. La estrategia más exitosa ha sido la integración a cromosoma de los genes que codifican para la piruvato descarboxilasa (*pdc*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Zymomonas mobilis* (Ohta *et al.*, 1991); la interrupción de vías que compiten por el piruvato en la producción de etanol (Ingram *et al.*, 1998; Ingram *et al.*, 1999); y la construcción de cepas que eliminen el fenómeno de represión catabólica y puedan metabolizar pentosas y hexosas simultáneamente (Nichols *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2003; Dien *et al.*, 1999).

Una de las cepas más exitosas, que pretende ser utilizada a nivel industrial para producir etanol a partir de hidrolizados de residuos agroindustriales es la cepa KO11 (Lindsay *et al.*, 2003). KO11 es una cepa derivada de *E. coli* B, con la cual en medio rico se obtienen rendimientos de conversión de una amplia variedad de azúcares en etanol cercanos al teórico (ligeramente mayores al 90%), incluyendo glucosa, manosa, xilosa, arabinosa, o mezclas de los mismos en medios ricos (Nichols *et al.*, 2001; Lindsay *et al.*, 2003). Sorprendentemente, con esta cepa en cultivos anaerobios con glucosa o xilosa, se incrementa en un 40 y 50% la velocidad específica de crecimiento y el flujo glicolítico, respectivamente en comparación con la cepa progenitora (Tao *et al.*, 2001). Este fenómeno se repite en diferente grado con otras cepas etanológicas de *E. coli*.

Estudios con la cepa KO11, han demostrado que se requiere de una cantidad elevada de nutrientes para la producción de etanol. Se han llevado a cabo análisis de la expresión de los genes que codifican para las enzimas PDC y ADH de *Z. mobilis* y se ha demostrado que más que un requerimiento nutricional específico, la expresión cromosomal de *pdc* y *adhB* es dependiente del medio de cultivo. Es decir que la activación de los genes biosintéticos durante el crecimiento en medios pobres reduce la expresión cromosomal de *pdc* y *adhB*, mediante un



fenómeno de competencia por ARN, pozas de aminoácidos y precursores para la biosíntesis de macromoléculas. Los requerimientos nutricionales para la producción de etanol han sido substancialmente reducidos en cepas con una expresión elevada de los genes *pdc* y *adhB* (Martínez *et al.*, 1999).

Segunda generación de biocatalizadores etanológicos basados en *Escherichia coli*.

También se ha estudiado el efecto de sobre-expresar genes del metabolismo de carbono sobre la velocidad específica (flux) de formación de etanol en la cepa KO11. En conjunto, los resultados obtenidos indican que en la cepa de *E. coli* etanológica KO11, cuando está utilizando glucosa o xilosa, el flux en la glucólisis no se encuentra controlado individualmente por el transporte de la fuente de carbono, ni positivamente por enzimas de la vía glucolítica. No obstante algunos pasos enzimáticos de la glicólisis, tales como los catalizados por la fosfofructo cinasa y la piruvato cinasa controlan de manera negativa el flujo glicolítico. No se descarta la posibilidad de que el control positivo de la glicólisis dependa de la sobre-expresión de un conjunto de enzimas, por ejemplo: a través del incremento simultáneo de actividades enzimáticas. Los resultados indican que el control del flux glicolítico en *E. coli* KO11 esta parcialmente fuera de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y se demostró que la actividad enzimática de Pdc limita el flux de piruvato hacia la formación de etanol. En consecuencia la sobre-expresión de *pdcz_m* permitió incrementar los flujos de consumo del sustrato y el de producción de etanol durante la fase estacionaria, cuando se utiliza como fuente de carbono glucosa o xilosa, con una concomitante disminución del flux de carbono hacia la formación de ácidos orgánicos. Finalmente, incrementando la actividad de Pdc se logró aumentar sustancialmente el rendimiento teórico de conversión de glucosa o xilosa en etanol (27% en promedio) en medio mineral. Estos resultados demuestran que los esfuerzos enfocados hacia el mejoramiento de cepas etanológicas de *E. coli* deben considerar como uno de sus principales objetivos la optimización de la expresión del gen *pdcz_m*, así como la búsqueda o generación de versiones más activas de Pdc (Huerta-Beristain *et al* 2005; Huerta-Beristain *et al.*, 2007).

Así mismo, se construyó una cepa etanológica de *E. coli* derivada de *E. coli* B (cepa CBE14) integrando bajo el promotor de *pfl*, los genes de *pdcz_m* y *adhB_{zm}*. El rendimiento de etanol en medio mínimo con glucosa fue de 20, 70 y 90% respecto al teórico máximo en la cepas *E. coli* B, KO11 y CBE14 respectivamente. Se observó que el flujo de etanol se incrementó tres veces respecto a la cepa KO11 y el flujo glicolítico se incrementó en un 40% en ambas cepas etanológicas respecto a la cepa progenitora. Posteriormente se midieron las actividades enzimáticas y los niveles de transcrito mediante la reacción de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR por sus siglas en inglés), relacionadas a la glicólisis, así como de los pasos involucrados en el metabolismo del piruvato en condiciones de fermentación. Se encontró que los cambios observados están relacionados con la sobre-expresión e incrementos en el nivel de actividad de genes de la vía heteróloga para producción de etanol, así como enzimas de transporte (PTS), y a la producción y utilización de ATP. Esos resultados sugieren que mayores niveles tanto de expresión como de actividad enzimática de Pdc_{zm} y Adh_{zm} permiten modificar el flujo de carbono hacia la vía de producción de etanol. De la misma forma, los ajustes observados en la glucólisis, pentosas y transporte, hacen posible una baja



producción de ácidos orgánicos y el incremento en el flujo glicolítico. Los resultados también sugieren que estos eventos están relacionados al recambio de poder reductor y energía. (Orencio-Trejo, datos no publicados). Adicionalmente se ha probado que la generación de ácidos orgánicos cuando se utilizan concentraciones elevadas de azúcares (100 g/L de xilosa, glucosa o la mezcla de ambas) reduce sustancialmente el rendimiento de formación de etanol, favoreciéndose la formación de lactato, succinato, formato o acetato dependiendo del fondo genético de la cepa utilizada (Orencio-Trejo, datos no publicados). Estos hechos han llevado al planteamiento de interrumpir todas las vías de fermentación que compitan con la disponibilidad del piruvato y que no afecten el balance redox, o lo que es lo mismo, el reciclamiento efectivo del NADH en condiciones anaerobias (Figura 3). Combinando estas estrategias, es decir evitando que el flujo de piruvato se desvíe a la formación de ácidos orgánicos, teniendo un buen nivel de actividad de Pdc y Adh a través de genes expresados en cromosoma y usando metodologías de evolución metabólica, se ha obtenido una nueva generación de cepas etanológicas derivadas de *E. coli*, las cuales pueden fermentar eficientemente pentosas y hexosas a etanol, con una nula producción de ácidos orgánicos, aún usando altas concentraciones de xilosa, glucosa o hidrolizados con concentraciones de hasta 100 g/L de azúcares totales (Martínez *et al.*, 2007). Con esta nueva generación de cepas es necesario realizar estudios de escalamiento para probar el potencial industrial de las cepas etanológicas de bacterias Gram Negativas.

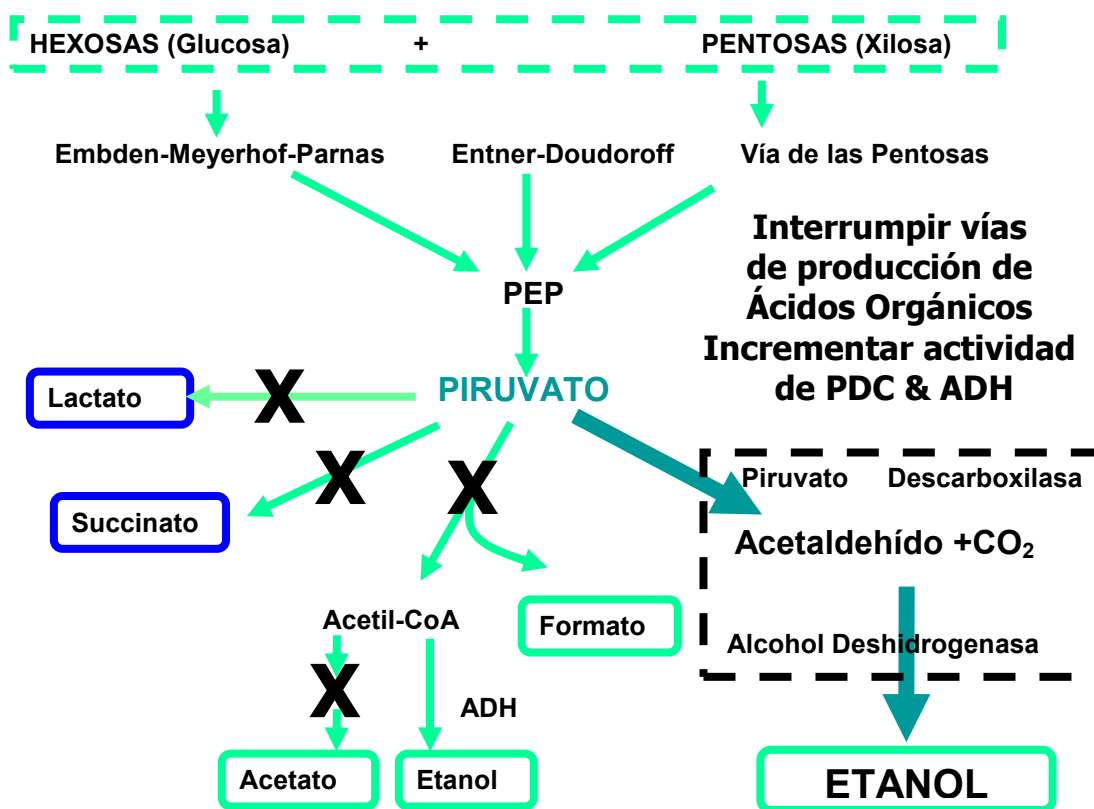




Figura 3. Esquema metabólico desarrollado para la construcción de biocatalizadores basados en *Escherichia coli* para la obtención de cepas homoetanológicas.

Desarrollo de catalizadores etanológicos de segunda generación.

También se ha trabajado en la construcción de cepas etanológicas a partir de *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* puede utilizar una amplia variedad de azúcares. Adicionalmente esta bacteria tiene la capacidad de producir amilasas, de tal forma que potencialmente puede utilizar directamente azúcares provenientes de almidones de diferentes granos. También tiene la capacidad de hidrolizar fracciones de celulosa y hemicelulosa, de tal forma que potencialmente se puede simplificar el proceso de producción planteado en la Figura 1. Esto implica el desarrollo de cepas robustas, así como de estrategias de ingeniería metabólica y de cultivo para favorecer la producción de enzimas degradativas y catalizadores homoetanológicos, para posteriormente llevar a cabo la hidrólisis de la lignocelulosa y la fermentación de los azúcares obtenidos en una sola operación unitaria. Por tal razón, recientemente abordamos la estrategia de construir un nuevo biocatalizador etanológico de segunda generación basado en *B. subtilis*.

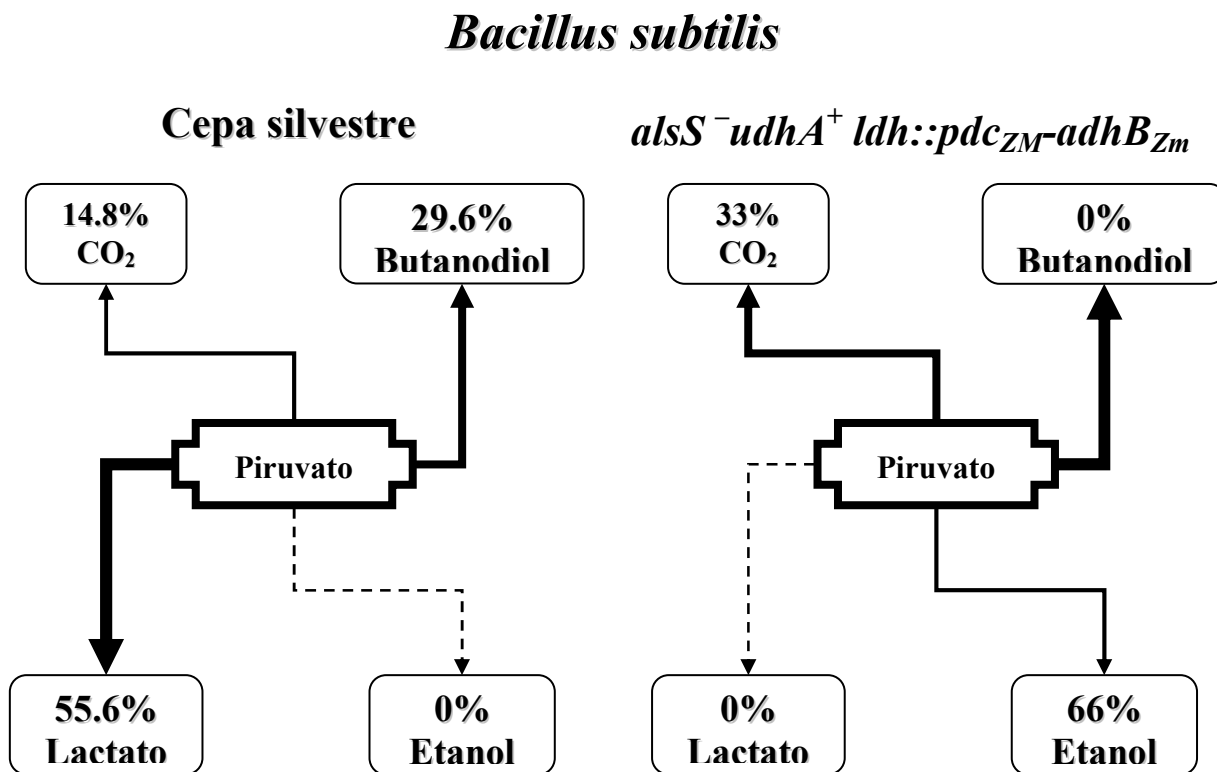


Figura 4. Distribución de carbono en el desarrollo de una cepa homoetanológica a partir de *Bacillus subtilis*. El esquema de la izquierda representa la cepa progenitora y la de la derecha la modificada por ingeniería de vías metabólicas.



Las cepas silvestres de *B. subtilis* pueden fermentar 20 g/L de glucosa en 48 horas, produciendo lactato y butanediol, pero no produce etanol. Usando metodologías de ingeniería de vías metabólicas, se construyó una cepa etanológica de *B. subtilis* (BS35) interrumpiendo el gene de la lactato deshidrogenasa (*ldh*) e integrando en cromosoma los genes *pdz_{Zm}* y *adh_{Zm}* bajo el promotor nativo de *ldh*. Se midieron las actividades enzimáticas de Pdc y Adh en la cepa etanológica y se encontró que los niveles eran similares a los encontrados en cepas etanológicas de *E. coli*, por ejemplo como la KO11. La cepa BS35 produjo etanol y butanediol, sin embargo, el crecimiento celular y el consumo de glucosa se redujeron 70 y 65% respectivamente, en comparación con la cepa progenitora. Para eliminar la producción de butanediol, se inactivó el gene de la acetolactato sintasa (*alsS*). En la cepa resultante (BS36), se incrementó la producción de etanol (89% respecto al teórico máximo); sin embargo, el crecimiento celular y el consumo de glucosa fueron bajos. La expresión cromosomal de una transhidrogenasa de *E. coli*, permitió una recuperación parcial del crecimiento celular y favorecer la producción de etanol desde la fase de crecimiento. Llevando cultivos de larga duración, logramos demostrar que pueden obtenerse hasta 9 g/L de etanol utilizando la cepa BS37 (*B. subtilis alsS⁻udhA⁺ldh::pdz_{ZM}-adh_{B_{Zm}}*) a partir de 20 g/L de glucosa. La Figura 4 presenta un esquema simplificado de los resultados obtenidos a la fecha en este proyecto. Este es un rendimiento prácticamente del 90% respecto al teórico, el cual es el mayor valor reportado para una bacteria Gram Positiva (Romero *et al.*, 2007).

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

El desarrollo de biocatalizadores etanológicos diseñados ex profeso para la utilización de azúcares provenientes de hidrolizados de lignocelulosa ha permitido vislumbrar el uso de residuos agroindustriales y otros recursos agrícolas compuestos de celulosa, como materias primas viables para la producción de biocombustibles. Específicamente en el área de producción de etanol carburante, el desarrollo de metodologías, estrategias y el uso de nuevas herramientas ha permitido un desarrollo más acelerado de biocatalizadores homoetanológicos durante los últimos años. Estos microorganismos ahora deben acoplarse al esquema general de producción de etanol. Entre las áreas que ahora requieren mayor estudio son: la obtención eficiente de biomasa en tierras marginales; el desarrollo, implementación y optimización de procesos de hidrólisis enzimática de celulosa; la optimización de procesos termoquímicos para la hidrólisis de la hemicelulosa y de destilación, esto con el fin de minimizar el uso de energía fósil en las plantas de producción de biocombustibles renovables; y contemplar la producción de otros biocombustibles que contengan una mayor capacidad energética y que no sean higroscópicos como el etanol.

AGRADECIMIENTOS.

Se agradece el financiamiento otorgado a este trabajo a través del proyecto CONACYT – EDO. DE MORELOS 2004-CO1-048.



BIBLIOGRAFÍA.

- Dien, B. S. y Bothast, R. J. 1999. Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *Escherichia coli* strain FBR3. *Journal of Industrial Microbiol & Biotechnol.* 22, 575-581.
- Huerta-Beristain G., J. Utrilla-Carreri, G. Hernández-Chávez, F. Bolívar, G. Gosset y A. Martínez. 2005. Ingeniería metabólica para incrementar el flux y rendimiento de etanol en *Escherichia coli* etanológica. *Revista Mexicana de Ingeniería Química (de la Asociación Mexicana de Ingeniería Química - AMIDIC)*, V. 4, 25-36.
- Huerta-Beristain, G., Utrilla, J., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A. 2007. Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 in limited by pyruvate decarboxylase. *J Mol Microbiol Biotechnol.* In press.
- Ingram, L. O., Gomez, P. F., Lai, X., Nomiruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P., York, S. W. 1998. *Metabolic Engineering of Bacteria for Ethanol Production.* *Biotechnology and Bioengineering.* 58, 204-214.
- Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C.C., Causey, T.B., Martínez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yomano, L.P., York, S.W., Zaldivar, J. y Zhou, S., 1999. Enteric bacterial catalyst for fuel ethanol production. *Biotechnology Progress* 15, 855-866.
- Lindsay, S. E., Bothast, R. J., Ingram, L. O. 2003. Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar mixtures. *App Microbiol and Biotechnol.* 43 (1), 70-75.
- Martinez, A., S.W. York, L.P. Yomano, V.L. Pineda, F.C. Davis, J.C. Shelton and L.O. Ingram. 1999. Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdc*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress.* 15, 891-897.
- Martinez, A., M.E. Rodríguez, S.W. York, J.F. Preston, L.O. Ingram. 2000 a. Effects of Ca(OH)₂ treatments (“Overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering.* 69, 526-536.
- Martinez, A., M.E. Rodríguez, S.W. York, J.F. Preston, L.O. Ingram. 2000 b. Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. *Biotechnology Progress.* 16, 637-641.
- Martinez, A., M.E. Rodríguez, M.L. Wells, S.W. York, J.F. Preston, L.O. Ingram. 2001. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnology Progress.* 17, 287-293.
- Martinez A., T.B. Grabar, K.T. Shanmugam, L.P. Yomano, S.W. York, L.O. Ingram. 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology Letters*, 29, 397-404.
- Nichols, N. N., Dien, B. S., Bothast, R. J. 2001. Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 120-125.
- Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.L., Shanmugan, K.T., Ingram, L.O. 1991a. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 893-900.



- Romero S., Merino E., Bolívar F., Gosset G., Martínez A. 2007. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: Lactate dehydrogenase plays a key role in the fermentative metabolism. *Aceptado para publicarse en: Applied and Environmental Microbiology*. Junio 2007.
- Tao, H., R. González, A. Martínez, M.E. Rodríguez, L.O. Ingram, J.F. Preston, K.T. Shanmugam. 2001. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *Journal of Bacteriology*. 183 (10), 2979-2988.
- Zaldivar, J., A. Martínez and L.O. Ingram. 1999. Effect of Selected Aldehydes on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65 (1) 24-33.
- Zaldivar, J., A. Martínez and L.O. Ingram. 2000. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 68 (5), 524-530.

Apéndice C. Ingeniería metabólica, residuos agroindustriales y etanol carburante.



Desde hace miles de años, el hombre se ha servido de los microorganismos para elaborar diversos productos fermentados, ya sea por bacterias, levaduras u hongos. Esta práctica comenzó posiblemente en el Oriente Medio, con la producción de bebidas alcohólicas a partir de miel, semillas o frutos; se extendió a Europa y de ahí llegó, posteriormente, a América, en algunos productos como el vino y el pan.

**SUSANA ROMERO G., MONTSERRAT ORENCIO T.,
GUILLERMO GOSSET L. Y ALFREDO MARTÍNEZ J.**





Ingeniería Metabólica,

residuos agroindustriales y etanol carburante



En la Mesoamérica prehispánica, no obstante, ya se obtenían bebidas fermentadas como el pulque y, con el tiempo, se han encontrado nuevas aplicaciones en la medicina, la tecnología de alimentos, la remoción de contaminantes y en procesos industriales, por citar algunas.

Nuestra necesidad de satisfactores ha ido más allá y en la década de 1970, como resultado del conocimiento acumulado en el campo de la biología molecular, surgió la ingeniería genética y sus técnicas de ADN recombinante,¹ con lo cual se abre la posibilidad de aislar, editar y modificar el material genético.

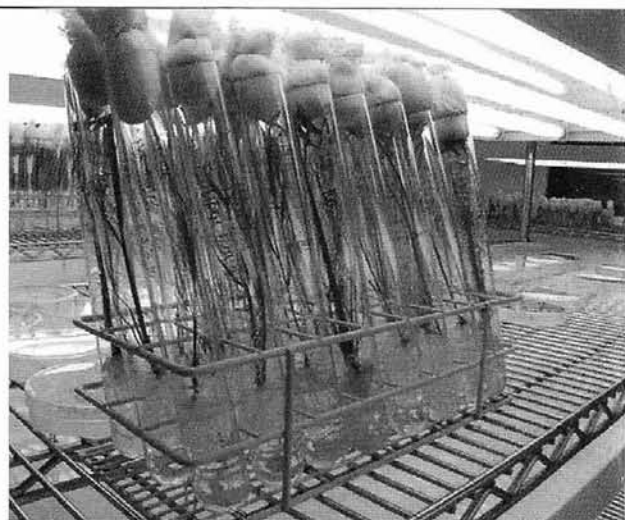
El avance científico ha permitido la secuenciación de genomas completos y, como consecuencia, nace el interés por el estudio de la función, interrelación y evolución de todos los genes de un organismo, conocimientos que contribuyen al surgimiento de la Ingeniería de Vías Metabólicas (IVM) en los años noventa. Esta disciplina se aboca a modificar o introducir nuevas reacciones bioquímicas en el metabolismo de algún microorganismo, mediante tecnología de ADN recombinante, con el propósito de adecuar propiedades celulares para la obtención de diversos productos como el alcohol carburante o algunas proteínas como la insulina.

Esta área de conocimiento apoya sólidamente la investigación en biotecnología,² que se enfoca en la manipulación genética de los microorganismos con el fin de crear nuevos procesos industriales como es el hecho de utilizar residuos agroindustriales para obtener bioenergéticos como etanol, biodiesel y butanol (cuadro 1).

RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN TRANSFORMACIÓN

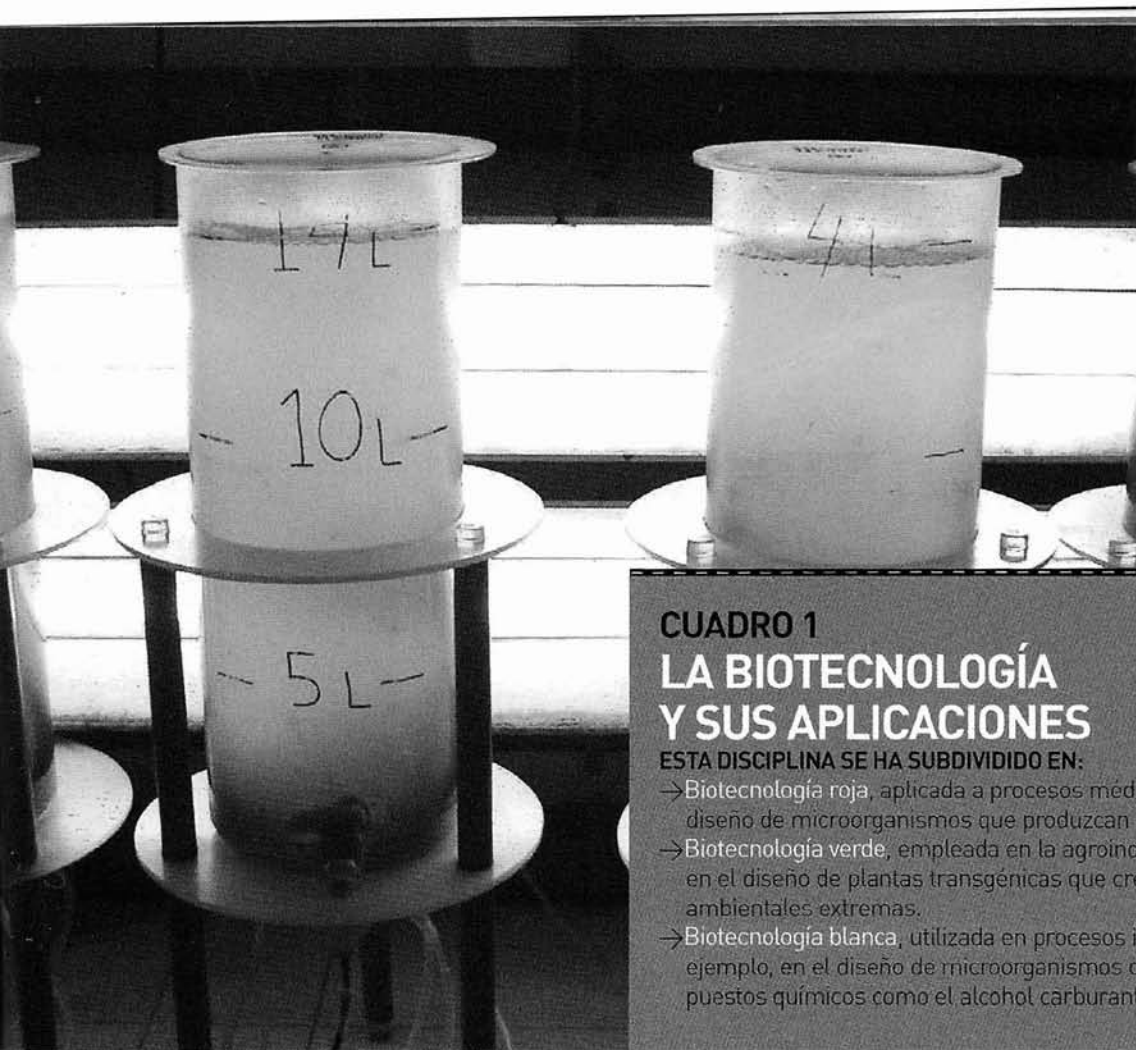
El actual desarrollo económico nacional y mundial está cimentado en el comercio y la transformación del petróleo (recurso natural no renovable). Para

→ La ingeniería de vías metabólicas (IVM) trabaja en la modificación o introducción de nuevas reacciones bioquímicas en el metabolismo de los microorganismos para obtener productos útiles



la economía mexicana, su exportación, aunada a las ventas nacionales, representa un tercio de los ingresos del gobierno federal; no obstante, se prevé su agotamiento durante el primer cuarto del presente siglo, lo cual plantea problemas tanto económicos como de abasto de energía, ya que nuestra demanda energética es satisfecha, principalmente, a partir del petróleo. De aquí la urgencia de impulsar el desarrollo y la implementación de un plan estratégico que conduzca a mantener las reservas de petróleo y gas natural por un periodo mayor al estimado, mediante la sustitución gradual de las materias primas fósiles con derivados químicos y energéticos obtenidos a partir de tecnologías sustentables³ que, además, sean más amigables con el ambiente.

1. Técnicas de laboratorio llevadas a cabo con el fin de combinar fragmentos de ADN que usualmente no estarían juntos.
2. La biotecnología está presente en cualquier aplicación tecnológica realizada en organismos vivos, sistemas biológicos o sus derivados con un fin específico. Una característica importante de los procesos biotecnológicos es que son sustentables y amables con el ambiente.
3. Las tecnologías sustentables plantean la obtención de bienes o insumos a partir de recursos renovables.



CUADRO 1 LA BIOTECNOLOGÍA Y SUS APLICACIONES

ESTA DISCIPLINA SE HA SUBDIVIDIDO EN:

- Biotecnología roja, aplicada a procesos médicos, por ejemplo, en el diseño de microorganismos que produzcan antibióticos.
- Biotecnología verde, empleada en la agroindustria, por ejemplo, en el diseño de plantas transgénicas que crezcan bajo condiciones ambientales extremas.
- Biotecnología blanca, utilizada en procesos industriales, por ejemplo, en el diseño de microorganismos que produzcan compuestos químicos como el alcohol carburante.

En este sentido, los residuos agroindustriales representan una fuente renovable de energía, pues se obtienen en cantidades enormes y constituyen una materia prima barata. Además, cualquier residuo agroindustrial puede ser convertido en diversos productos con mayor valor agregado, incluyendo sustitutos de derivados petroquímicos y combustibles (cuadro 2).

BACTERIAS ALCOHÓLICAS: ENERGÍA PARA EL TRANSPORTE

Desde hace más de tres décadas, se ha demostrado la factibilidad tecnológica y práctica de emplear etanol producido por el metabolismo de microorganismos, a partir de azúcar de caña o de almidón de maíz, como combustible para automóviles. En la actualidad, millones de autos circulan usando etanol o mezclas de gasolina-etanol, principalmente en Brasil y los Estados Unidos.

Debido a la enorme cantidad de autotransporte en el mundo, y en particular en nuestro país, se requiere contar con enormes volúmenes de etanol para cubrir la demanda energética, y los residuos agroindustriales son la materia prima más ventajosa.

Escherichia coli es una bacteria que, de forma natural, puede consumir una amplia variedad de azúcares, incluyendo glucosa y xilosa (azúcares muy abundantes en los residuos agroindustriales), a partir de los cuales se producen compuestos como los ácidos acético,⁴ fórmico,⁵ succínico⁶ y pequeñas cantidades de etanol.

Mediante los procesos propios de la ingeniería de vías metabólicas se ha logrado que *E. coli* produzca etanol a partir de la glucosa y xilosa, modificando su funcionamiento. Así se ha logrado, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, producir mayoritariamente etanol a partir de glucosa y xilosa; además, se llevan a cabo estudios que podrán ser base de tecnologías independientes del petróleo, como aquéllos abocados a lograr que esta cepa etanológica de *E. coli* genere etanol

4. Es conocido como vinagre.

5. Es el más simple de los ácidos orgánicos; es relativamente fuerte y de olor irritante. Se encuentra en la saliva de las hormigas y es usado como preservativo y como agente antibacteriano en alimento para ganado.

6. Puede utilizarse como suplemento alimenticio y en la síntesis de productos químicos. Se genera en el proceso de fermentación de algunas bebidas como los vinos.



con mayor velocidad, para obtener procesos competitivos a escala industrial (cuadro 3).

El proceso para producir etanol a partir de residuos agroindustriales requiere un tratamiento previo para romper la celulosa y liberar la glucosa; éste es el paso más costoso e involucra el empleo de celulasas (conjunto de enzimas puras que rompen la celulosa y liberan glucosa) de hongos.

Bacillus subtilis es una bacteria que se encuentra comúnmente en el suelo. En forma tradicional se ha usado para producir enzimas útiles en la manufactura de detergentes biodegradables. En comparación con *E. coli*, tiene la ventaja de sintetizar una gran variedad de enzimas degradativas y transportarlas al exterior celular. Este eficiente sistema de secreción puede ayudar a transportar enzimas (celulasas)

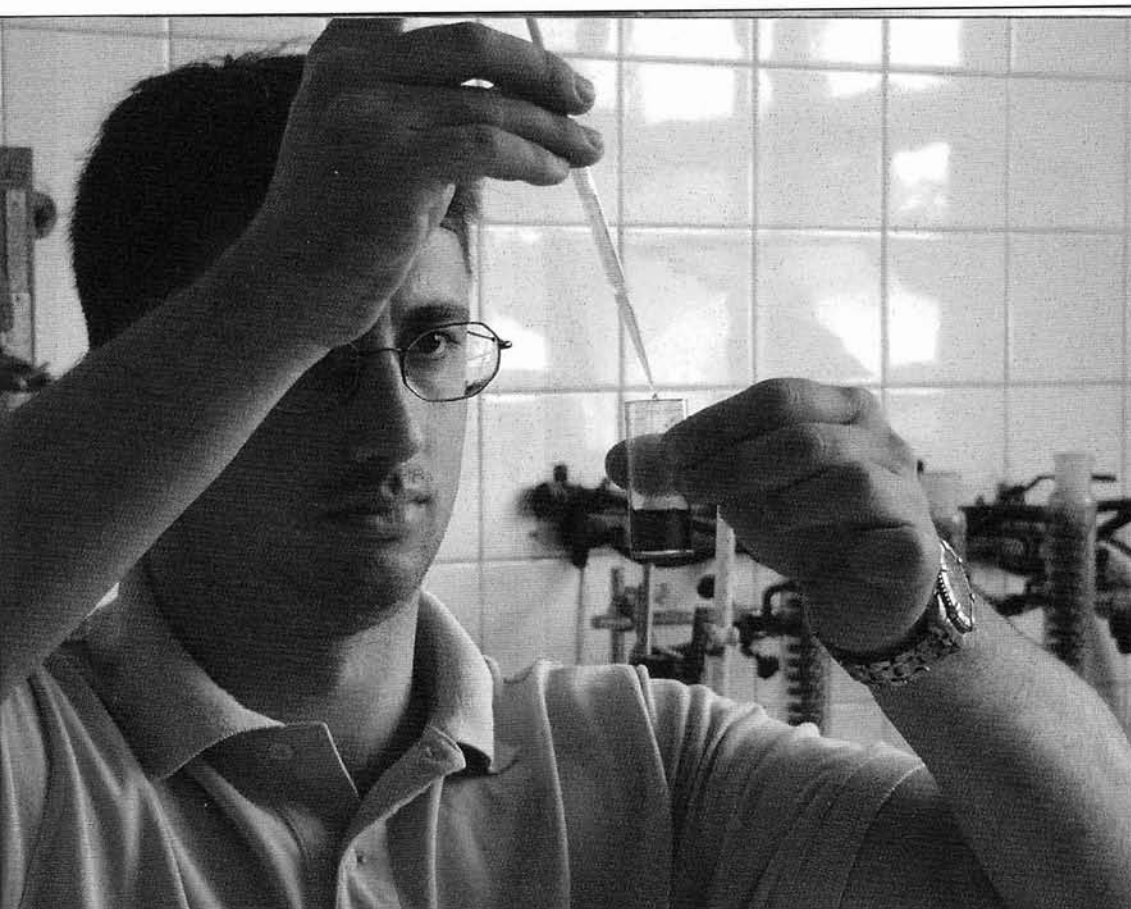
que rompan la celulosa para liberar glucosa y poder aplicarla en la producción de etanol, así se obtendría una nueva tecnología con un bajo costo de producción. Sin embargo, *B. subtilis* es un microorganismo que, de forma natural y en condiciones de fermentación, genera otros compuestos a partir de la glucosa, pero no etanol.

En nuestro instituto se ha logrado obtener una *B. subtilis* que genera etanol como producto

→ La IM procura incidir en la producción de combustibles alternativos a los fósiles que, además de contaminar, no son recursos renovables

CUADRO 2 DESECHOS AGROINDUSTRIALES REUTILIZABLES

Bagazo de caña, cascarilla del arroz, rastrojo y olote de maíz, pastos, desechos de madererías (viruta y aserrín), maderas suaves y duras, papel desechado de oficinas... Todos estos restos pueden ser transformados, mediante procesos químicos y enzimáticos, en azúcares simples de seis (glucosa y manosa) y cinco (xilosa y arabinosa) átomos de carbono, que algunos microorganismos pueden utilizar como alimento y transformarlos en productos útiles.



principal, al modificar su metabolismo por medio de ingeniería de vías metabólicas. La cepa de *B. subtilis* resultante produce etanol a partir de glucosa con rendimientos mayores a 95 por ciento.

PERSPECTIVAS

La ingeniería de vías metabólicas constituye una alternativa para llevar a cabo la transición de nuestra actual dependencia del petróleo hacia una sociedad energéticamente renovable y amable con el medio ambiente. En México se consumen, aproximadamente, 105 millones de litros de gasolina diariamente, esto es equivalente a un consumo per capita de 1 litro de gasolina por día, valor que refleja los tremendos esfuerzos científicos y tecnológicos que deben ser realizados para convertir grandes cantidades de biomasa en etanol carburante. ●

AGRADECIMIENTOS

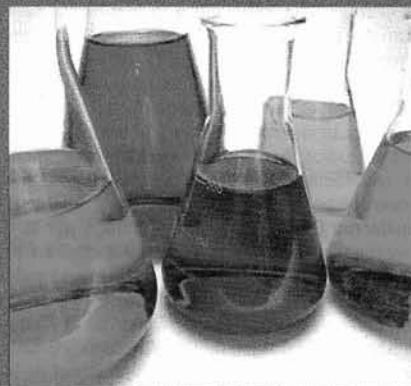
Al financiamiento otorgado a través del Fondo Mixto CONACYT-Estado de Morelos, clave MOR-2004-c02-048. Fondo Sectorial CONACYT-SAGARPA, clave 2004-224; y DGAPA PAPIIT/UNAM-IN220403-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Ingram, L. O., et al. (1999). *Enteric Bacterial Catalyst for Fuel Ethanol Production*. Biotechnology Progress. American Chemical Society, Washington, D C, 15, 855-866, 1999.
- Parris, T. M., et al. (2003). *Characterizing a sustainability transition: Goals, targets, trends, and Driving Forces*. PNAS, USA, 100, 8068-8073.
- Martínez-Jiménez, A., et al. (Julio 2006). ¿Etanol carburante a partir de bagazo de caña? *Claridades Agropecuarias*. Publicación Mensual de la SAGARPA. México, pp. 33-39.

CUADRO 3 CÓMO OBTENER ETANOL A PARTIR DE *E. COLI*

- Tomar los genes que codifican para las enzimas piruvato decarboxilasa y alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* (una de las bacterias que producen el pulque).
- Integrarlos en el genoma de *E. coli* con el objetivo de generar una nueva vía metabólica para la síntesis de etanol, que es más eficiente que la presente originalmente en esta bacteria.
- Eliminar del genoma de *E. coli* las vías metabólicas que producían succínico, fórmico, láctico y acético.
- La *E. coli* resultante produce etanol a partir de glucosa xilosa y arabinosa con altos rendimientos.





Susana Romero García es química farmacéutica-bióloga por la UNAM, maestra en ciencias bioquímicas por el Instituto de Biotecnología (IBt) de la misma institución, donde está por obtener el doctorado en ciencias bioquímicas, en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica de Bacterias; su trabajo está enfocado a la ingeniería de vías metabólicas en *Bacillus subtilis* para producir etanol y L-lactato a partir de xilosa, carbohidrato que es el segundo mayoritario en los residuos agroindustriales.

Montserrat Orencio Trejo es ingeniera bioquímica por la Universidad Autónoma de Coahuila y maestra en ciencias bioquímicas por el IBt-UNAM, donde está por obtener el doctorado en ciencias bioquímicas en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica de Bacterias, el objetivo de sus estudios es generar cepas etanológicas de *Escherichia coli*, así como el estudio de la regulación metabólica de la glucólisis y del metabolismo del piruvato en condiciones anaeróbicas.

Guillermo Gosset Lagarda es biólogo por la Universidad Autónoma de Guadalajara, maestro en investigación biomédica básica y doctor en biotecnología, ambos por el IBt - UNAM. Desde hace 20 años labora en el IBt, donde es Investigador Titular B. Es autor y coautor de más de cuarenta publicaciones indexadas. Su línea de investigación es la ingeniería de vías metabólicas de bacterias con énfasis en productos derivados de la vía de síntesis de compuestos aromáticos. Es miembro de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, de la Sociedad de Microbiología de los EUA y de la Sociedad de Microbiología Industrial de los EUA, así como del SNI, nivel II.

Alfredo Martínez Jiménez es ingeniero bioquímico por la UAM-I, maestro y doctor en biotecnología por el IBt - UNAM. Desde hace 22 años labora en el IBt, donde actualmente es Investigador Titular B. Es autor y coautor de más de cuarenta publicaciones indexadas, en las áreas de biotecnología y bioingeniería. Su línea de investigación actual es la ingeniería de vías metabólicas de bacterias con énfasis en etanol carburante y lactatos ópticamente puros a partir de residuos agroindustriales. Miembro de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, Red Mexicana de Bioenergía, Sociedad de Microbiología de los EUA y de la Sociedad de Microbiología Industrial de los EUA, así como del SNI, nivel I.

QUADRATO

DISEÑO Y DESARROLLO DE PÁGINAS Y APLICACIONES WEB

Diseño y desarrollo de aplicaciones para Internet
Diseño y desarrollo de Sitios o Páginas Web
Rediseño de Sitios o Páginas Web
Mantenimiento de Sitios Web
Hospedaje Web
Herramienta Anti-Spam y Anti-Virus (Postini Partner)
Creación de CD o DVD interactivo
Diseño y envío de boletines electrónicos masivos (e-mailing)
Optimización de Sitios Web para su registro en buscadores

Apéndice D. Producción de compuestos aromáticos con importancia industrial: Una aplicación de la ingeniería de vías metabólicas en bacterias.

COMPUESTOS AROMÁTICOS E INGENIERÍA METABÓLICA EN BACTERIAS

Susana Romero G., Montserrat Orencio T.,
Alfredo Martínez J. y Guillermo Gosset L.

La ingeniería metabólica en el campo industrial se aplica para la modificación de microorganismos que producen compuestos importantes para el ser humano; la finalidad es lograr procesos más amigables con el medio ambiente.

En los últimos años, han ocurrido avances científicos importantes en el área de la **biología molecular**. Esta es una parte de la biología que se encarga del estudio de las moléculas que conforman a los seres vivos. Así mismo, el conocimiento sobre el funcionamiento de los seres vivos se ha incrementado considerablemente, al poderse conocer la información contenida en su material genético. Adicionalmente, a partir de la biología molecular, se desarrolló la ingeniería genética, la cual consiste en una serie de métodos que permiten la modificación directa del material genético. Las herramientas de la ingeniería genética permiten aislar material genético de cualquier organismo, modificarlo fuera de éste y posteriormente introducirlo al mismo organismo o a otro y con esto modificar sus propiedades. Todo este cúmulo de conocimiento y de metodologías contribuyeron al surgimiento de la ingeniería de vías metabólicas o ingeniería metabólica, en la década de los noventa. Esta se trata de una rama de la biotecnología abocada a la modificación y/o introducción de nuevas reacciones bioquímicas en el metabolismo de algún microorganismo, mediante la aplicación de la ingeniería genética.

El metabolismo de las bacterias

Metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas necesarias para: transformar químicamente los nutrientes en las moléculas que formarán parte de una

célula, obtener la energía bioquímica necesaria y mantener la integridad celular de cualquier microorganismo. Los compuestos químicos que son transformados y conforman el metabolismo se llaman metabolitos. Para su estudio, el metabolismo puede dividirse de acuerdo a su función en la célula. El llamado metabolismo central es el conjunto de reacciones que pueden transformar un azúcar como la glucosa en otras moléculas que serán precursoras de todos los componentes celulares.

Las reacciones bioquímicas son llevadas a cabo por enzimas, las cuales son proteínas con capacidad para funcionar como catalizadores; así, varias reacciones enzimáticas generan una vía metabólica, dando como resultado la transformación de la materia prima en diferentes productos metabólicos; por ello, al practicar ingeniería de vías metabólicas en algún organismo, cada una de estas reacciones puede ser blanco de modificación.

Tipos de modificaciones

Al emplear las herramientas de la ingeniería genética es posible modificar los genes y conseguir aumentar o disminuir el nivel de uno o varios de los catalizadores biológicos (las enzimas) que controlan el destino de los metabolitos dentro de la célula. Realizando este tipo de cambios es posible alterar el metabolismo de un microorganismo y mejorarlo como productor de algún compuesto químico. Entre las mejoras que se puede obtener destacan:

- Eliminar o reducir la formación de productos no deseados, para obtener productos únicos o mayoritarios.

La producción de ácido acético es una característica no deseable ya que este metabolito es tóxico para los microorganismos. Mediante la inactivación de alguno de los genes de la vía de síntesis de ácido acético, ha sido posible eliminar la producción de este compuesto.

- Obtener sustancias que antes no generaba una bacteria usando vías metabólicas que existen en otros microorganismos.

La introducción de genes de la bacteria *Pseudomonas* a otra bacteria llamada *Escherichia coli*, ocasionó que esta última ahora lograra la síntesis del colorante industrial llamado índigo.

- Aumentar el número de diferentes materias primas que pueda usar una bacteria para crecer.

La modificación del sistema de transporte de glucosa ha permitido que la bacteria *Bacillus subtilis* que no podía consumir el azúcar xilosa, ahora pueda hacerlo de forma eficiente y simultanea con la glucosa.

- Incrementar la cantidad producida de un compuesto y lograrlo en un menor tiempo. Mediante la eliminación de vías que compiten por el substrato común corismato, ha sido posible incrementar la productividad en la síntesis del aminoácido tirosina.

Compuestos aromáticos a partir de bacterias modificadas

Los compuestos aromáticos conforman un grupo amplio de moléculas orgánicas que contienen anillos cerrados de átomos de carbono. El benceno es un ejemplo de un compuesto aromático, a partir de éste, mediante transformaciones químicas se pueden originar muchas otras moléculas aromáticas. Un número importante de los compuestos químicos producidos industrialmente son de tipo aromático, entre ellos se encuentran conservadores de alimentos, perfumes, colorantes, entre otros. Los métodos químicos tradicionales para producir los compuestos aromáticos incluyen la utilización de disolventes como el benceno, el tolueno y el xileno, provenientes de fuentes no renovables como el petróleo, por lo que pueden ser costosos, además de generar problemas de contaminación. Debido a esto, es deseable contar con tecnologías alternas que no sean dependientes de dicho hidrocarburo y más amigables con el medio ambiente.

Por otro lado, la mayoría de las bacterias tiene la capacidad natural de sintetizar algunos compuestos aromáticos, entre ellos, los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina¹ y triptófano, lo cual abre la posibilidad de aplicar la **ingeniería metabólica** para incrementar la capacidad de síntesis de este tipo de compuestos y generar tecnologías sustentables para producirlos.

Por ejemplo, con la aplicación de la ingeniería metabólica, ha sido posible modificar la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) para convertirla en productora de fenilalanina, empleando el azúcar glucosa como materia prima. A su vez, la fenilalanina puede ser convertida en:

- 2-feniletanol (2-PE), un compuesto con olor de rosa, empleado en la industria de los alimentos y en la fabricación de perfumes y cosméticos. Su producción mundial se estima en 7 mil toneladas al año.
- Aspartamo, un edulcorante potente, de 160 a 180 veces más dulce que el azúcar (sacarosa). Su producción anual es de aproximadamente 11 mil toneladas y es adicionado en bajas cantidades como edulcorante a los alimentos de bajo contenido calórico o *light*. Abarca un amplio mercado internacional y sus ventas anuales son estimadas en 1,500 millones de dólares estadounidenses.

Otro compuesto aromático de importancia industrial es el triptófano, a partir del cual, se puede sintetizar el *indol* (precursor del azul índigo), colorante para telas, derivado del petróleo, muy usado en la mezclilla, cuya producción anual se calcula en 13 mil toneladas. En contraposición, investigaciones recientes en el terreno de la ingeniería metabólica han permitido generar cepas modificadas de la bacteria *E. coli* con capacidad para sintetizar índigo a partir de glucosa.

Investigaciones pro ambientales

En el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM se realizan estudios para que microorganismos modificados por ingeniería metabólica puedan convertir eficientemente azúcares como la glucosa, en aminoácidos aromáticos.

Se han obtenido cepas modificadas de *E. coli* con la capacidad de reproducir los compuestos aromáticos: fenilalanina, tirosina, antranilato, catecol y melanina.² El antranilato y el catecol son compuestos empleados como materia prima para la síntesis química de fármacos, saborizantes y colorantes. La estrategia empleada para generar las cepas modificadas se basa principalmente en eliminar pasos de regulación³ que no

permiten la conversión de un compuesto en otro de interés, pero con el uso de técnicas de ingeniería genética ha sido posible generar bacterias no sujetas a esta regla, con lo cual se obtiene mayor actividad de las enzimas de la vía metabólica de interés para lograr que la célula sintetice gran cantidad de un metabolito en particular.

Siguiendo estrategias de ingeniería metabólica se han generado bacterias productoras de melanina, lo cual se logró introduciendo a la bacteria *E. coli* el gen denominado *melA*, proveniente de la bacteria del suelo *Rhizobium etli* (dicho gen contiene la información genética para que se sintetice la enzima tirosinasa, encargada de convertir el aminoácido tirosina en el polímero melanina).

Como resultado, la bacteria *E. coli* que alberga el gen *melA*, ahora puede producir melanina; primer paso hacia la generación de una tecnología biológica para la producción de melaninas con aplicaciones médicas y cosméticas.

Perspectivas

Los ejemplos citados, ilustran cómo la ingeniería de vías metabólicas constituye una de las herramientas que permitirá sustituir nuestra actual dependencia del petróleo con el fin de transitar hacia nuestra conversión en una sociedad con tecnologías renovables y amables con el medio ambiente. A pesar de los avances logrados, todavía falta mucho camino por recorrer para llegar a crear una base industrial totalmente sustentable, uno de los mayores retos que enfrenta nuestra sociedad, pero también una de las grandes oportunidades para aplicar la ciencia y la tecnología al mejoramiento del ambiente y la optimización en la calidad de vida.

Agradecimientos

Al financiamiento otorgado a través del Fondo Mixto Conacyt – Estado de Morelos; Fondo Sectorial CONACYT - SAGARPA Y DGAPA PAPIIT/UNAM.

Glosario

Biología molecular. Conjunto de técnicas que permiten el estudio de las moléculas que contienen información en la célula.

Biotecnología. Es la generación de bienes y servicios empleando células vivas o sus componentes.

Ingeniería genética. Conjunto de métodos y técnicas moleculares empleadas para modificar *in vitro* el material genético de los organismos.

Secuencia nucleotídica. Determina el orden de las unidades que conforman polímeros como el ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta información permite identificar a genes y deducir las proteínas codificadas por éstos.

(Notas a pie de página)

1. El aminoácido aromático tirosina es una materia prima para la síntesis de L-DOPA, el fármaco más eficaz disponible actualmente para el tratamiento del mal de Parkinson, además de ser precursor de la melanina, la cual es un polímero de color negro, empleado como protector solar en algunas lociones bronceadoras.
2. La melanina es un pigmento natural que da color a la piel y cabello, entre otros, además de constituir un sistema de protección contra la radiación ultravioleta del sol.
3. Normalmente, la célula sólo produce la cantidad necesaria de compuestos aromáticos que requiere para su crecimiento.

Bibliografía

- G. Gosset y F. Bolívar. (2004). "Ingeniería celular microbiana", *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. F. Bolívar (compilador y editor). El Colegio Nacional, México. Pág. 219 - 248.
- Báez, Viveros J. L., *et.al.* (2004). "Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized from Glucose in Escherichia Coli". *Biotechnology & Bioengineering*, 87:516-524.
- Lagunas, Muñoz V. H., *et. al.* (2006). "Optimum Melanin Production Using Recombinant Escherichia Coli". *Journal of Applied Microbiology*, 101:1002-1008.

Susana Romero García es química fármaco bióloga por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), maestra en ciencias bioquímicas por el Instituto de Biotecnología (IBt) de la misma casa de estudios, donde está por obtener el doctorado en ciencias bioquímicas, en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica de Bacterias.

Montserrat Orencio Trejo es ingeniera bioquímica por la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, maestra en ciencias bioquímicas por el IBt-UNAM, donde está por obtener el doctorado en ciencias bioquímicas, en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica de Bacterias.

Alfredo Martínez Jiménez es ingeniero bioquímico por la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, maestro y doctor en biotecnología por el IBt – UNAM, donde actualmente es investigador titular. Es miembro de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, de la Red Mexicana de Bioenergía, de la Sociedad de Microbiología de los Estados Unidos (EUA) y de la Sociedad de Microbiología Industrial de EUA, así como del SNI nivel II.

Guillermo Gosset Lagarda es biólogo por la Universidad Autónoma de Guadalajara, maestro en investigación biomédica básica y doctor en biotecnología. Es investigador titular en el IBt – UNAM, miembro de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, de la Sociedad de Microbiología de los Estados Unidos (EUA) y de la Sociedad de Microbiología Industrial EUA, así como del SNI nivel II.