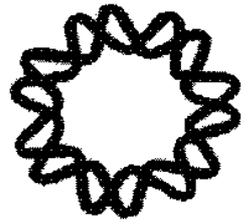




**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



*Modificación del metabolismo central de carbono mediante  
la introducción de la vía de Entner-Doudoroff de  
Zymomonas mobilis en Escherichia coli etanológica*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M.C. Gerardo Huerta Beristain**

Cuernavaca, Morelos.

Junio, 2009.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez.**

**Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) beca CONACYT No. 184699a y el proyecto: EDO. DE MORELOS - 2004-C02-048; y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, proyecto PAPIIT IN220908.**

**DIRECTOR DE PROYECTO:**

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

**COMITE TUTORAL:**

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dr. Jordi Folch Mallol

Dr. Guillermo Gosset Lagarda (Invitado)

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente:** Dr. Edmundo Calva Mercado

**Secretario:** Dr. Leobardo Serrano Carreón

**Vocal:** Dr. Rafael Moreno Sánchez

**Suplente:** Dr. Mario Soberon Chávez

**Suplente:** Dr. Alfredo Martínez Jiménez

## **DEDICO ESTE TRABAJO:**

*A mis padres:*

*Guadalupe Beristain Montero y Feliciano Huerta Rojas. Por su cariño, confianza y apoyo incondicional, sobretodo por darme una educación fundada en el amor, el respeto y el trabajo.*

*A mi esposa: Daysi Navez González*

*De manera muy especial te dedico este esfuerzo académico. Gracias por ser mi compañera inseparable en todo momento. Por todo tu apoyo incondicional y tu motivación para ser mejor. Para ti de corazón, todo mi amor, respeto y cariño.*

*A Nikté y Canek Gerardo*

*Por ser lo más grande y valioso que me ha dado la vida, por ser mi motivación para seguir alcanzando metas. Desde su llegada, mi vida ha cambiado y hoy que los tengo a mi lado me hacen el padre más feliz del mundo, los amo con todo mi corazón, siempre estaré a su lado...*

*A mis hermanos:*

*José Alberto, Catalina, Esperanza, Dolores, Ventura, Gaudencio y María del Carmen. Por estar siempre conmigo, por los momentos que compartimos, por brindarme su amistad incondicional y confiar siempre en mi.*

*A mis sobrinos: Estela Sarai, Jose Luis, Jose Raul, Lina Arelly, Heidy, Carolina, Luis Angel, Ana Karen y Alejandro*

*A mis abuelos: en especial a Bernardo Beristain Méndez † y Juana Montero Rosas †.*

*Y sobre todo a... DIOS*

## **AGRADEZCO:**

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, por contribuir en gran medida a mi formación académica y humana. Así como por la oportunidad que me dio para trabajar en su grupo, involucrándome en este campo tan interesante que se denomina Ingeniería metabólica.

### **A mi comité tutorial:**

Dr. Agustín López Munguía Canales, Dr. Jordi Folch Mallol, Dr. Guillermo Gosset Lagarda y Dr. Alfredo Martínez Jiménez. Por su valiosa participación con sus críticas y sugerencias durante el desarrollo de este proyecto, mediante los exámenes tutorales.

A Mercedes Enzaldo, pilar importante en el desarrollo de muchos trabajos; ejemplo de trabajo y dedicación.

A Georgina Hernández Chávez, por el apoyo técnico en el análisis de las muestras por HPLC. A la Dra. Verónica Hernández Montalvo por su apoyo con los plásmidos pGALP<sub>Ec</sub> y pvG1kGalP54 para el desarrollo de mi trabajo.

A todos los compañeros de laboratorio Bolívar-Gosset-Martínez. Por los buenos momentos y el apoyo en mi trabajo, que han hecho mi estancia en el laboratorio muy placentera;

A mis amigos, solo ustedes saben quienes son, y todos aquellos que de alguna u otra manera contribuyeron en el desarrollo de este trabajo.

Mil Gracias.

## ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE FIGURAS. ....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
NOMENCLATURA.....	xii
1.-RESUMEN .....	1
2 ABSTRACT .....	3
3 INTRODUCCIÓN .....	5
3.1 Importancia de la producción de etanol .....	5
3.2 Ingeniería Metabólica .....	5
3.3 Metabolismo central del carbono en <i>E. coli</i> .....	6
3.4 Planteamiento de modificación del metabolismo central para incrementar el flujo de carbono hacia la formación de etanol .....	7
4.- ANTECEDENTES.....	10
4.1 Fisiología y Biología molecular de <i>Escherichia coli</i> .....	10
4.2. Transporte de glucosa:.....	10
4.2.1 Sistema PTS.....	10
4.2.2 Sistema GAL P-GLK.....	11
4.3 Vía glucolítica .....	11
4.3.1 Mutantes en el gen <i>pgi</i> .....	12
4.4 Vía de las pentosas fosfato .....	12
4.5 Vía de Entner-Doudoroff y su regulación.....	13
4.5.1 De <i>Escherichia coli</i> .....	13
4.5.2 De <i>Zymomonas mobilis</i> .....	14
4.6 Aplicaciones de la ingeniería de vías metabólicas en bacterias. ....	15
4.7 Flux de formación de etanol.....	17
4.8 <i>Escherichia coli</i> etanológica KO11 .....	17
4.9 Efecto de la carga metabólica.....	18
5.- HIPÓTESIS .....	19
6.- OBJETIVOS.....	20
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	20

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
7.- METODOLOGÍA.....	21
7.1 Microorganismos, plásmidos y oligos.....	21
7.2 Condiciones y medios de cultivo.....	24
7.2.1 Inóculos para cultivos.....	24
7.2.2 Medios de cultivo.....	24
7.2.3 Condiciones de cultivo.....	25
7.3 Métodos analíticos.....	26
7.3.1 Concentración celular.....	26
7.3.2 Determinación de azúcares y ácidos orgánicos.....	26
7.3.3 Determinación de etanol.....	27
7.3.4 Determinación actividades enzimáticas y de proteínas.....	27
7.4 Evaluación de parámetros.....	28
7.5 Cálculo de fluxes y balance de carbono.....	28
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
8.1 PRIMERA ETAPA: Identificación y caracterización de los pasos enzimáticos limitantes de la glucólisis y la vía de síntesis de etanol en <i>E. coli</i> KO11.....	30
8.1.1 Introducción.....	30
8.1.2 Resumen de resultados y discusión.....	31
8.1.3 Presentación de manuscrito.....	34
8.2 SEGUNDA ETAPA: Papel de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa homóloga ( $ZWF_{Ec}$ ) o heteróloga ( $ZWF_{Zm}$ ) sobre el efecto de carga metabólica en <i>E. coli</i> JM101.....	44
8.2.1 Introducción.....	44
8.2.2 Resumen de resultados y discusión.....	45
8.2.3 Recuperación de la velocidad específica de crecimiento de <i>E. coli</i> <i>pgi</i> por incremento de los niveles de $ZWF_{Ec}$ ó $ZWF_{Zm}$ junto con $GALP_{Ec}$ y $GLK_{Ec}$ .....	47
8.3 TERCERA ETAPA: Caracterización del metabolismo y fisiología de KO11 <i>pgi</i> y derivadas evolucionadas y modificadas para obtener una cepa	

homoetanológica que cataboliza la glucosa por la vía de Entner-Doudoroff.....	50
8.3.1 Construcción de la cepa KO11 <i>pgi</i> .....	50
8.3.2 Evaluación de KO11 <i>pgi</i> y KO11 en medio mineral .....	51
8.3.3 Construcción del plásmido pZEA <sub>Zm</sub> .....	52
8.3.4 Efecto de la sobreexpresión de <i>zwf<sub>Zm</sub></i> , <i>edd<sub>Zm</sub></i> y <i>eda<sub>Zm</sub></i> en la cepa KO11 <i>pgi</i> .....	54
8.3.5 Evolución adaptativa de KO11 <i>pgi</i> en cultivos no aireados .....	55
8.3.6 Caracterización de la cepa KO11 <i>pgi</i> - E35. ....	56
8.3.7 Efecto del incremento del nivel de ZWF <sub>Zm</sub> o ZWF <sub>Zm</sub> EDD <sub>Zm</sub> y EDA <sub>Zm</sub> junto con GALP <sub>Ec</sub> y GLK <sub>Ec</sub> en KO11 E35.....	59
8.4 Construcción de una cepa homoetanológica. ....	62
8.4.1 Caracterización de la cepa homoetanológica KO11 PPAL <sup>-</sup> .....	62
8.5.2 Caracterización del incremento del nivel de ZWF <sub>Zm</sub> o ZWF <sub>Zm</sub> EDD <sub>Zm</sub> y EDA <sub>Zm</sub> junto con GALP <sub>Ec</sub> y GLK <sub>Ec</sub> en KO11 PPAL <sup>-</sup> .....	65
8.5.3 Efecto del incremento del nivel de actividad de PDC <sub>Zm</sub> y ADH <sub>Zm</sub> en KO11 PPAL <sup>-</sup> .....	68
8.5.4 Análisis de la distribución de flujos de carbono.....	69
8.6 Efecto sobre el rendimiento de conversión de glucosa en etanol.....	70
9.- CONCLUSIONES .....	73
10.- PERSPECTIVAS .....	75
11.- REFERENCIAS .....	76
12. ANEXOS.....	84
Anexo A. Presentación del manuscrito .....	84
Anexo B. Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar, producción de etanol y ácidos orgánicos. ....	106
Anexo C. Ensayos enzimáticos .....	113

## ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 3.1.** Vías del metabolismo central de *E. coli*. Vía de Embden-Meyerhoff-Parnas, de las Pentosas fosfato, de Entner-Doudoroff, de ácidos tricarbónicos y del glioxalato. Las líneas gruesas representan la vía heteróloga de síntesis de etanol, presente en *E. coli* KO11 ..... 8
- Figura 7.1.** Sistema de Minifermentadores o Fleakers. .... 25
- Figura 8.1.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), (A) y actividad enzimática de ZWF (B) en la cepa transformante SM14/pZWF<sub>Ec</sub>-pvGlkGalP54 con diferentes concentraciones de IPTG. Las cepas JM101, SM14 y SM14/pTrc99A-pCL1920 son controles. .... 47
- Figura 8.2.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), y actividad enzimática de ZWF en la cepa SM14/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 con diferentes concentraciones de IPTG. Las cepas SM14 y SM14/pTrc99A-pCL1920 son controles. .... 48
- Figura 8.3.** Patrón de restricción del PCR obtenido a partir de ADN cromosomal de KO11 ó KO11 *pgi*. carriles de izquierda a derecha. Carril 1, marcador 1 kb. Digestiones con Digestiones con *Nco*I.; líneas 2 y 3, KO11; líneas 4 y 5, KO11 *pgi*. Digestiones con *Kpn*I.; líneas 6 y 7, KO11; líneas 8 y 9, KO11 *pgi*. .... 50
- Figura 8.4.** Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar y producción de etanol de *E. coli* KO11 y KO11*pgi*, condiciones no aireadas, medio mineral (M9)-4% glucosa. Símbolos  $\circ$  KO11 *pgi*,  $\bullet$  KO11. .... 52
- Figura 8.5.** Mapa del plásmido pZEA<sub>Zm</sub>, con los genes *zwf*, *edd* y *eda* de *Z. mobilis* bajo regulación del promotor *trc* inducible por IPTG. .... 53
- Figura 8.6.** Actividad enzimática de la vía de Entner-Doudoroff, en las cepas KO11 *pgi*- y KO11 *pgi*-/pZEA<sub>Zm</sub>, en cultivos sin IPTG y con 100  $\mu$ M de IPTG (+I). La cepa KO11 se uso como control. .... 54
- Figura 8.7.** Crecimiento de KO11 *pgi* y poblaciones derivadas sometida a evolución adaptativa en condiciones anaeróbicas en M9 con 4% glucosa. Cada transferencia indicada por cada línea fue realizada cuando los cultivos alcanzaban una DO<sub>600nm</sub> alrededor de 1.0 (0.37 g/L biomasa) ó cada 24 horas. .... 55
- Figura 8.8.** Parámetros cinéticos de fermentación de la cepa KO11 E35/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 y KO11 E35/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 con 0 y 50  $\mu$ M de IPTG crecidas en medio mínimo M9, glucosa 40 g/L. KO11 *pgi*, KO11 E35 y KO11 E35 /pTrc99A-pCL1920 son controles ..... 60
- Figura 8.9.** Parámetros cinéticos de cultivo de KO11 PPAL-/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 y KO11 PPAL-/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 durante la fase exponencial (gráficas izquierda) y estacionaria (gráficas derecha), en medio mínimo M9, glucosa 40 g/L y 50  $\mu$ M de IPTG en condiciones no aireadas. KO11 E35 y KO11 PPAL- fueron controles. .... 65

**Figura 8.10.** Resultados del efecto de la sobreexpresión de *pd<sub>cz<sub>m</sub></sub>* y *adh<sub>B<sub>zm</sub></sub>* en KO11 PPAL<sup>-</sup>, durante la fase de crecimiento. KO11 y KO11 PPAL<sup>-</sup> fueron los controles. .... 68

**Figura 8.11.** Distribución del flujo de carbono para KO11 y KO11 PPAL<sup>-</sup> y KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510 en fase estacionaria. Los datos de flujos de carbono estan dados en porcentaje, en base a las velocidades volumetricas de consumo de azucar y formación de productos en mmol<sub>Carbono</sub>/L/h. .... 70

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 4.1.</b> Balance redox y energético de <i>E. coli</i> , usando la vía glucolítica o la vía de Entner-Doudoroff para catabolismo de glucosa, en condiciones anaeróbicas.....	15
<b>Tabla 7.1.</b> Microorganismos empleados en este trabajo. ....	21
<b>Tabla 7.2.</b> Plásmidos empleados en este trabajo. ....	21
<b>Tabla 7.3.</b> Oligos diseñados y usados en este trabajo. ....	23
<b>Tabla 8.1.</b> Parámetros cinéticos de fermentación, durante la fase de crecimiento exponencial de KO11 <i>pgi</i> <sup>-</sup> y KO11 E35; en comparación con la cepa KO11. ....	56
<b>Tabla 8.2.</b> Actividades enzimáticas específicas (en UI/mg <sub>PROT</sub> ) en las cepas KO11, KO11 <i>pgi</i> <sup>-</sup> y KO11 E35. ....	58
<b>Tabla 8.3.</b> Parámetros cinéticos de cultivos de KO11 E35 y KO11 PPAL <sup>-</sup> . La cepa KO11 se usó con fines de comparación. ND, Datos no determinados.....	62
<b>Tabla 8.4.</b> Comparación de los niveles de diferentes actividades enzimáticas en las cepas KO11, KO11 E35 y KO11 PAPL <sup>-</sup> . ....	63
<b>Tabla 8.5.</b> Actividades enzimáticas en las cepas KO11 PPAL <sup>-</sup> /pZWF <sub>Zm</sub> -pvGlcGalP54 y KO11 PPAL <sup>-</sup> /pZEA <sub>Zm</sub> -pvGlcGalP54, en cultivos en medio M9 suplementados con 40 g/l de glucosa, 50 μM de IPTG en condiciones no aireadas. KO11 PAPL <sup>-</sup> fue utilizada como control. ....	67
<b>Tabla 8.6.</b> Rendimiento de conversión de glucosa en etanol respecto al teórico en la cepa KO11 y sus derivadas. Los datos mostrados son el promedio de dos experimentos, con su respectivo error estándar .....	71

## NOMENCLATURA.

### GENERALES

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
Amp <sup>R</sup>	Resistente a Ampicilina
<i>cat</i>	Gen que codifica para la enzima cloramfenicol acetiltransferasa
Cm <sup>R</sup>	Resistente a Cloramfenicol
DO <sub>nm</sub>	Densidad óptica a determinada longitud de onda
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en ingles: High Performance Liquid Chromatography)
IPTG	Inductor gratuito de la expresión del operón de lactosa (isopropil β-D-tiogalactopiranosido)
KOH	Hidróxido de potasio
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
P	Promotor o Producto
p	Plásmido
PTS	Sistema de la fosfotransferasa
S	Sustrato, fuente de carbono, azúcares: glucosa o xilosa
<i>trc</i>	promotor híbrido que contiene la región regulatoria -35 de <i>trp</i> (TTGACA) y la región correspondiente a la caja -10 del promotor <i>lacUV<sub>5</sub></i> (TATAAT)
TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
::	Inserción
Δ	Eliminación

## ENZIMAS Y GENES

<b>Enzima</b>	<b>Gen</b>	<b>Definición</b>
ACK	<i>ack</i>	Acetatocinasa
ACN	<i>acn</i>	Aconitasa
ADH y ADH II	<i>adh</i> y <i>adhB</i>	Alcohol deshidrogenasa homóloga y heteróloga
ALDH	<i>aldh</i>	Acetaldehído deshidrogenasa
EDA	<i>eda</i>	2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa
EDD	<i>edd</i>	6-fosfogluconato deshidratasa
ENO	<i>eno</i>	Enolasa
FBA	<i>fbaA</i>	Fructosa-1,6-bis-fosfato aldolasa
FRD	<i>frd</i>	Fumarato reductasa
FUM	<i>fum</i>	Fumarasa
GALP	<i>galP</i>	Galactosa permeasa
GAPDH	<i>gapdh</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLK	<i>glk</i>	Glucocinasa
GLT	<i>glt</i>	Citrato sintasa
GND	<i>gnd</i>	Gluconato deshidrogenasa
IDH	<i>icd</i>	Isocitrato deshidrogenasa
LDH	<i>ldh</i>	Lactato deshidrogenasa
MDH	<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa
PDC	<i>pdh</i>	Piruvato decarboxilasa
PDH	<i>pdh</i>	Piruvato deshidrogenasa
PFK	<i>pfk</i>	Fosfofructo cinasa
PFL	<i>pfl</i>	Piruvato formato liasa
PGI	<i>pgi</i>	Fosfoglucosa isomerasa
PGK	<i>pgk</i>	Fosfoglicerato cinasa
PGL	<i>pgl</i>	Fosfogluconolactonasa
PGM	<i>yip</i>	Fosfogliceratomutasa
PTA	<i>pta</i>	Fosfotransacetilasa
PYK	<i>pykA, pykF</i>	Piruvato cinasas
RPE	<i>rpe</i>	Ribosafosfato epimerasa
RPI	<i>rpi</i>	Ribosafosfato isomerasa
SDH	<i>sdhABCD</i>	Succinato deshidrogenasa
SUC A	<i>sucA</i>	oxoglutarato deshidrogenasa
SUC CD	<i>sucCD</i>	Succinato tiocinasa
TAL	<i>talAB</i>	Transaldolasa
TKT	<i>tktAB</i>	Transcetolasa
TPI	<i>tpiA</i>	Triosafosfato isomerasa
ZWF	<i>zwf</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

## METABOLITOS

Metabolito	Definición
AcAld	Acetaldehído
AcCoA	Acetoacetil coenzima A
ADP	Adenosin difosfato
AMP	Adenosin monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
CoA	Coenzima A
CO <sub>2</sub>	Bioxido de carbono
DHAP	Deoxiarabinoheptulosonato-7-fosfato
E-4-P	Eritrosa-4-fosfato
EtOH	Etanol
FAD <sup>+</sup>	Flavin-adenin dinucleotido oxidado
FADH <sub>2</sub>	Flavin-adenin dinucleotido reducido
F-6-P	Fructosa-6-fosfato
F-1,6-BP	Fructosa-1,6-bifosfato
G-3-P	Gliceraldehído-3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
GDP	Guanina difosfato
Glc	Glucosa
GTP	Guanina trifosfato
H <sub>2</sub> O	Agua
KDPG	2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato
NAD <sup>+</sup>	Nicotin-adenin dinucleotido oxidado
NADH	Nicotin-adenin dinucleotido reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotin-adenin dinucleotido fosfato oxidado
NADPH	Nicotin-adenin dinucleotido fosfato reducido
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Fosfato inorgánico
RIBU-5-P	Ribulosa-5-fosfato
S-7-P	Sedoheptulosa-7-fosfato
XILU-5-P	Xilulosa-5-fosfato

## PARÁMETROS DE CULTIVO

Símbolo	Definición	Unidades
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento.	$h^{-1}$
X	Biomasa: en gramos de peso seco por litro.	$g_{DCW}/L$
$q_P$	Flux (velocidad específica) de formación de producto.	$g_P/g_{DCW}.h$
$Q_P$	Flux (velocidad volumétrica) de formación de producto.	$g_S/L .h$
$q_S$	Flux (velocidad específica) de consumo de sustrato.	$g_S/g_{DCW} .h$
$q_{KOH}$	Velocidad específica de adición de KOH	$ml_{KOH}/g_{DCW} .h$
UI	Unidades internacionales de actividad enzimática	$\mu moles_{SUSTRATO} /min$
$X_{MAX}$	Biomasa máxima alcanzada durante la fase de crecimiento exponencial.	$g_{DCW}/L$
$Y_{P/X}$	Rendimiento producto / biomasa.	$g_P/g_x$
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa / sustrato.	$g_{DCW}/g_S$
$Y_{P/S}$	Rendimiento producto / sustrato.	$g_P/g_S$

## SUBINDICES

<i>Bs</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
Glc	Glucosa
<i>Zm</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>

---

## 1.-RESUMEN

La ingeniería metabólica en bacterias se emplea para incrementar el flujo metabólico o la productividad de metabolitos de interés, usando estrategias como: la sobreexpresión de genes específicos, redirigiendo el flujo de carbono hacia vías deseadas o inactivando otras. Como primera etapa, en este trabajo, *E. coli* etanologénica fue modificada metabólicamente para evaluar el efecto sobre la productividad y el rendimiento de etanol, incrementando la actividad de enzimas clave del metabolismo central de carbono, en cultivos en medio mineral con glucosa o xilosa como fuente de carbono. Se encontró que la vía heteróloga de formación de etanol limita el flujo de carbono de glucosa o xilosa a etanol.

Por otro lado, *E. coli* ha sido la célula hospedera mas usada para sobreexpresar genes homólogos y heterólogos, con el objetivo de incrementar la producción de proteínas y metabolitos específicos usando plásmidos multicopia. Estas estrategias reducen la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) como consecuencia de un fenómeno de carga metabólica: incremento en la demanda de nucleótidos, energía e intermediarios de síntesis de aminoácidos. En este trabajo encontramos que la reducción en  $\mu$  en *E. coli* es contrarrestada mediante incrementos de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* (*ZWF<sub>zm</sub>*), debido a que ocasiona un aumento de precursores metabólicos a partir de la vía de las pentosas fosfato, un mayor nivel en la relación NADH/NAD<sup>+</sup> y se evita el incremento en la relación NADPH/NADP<sup>+</sup>. En una cepa interrumpida en la glucólisis, en el gene que codifica para la fosfoglucosa isomerasa (*E. coli* JM101 *pgi*), la  $\mu$  también se ve afectada drásticamente. De igual forma, la expresión simultánea de un transportador inespecífico de galactosa-glucosa (*galP*) y la glucocinasa (*glk*), junto con *zwf<sub>zm</sub>* permitió recuperar la velocidad de crecimiento en un 67% con respecto a la cepa silvestre sin inactivación en *pgi*.

Partiendo de la cepa etanologénica de *E. coli* KO11 (*E. coli* W *pfl::pdc adhB cat, Δfrd*), se modificó su metabolismo para evaluar la redistribución del

flujo de carbono a través de la vía de Entner-Doudoroff (E-D) hacia la producción de etanol. Se uso una mutante en *pgi* (KO11 *pgi*<sup>-</sup>). KO11 *pgi*<sup>-</sup> no crece en medio mineral-glucosa bajo condiciones no aireadas y por evolución metabólica de KO11 *pgi*<sup>-</sup> se obtuvo una cepa capaz de crecer bajo condiciones no aireadas, llamada KO11 E35. Esta cepa mostró un incremento del flujo de carbono a través de las primeras dos reacciones de la vía de las PP y E-D; debido a incrementos de las actividades enzimáticas de estas vías. Esto permitió una recuperación parcial de la formación de la biomasa, velocidad específica de consumo de glucosa ( $q_s$ ) y de producción de etanol ( $q_{EtOH}$ ), además, los flujos de formación de acetato, formato y lactato incrementaron de 2 a 3 veces, en comparación con KO11. La sobreexpresión simultánea de *galP* y *glk*, junto con *zwf* de *Z. mobilis* en KO11 E35, incrementó ligeramente la  $q_s$  y  $q_{EtOH}$  con respecto a KO11 E35. Sin embargo, con respecto a KO11, la cantidad de biomasa se redujo a la mitad, incrementando el flux de carbono hacia acetato, formato y lactato.

Finalmente, se generó una derivada homoetanológica a partir de KO11 E35, inactivando los genes *pta*, *ack* y *ldh*. En la cepa resultante, KO11 PPAL<sup>-</sup>, las actividades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ZWF) y de Entner-Doudoroff incrementaron 17.1 y 2.6 veces, respectivamente, con respecto a KO11. Además, un incremento en el nivel de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa en KO11 PPAL<sup>-</sup> permitieron obtener velocidades específicas de formación de etanol similares a las de KO11, pero con la mitad de masa celular y sin flujos de carbono hacia acetato, lactato y formato. En consecuencia el rendimiento etanol/glucosa en medio mineral incremento 13%. Estos datos demuestran que es posible obtener el mismo flux de glucosa a etanol usando la vía de E-D como ruta alternativa a la vía de Embder-Meyerhoff-Parnas.

## 2 ABSTRACT

Metabolic engineering is used to increase the metabolic flux or productivity using strategies such as: overexpression of key genes in multicopy plasmids or by chromosomal integration, redirecting the carbon flux through a disable pathway or interrupting other pathways. In this work ethanologenic *E. coli* was engineered to evaluate the effect into ethanol productivity and yield, by increasing the activity of key carbon metabolism enzymes, in mineral medium with glucose and xylose as carbon sources. It was found that the heterologous pathway of ethanol production limits the carbon flux from glucose or xylose to ethanol.

In addition, with the objective of increasing the production of specific proteins and metabolites *E. coli* has been the most used host for the overexpression of homologous or heterologous genes using multicopy plasmids. As a consequence of a metabolic load effect, these strategies reduce the specific growth rate ( $\mu$ ) of the host strains. In this work we found that the metabolic burden generated in *E. coli*, was relieved by increasing the heterologous activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*, because in addition to an increase of precursor levels from the pentose phosphate pathway, results show that, in comparison to the wild type strain, increases in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio promote the increase on  $\mu$ , but increases in the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio decrease this parameter. Furthermore, in a strain blocked in the glycolysis, in the gene that encodes the phosphoglucose isomerase (*E. coli* JM101 *pgi*),  $\mu$  is also drastically impaired. Also, simultaneous expression of the homologous unspecific galactose-glucose transporter (*galP*), the glucokinase (*glk*), and the heterologous *zwf<sub>Zm</sub>* from *Z. mobilis* in JM101 *pgi* allowed to recover 67% of the growth rate with respect to the wild type strain.

Starting from the ethanologenic *E. coli* strain KO11 (*E. coli* W *pfl::pdc adhB cat, Δfrd*); its metabolism was modified to evaluate carbon flux redistribution through the Entner-Doudoroff (E-D) pathway. A phosphoglucose isomerase (*pgi*) knockout mutant (KO11 *pgi*) was used. KO11 *pgi* grew poorly

in mineral media-glucose under anaerobic conditions. By metabolic evolution a strain able to grow under anaerobic conditions was obtained: KO11 E35. This strain showed increased values of enzymatic activities for the first two reaction of the PP and E-D pathways. KO11 E35 partially recovered biomass formation, specific glucose consumption ( $q_s$ ) and ethanol production rate, in comparison with KO11. However, carbon flux to ethanol ( $q_{\text{EtOH}}$ ) was one-third the capacity of KO11, nevertheless, carbon flux to acetate, formate and lactate increased between 2 to 3-fold.

Simultaneous homologous overexpression of *galP* and *glk*, and the heterologous *zwf* from *Z. mobilis* in KO11 E35, increased slightly the  $q_s$  and  $q_{\text{EtOH}}$  with respect to KO11 E35. However, biomass formation was still half of that obtained with KO11, and also increased fluxes to acetate, formate and lactate were found. A homoethanogenic derivative was obtained from KO11 E35, deleting the *pta*, *ack* and *ldh* genes, obtaining KO11 PPAL<sup>-</sup>. Main results showed that activity values for glucose-6-phosphate dehydrogenase and the E-D pathway enzymes increased 17.1 and 2.6-fold, respectively, in KO11 PPAL<sup>-</sup> in comparison with KO11. Also, an increase of the level of pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase in KO11 PPAL<sup>-</sup> allowed to obtain specific ethanol formation rates similar to those found in KO11, but with half the cell mass and without carbon flux to acetate, formate and lactate, resulting in a 80% ethanol/glucose yield from the theoretical. These results demonstrate that it is possible to obtain the same carbon flux from glucose to ethanol using the PP and the E-D pathways as alternative routes for the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway.

### 3 INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Importancia de la producción de etanol

El agotamiento del petróleo y de otros combustibles fósiles plantea la necesidad de desarrollar alternativas para la obtención de combustibles renovables. Una alternativa atractiva para el esquema nacional y de otros países, es la producción de etanol carburante a partir de residuos agroindustriales, evitando así la competencia con sustratos que se utilizan como alimento para humanos y animales. Para lograr la conversión de todos los azúcares presentes en estos residuos, es necesario modificar cepas de levaduras o bacterias por técnicas de ADN recombinante. Así mismo, es importante llevar a cabo estudios que permitan entender el funcionamiento de la célula con el fin de lograr rendimientos elevados de conversión y con velocidades volumétricas y específicas de producción de etanol que sean compatibles con esquemas de producción a escala comercial.

#### 3.2 Ingeniería Metabólica

En los últimos años el empleo de la tecnología del ADN recombinante y el análisis sistemático de datos biológicos han aumentado considerablemente, dando lugar a la ingeniería de vías metabólicas (IVM), la cual se puede definir como la modificación y/o introducción de nuevas reacciones bioquímicas para el mejoramiento directo de propiedades celulares mediante tecnología de ADN recombinante (Stephanopoulos 1998; Stephanopoulos 1999; Bailey 1991; Nielsen 2001). La IVM hace uso de herramientas metodológicas para cuantificar flujos metabólicos, concentración de intermediarios metabólicos y productos.

Entre los propósitos de la IVM se encuentran: reestructurar o crear redes metabólicas, alterar la distribución de flujos de carbono y amplificar, inhibir, eliminar, transferir o desregular genes o enzimas. Sus principales aplicaciones son: mejorar rendimientos de formación de productos (cantidad de producto producido a partir de una cantidad de azúcar determinada), extender el

intervalo tanto de sustratos metabolizables, como de productos, complementar vías, obtener productos nuevos en la célula huésped, dirigir y aumentar o reducir el flujo hacia una ramificación deseada y mejorar productividades (fluxes = velocidades específicas de formación de productos por gramo de células en un tiempo determinado). Finalmente, la IVM es multidisciplinaria, e involucra a la ingeniería bioquímica, genética, biología molecular, bioquímica, fisiología y química analítica, entre otras disciplinas.

### **3.3 Metabolismo central del carbono en *E. coli*.**

En *E. coli* el metabolismo central es el responsable de generar precursores para la síntesis de macromoléculas, energía y de reciclar cofactores (Böck y Sawers 1996; Fraenkel 1996). De tal forma que la modificación o inactivación de una actividad enzimática en el metabolismo central puede llevar a cambios importantes en la fisiología celular, tales como la distribución de flujos, regulación, niveles de metabolitos intermediarios y actividades enzimáticas. El metabolismo central de carbono se divide en diferentes vías metabólicas (Fig. 3.1):

1. La vía glucolítica o de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), convierte la glucosa-6-fosfato a piruvato y precursores de aminoácidos, generando ATP y NADH.
2. La vía de las pentosas fosfato (PP), donde la glucosa es convertida en gliceraldehído-3-fosfato, fructosa-6-fosfato, CO<sub>2</sub>, precursores de aminoácidos y nucleótidos, generando NADPH.
3. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) que oxida acetil-CoA a precursores de aminoácidos y CO<sub>2</sub>, generando FADH<sub>2</sub>, NADPH y GTP.
4. Vías accesorias como la del glioxal y anapleróticas.
5. La vía de Entner-Doudoroff (E-D) que produce piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, generando NADPH.

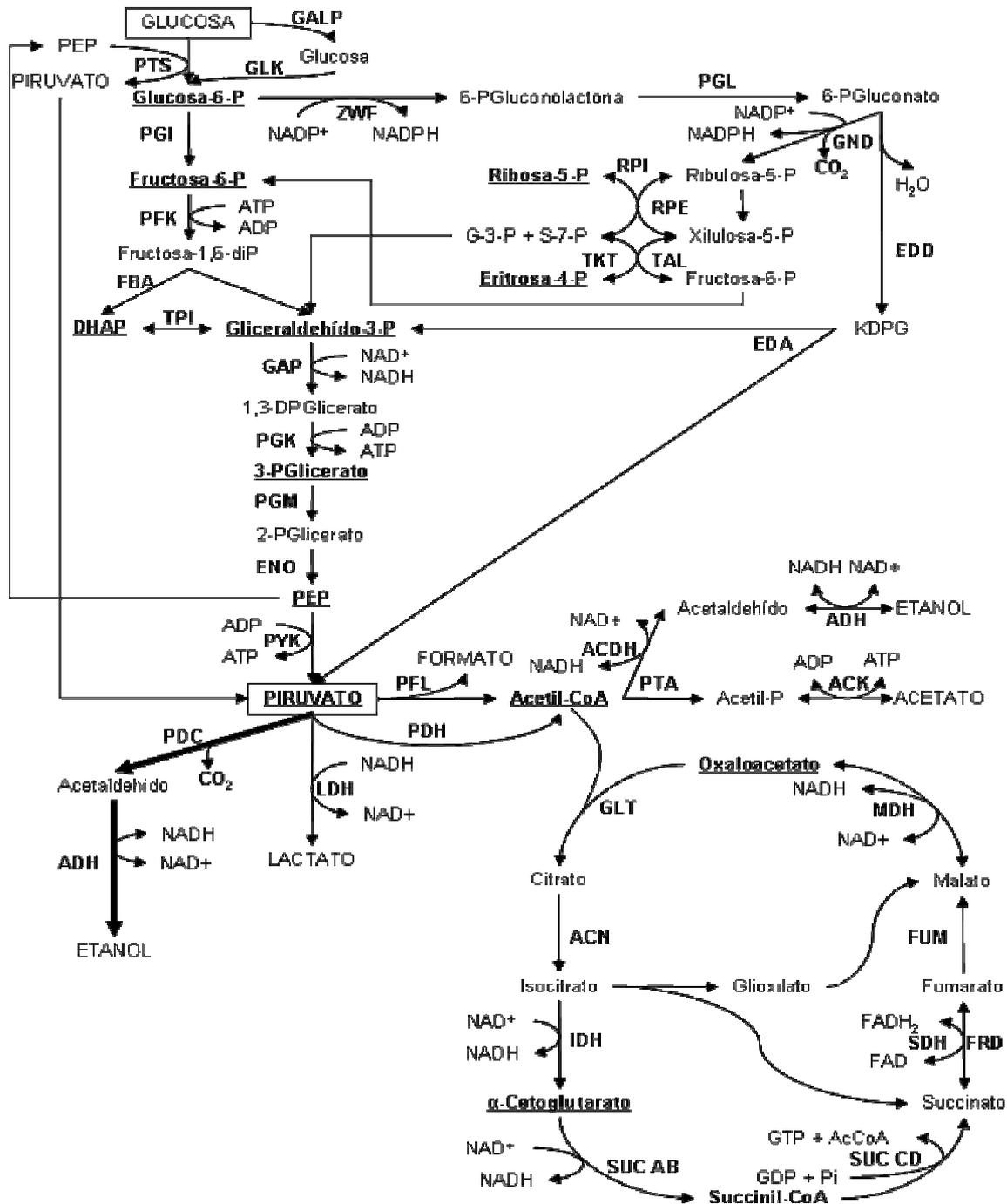
Las herramientas clásicas de estudio, en lo referente al metabolismo central se sustentan en la modulación de la actividad específica de algún(os)

gen(es) relacionados con una vía metabólica en particular, a través de la regulación o modificación de las propiedades genéticas del gen en particular o de genes relacionados con el proceso de utilización o producción del metabolito de interés, así como en la utilización de enzimas modificadas. En ciertos casos la interrupción de la expresión de cierto gen o grupo de genes ha tenido éxito en el estudio de su papel en el metabolismo y la fisiología del sistema biológico, en particular en bacterias. Estudios metabólicos de cepas con genes del metabolismo central inactivados han mostrado que tales interrupciones pueden ser compensadas por isoenzimas o redirigiendo el flux de carbono hacia vías metabólicas alternativas (Hua et al., 2003).

### **3.4 Planteamiento de modificación del metabolismo central para incrementar el flujo de carbono hacia la formación de etanol**

De todos de los microorganismos etanologénicos, incluyendo a las levaduras, la bacteria Gram negativa *Zymomonas mobilis* es la que tiene la mayor velocidad específica de formación de etanol (Sprenger 1996; Panesar et al., 2006). Una característica relevante de esta bacteria es que usa la ruta de Entner-Doudoroff (E-D) como vía para el catabolismo de la glucosa (Conway 1992). El rendimiento neto de ATP de esta vía es de un mol de ATP por mol de glucosa catabolizada (Figura 3.1). Este bajo rendimiento energético ocasiona que la formación de células sea baja y para contender con el bajo nivel energético la glucosa es catabolizada a un alto flux glucolítico hacia la formación de etanol (Arfman et al 1992; Panesar et al., 2006). Por lo tanto, en este trabajo postulamos que es posible que la sobre-expresión de los genes *zwf*, *edd* y *eda* de la vía de Entner-Doudoroff de *Z. mobilis* o la activación de la vía de E-D nativa en *E. coli*, conjuntamente con la inactivación de *pgi*, incremente los niveles de intermediarios metabólicos y actividades enzimáticas de esta vía, esto ocasionaría la canalización de la mayor parte del flujo de carbono a través de la vía de Entner-Doudoroff para el catabolismo de glucosa en *E. coli*, produciendo una disminución en el rendimiento de ATP y en la síntesis de

biomasa. En consecuencia, se incrementaría el flux de carbono hacia la formación de piruvato y etanol en *E. KO11* *pgi* bajo condiciones no aireadas.



**Figura 3.1.** Vías del metabolismo central de *E. coli*. Via de Embden-Meyerhoff-Parnas, de las Pentosas fosfato, de Entner-Doudoroff, de ácidos tricarbóxicos y del glicoxalato. Las líneas gruesas representan la vía heteróloga de síntesis de etanol, presente en *E. coli* KO11. Abreviaturas: Indicadas en la sección de nomenclatura (pág. XI y XII).

Como primera parte, se propuso analizar que pasos de la glucólisis y de vías fermentativas podrían estar controlando el flujo de carbono (en este caso de glucosa ó xilosa) hacia la formación de etanol en *E. coli* etanologénica KO11 (*E. coli* W  $\Delta pfl::pdc adhB; \Delta frd$ ; Ohta et al., 1991; Ingram et al., 1999; Jarboe et al., 2007).

Como parte principal del trabajo se decidió evaluar si es posible canalizar el flujo de glucosa a través de la vía de Entner-Doudoroff en *E. coli* KO11. En este caso la estrategia planteada consistió en expresar y modular la actividad de las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff (E-D) de *Z. mobilis* en *E. coli* etanologénica KO11 inactivada en el gen *pgi* que codifica para la glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI). La interrupción de *pgi* tiene el propósito de que KO11 lleve a cabo el metabolismo de glucosa forzosamente a través de la vía de E-D. Este esquema metabólico sería similar al que utiliza *Zymomonas mobilis*. Sin embargo, la interrupción de *pgi* tiene un efecto drástico sobre el crecimiento de *E. coli*, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En aerobiosis la velocidad específica de crecimiento se reduce sustancialmente y en anaerobiosis las cepas etanologénicas no crecen, por tal motivo decidimos evaluar si un mayor flujo de carbono hacia la vía de las PP y E-D permitiría mejorar el crecimiento. Sin embargo, se encontró que un efecto de carga metabólica reduce aún más el crecimiento de *E. coli* en aerobiosis y no se recupera el crecimiento en condiciones no aireadas.

Por lo mencionado en el párrafo anterior, también se decidió evaluar el efecto de carga metabólica en condiciones aeróbicas en una cepa silvestre de *E. coli* y su derivada inactivada en *pgi*.

El empleo de KO11 transformante (KO11 *pgi*/pZEA<sub>zm</sub>), se propone como modelo de estudio para analizar y cuantificar los cambios en la distribución de flujos del metabolismo central bajo condiciones anaeróbicas, su efecto sobre los niveles de actividad enzimática, balance energético y balance redox NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup>.

## **4.- ANTECEDENTES**

### **4.1 Fisiología y Biología molecular de *Escherichia coli*.**

*E. coli* es un microorganismo Gram negativo, capaz de generar la mayoría de intermediarios metabólicos (macromoléculas), a través de vías del metabolismo central, necesarios para su funcionamiento celular y energético a partir de un azúcar como fuente de carbono y sales. El papel desempeñado por cada vía depende de las condiciones de cultivo, la fuente de carbono y las condiciones de aireación. La vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) y la vía del 6-fosfogluconato o de las pentosas fosfato (PP), son las dos rutas principales para el catabolismo de azúcares en *E. coli* y otras bacterias entéricas. Una tercera ruta es la de Entner-Doudoroff (E-D) considerada como una de las tres vías encontradas en la naturaleza, la cual es usada por *E. coli* para el metabolismo (inducible) de gluconato bajo condiciones normales (Conway 1992; Fraenkel 1996). Para fines prácticos, primero se describirán los sistemas de transporte de azúcares en *E. coli* y posteriormente las vías del metabolismo central.

### **4.2. Transporte de glucosa:**

#### **4.2.1 Sistema PTS.**

En *E. coli* el sistema fosfoenolpiruvato-carbohidratos de transferencia de fosfato (PTS) participa en el transporte y fosforilación de un gran número de carbohidratos, entre ellos de la glucosa (Glc), además participa en la regulación de varias vías metabólicas y en procesos de quimiotaxis. Es el mayor consumidor de fosfoenolpiruvato (PEP) (Postma et al., 1996). En este sistema una molécula de fosfoenolpiruvato es defosforilada, y la hidrólisis de ese enlace fosfato provee energía motriz para transportar y fosforilar una molécula de azúcar a través de la membrana plasmática. A partir de glucosa, en la glucólisis se obtienen dos moléculas de PEP, una es usada por el sistema PTS y la otra es usada para obtener ATP mediante la piruvato cinasa o en otras vías metabólicas como síntesis de aminoácidos. Las cepas inactivadas en el sistema

PTS (PTS-) crecen muy lento en condiciones aeróbicas en presencia de glucosa, pero no crecen en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, se han generado mutantes en cepas inactivadas en PTS, donde el transporte de glucosa se lleva a cabo por GALP (permeasa de galactosa) y posteriormente esta es fosforilada por GLK (glucocinasa) (Flores et al., 1995).

### **4.2.2 Sistema GAL P-GLK**

La permeasa de galactosa (GALP) puede transportar además de galactosa, otros azúcares tales como glucosa. Además, GALP es independiente de PEP, de manera que reemplaza la función de la proteína IICB<sup>Glc</sup> (proteína responsable de transferir el grupo fosfato del PEP al azúcar) en el sistema PTS (McDonald et al., 1997). La permeasa de galactosa es un transportador de tipo symporter, que acarrea glucosa simultáneamente con un protón al interior de la célula. Esta enzima es codificada por el gen *galP*. Posteriormente fue establecido que la fosforilación de glucosa translocada por GALP es por medio de glucocinasa (GLK), en cepas llamadas PTS<sup>-</sup> Glu<sup>+</sup> obtenidas por adaptación metabólica en cultivo continuo (Flores et al., 1995). Por otro lado, GALP y GLK de *E. coli* contenidas en el vector pCL1920 denominado (pvGlcGalP54) fueron sobrexpresadas en la cepa VH32 (*E. coli* W3110 PTS<sup>-</sup>), generando un incremento en la actividad enzimática de GLK, que en conjunto con el incremento en la expresión de GALP generaron la recuperación del 100% de la velocidad específica de crecimiento de la cepa VH32 con respecto a la cepa W3110, así como un incremento en la producción de acético y en el rendimiento producto-sustrato, por lo que se incrementó el flujo glucolítico en esta cepa (Hernández-Montalvo *et al.*, 2003).

### **4.3 Vía glucolítica**

Esta vía forma parte del metabolismo central e incluye una serie de reacciones enzimáticas que permiten la incorporación y transformación de glucosa en 2 moléculas de piruvato. En *E. coli* esta vía comprende la activación por fosforilación de la glucosa, llevado a cabo principalmente por el sistema

PTS. Otra alternativa es el sistema GALP-GLK. La diferencia entre ambos sistemas es que PTS puede fosforilar una amplia gama de azúcares mientras que GLK solo puede fosforilar a la glucosa. Otra característica importante de esta vía es la producción de ATP a nivel de las enzimas fosfoglicerato cinasa y piruvato cinasas y la producción de poder reductor por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

### 4.3.1 Mutantes en el gen *pgi*

Las reacciones de la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas permiten la transformación de glucosa-6-fosfato a piruvato mediante una serie de enzimas. La primera de ellas es la glucosa-6-fosfato isomerasa. La inactivación de esta enzima provoca una interrupción en la glucólisis en *E. coli*, en consecuencia emplea la vía de las pentosas como la ruta primaria para el catabolismo de glucosa y adicionalmente la vía de Entner-Doudoroff, aunque en menor proporción (Hua *et al.*, 2003). Adicionalmente, Flores *et al.*, 2004, observaron que la inactivación del gen *pgi* en *E. coli* JM101 afecta drásticamente la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) celular, disminuyendo esta en 86% con respecto a la cepa silvestre en condiciones aeróbicas. Además la inactivación de *pgi* en el metabolismo de *E. coli* provoca que el flujo de carbono incremente hacia el brazo oxidativo de la vía de las pentosas (Flores *et al.*, 2002; Marx *et al.*, 2003), incrementando los niveles de NADPH. Este incremento genera un desbalance redox que afecta el crecimiento celular.

### 4.4 Vía de las pentosas fosfato

La vía de las pentosas se divide en dos ramas, la rama oxidativa y la no oxidativa. La oxidativa comprende de glucosa-6-fosfato hasta ribulosa-5-fosfato, en esta rama se lleva a cabo la pérdida de una unidad de carbono en forma de CO<sub>2</sub>, por medio de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (GND) y la producción de dos moléculas de NADPH por medio de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ZWF) y GND (figura 3.1). Durante el crecimiento exponencial, ZWF junto con GND son responsables de la mayor parte de la

producción de NADPH en condiciones anaeróbicas y aeróbicas (Szyperki 1995). En condiciones aeróbicas hay otras enzimas del metabolismo que puede cubrir la producción de NADPH: la malato deshidrogenasa, además la isocitrato deshidrogenasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa producen tanto NADH como NADPH (Csonka y Fraenkel 1977; Böck y Sawers 1996).

La rama no oxidativa comprende una serie de reacciones que permiten metabolizar pentosas, así como la generación de ribosa 5-fosfato, precursor de nucleótidos, y eritrosa-4-fosfato, precursor de aminoácidos aromáticos. Otras enzimas importantes de esta rama metabólica son la ribosa fosfato epimerasa (RPE) y la ribosa fosfato isomerasa (RPI) que generan intermediarios para las enzimas transcetolasa (TKT) y transaldolasa (TAL), las cuales a su vez generan intermediarios glucolíticos de 3 y 6 carbonos como fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato.

Algunas de las características más importantes de la vía de las pentosas fosfato es su flexibilidad, ya que dependiendo del estado metabólico de la bacteria, puede cubrir diferentes necesidades de precursores o de energía y/o poder reductor. En el caso de *E. coli* la regulación de la vía se da por dos factores, que son: la velocidad de crecimiento y la fuente de carbono (Sprenger 1995).

### **4.5 Vía de Entner-Doudoroff y su regulación**

#### **4.5.1 De *Escherichia coli***

La vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) y la vía de Entner-Doudoroff (E-D) en general son similares, ya que inician con azúcares fosforilados de 6 carbonos, los cuales son hidrolizados por aldolasas produciendo intermediarios de tres carbonos (Peekhaus y Conway 1998). *E. coli* usa la vía de Entner-Doudoroff para metabolizar gluconato y otros azúcares ácidos a piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, que continúan su catabolismo por la vía de EMP y TCA (Figura 3.1). Una enzima clave de esta vía es EDA (2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa) codificada por el gen *eda* (Peekhaus y Conway 1998),

debido a que la acumulación intracelular de KDPG (2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato) sustrato de la enzima EDA, en *E. coli* y en otros microorganismos como *Z. mobilis* ocasiona un efecto bacteriostático en las células (Fuhrman *et al.*, 1998, Conway *et al.*, 1991). El mecanismo de toxicidad de KDPG en *E. coli* está relacionado directamente a un efecto de inhibición competitiva en la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, el primer paso de la vía de las pentosas (Faik y Kornberg 1973).

Aunado a esto, mediante el análisis del proteoma de una cepa productora de Poli (3-hidroxiacetato) se observó que la demanda celular de altos niveles de Acetil-CoA y NADPH necesarios en la biosíntesis Poli-3-hidroxiacetato (PHB) en *E. coli* recombinante ocasiona un incremento en la síntesis de la enzima Eda (Han *et al.*, 2001). Posteriormente, por análisis de flujos de carbono “*in silico*”, en *E. coli* modificada por ingeniería metabólica para producción de PHB, se observó un incremento del flujo a través de la vía de Entner-Doudoroff ocasionado por acumulación de polímero (Hong *et al.*, 2003).

### **4.5.2 De *Zymomonas mobilis*.**

*Z. mobilis* es un microorganismo Gram-negativo anaerobio y microaerófilo, es el único microorganismo reportado a la fecha que utiliza la vía de Entner-Doudoroff en condiciones anaeróbicas para el catabolismo de glucosa, fructosa y sacarosa a etanol. Mediante el catabolismo de glucosa a etanol y CO<sub>2</sub> por *Z. mobilis* se obtiene solo un mol neto de ATP por mol de glucosa consumido (Sprenger 1996, Favela 1993) (Tabla 4.1). De este modo, *Z. mobilis* mantiene un elevado flujo metabólico, para producir suficiente energía para su crecimiento. Esta característica se ve favorecida por la elevada expresión de sus enzimas glucolíticas y etanológicas (las cuales constituyen más del 50% de la proteína total celular) (Algar y Scopes 1985). Además, estas actividades enzimáticas son constitutivas y no son reguladas alostéricamente, a excepción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que si lo es por la concentración de fosfoenolpiruvato (Scopes 1997). También se sabe que en *Z. mobilis* el control del flujo glucolítico está dado por la actividad de ZWF ( $C_{Zwf}^J =$

0.4) durante la fase inicial de la fermentación y después este control es distribuido entre las actividades de enolasa y fosfoglicerato mutasa (Snoep *et al.*, 1996). Cabe mencionar que a diferencia de ZWF de *E. coli*, ZWF de *Z. mobilis* produce mayoritariamente NADH, el cual puede ser reciclado por la enzima etanológica, alcohol deshidrogenasa II (ADH), sin ocasionar desbalance redox a la célula.

Con respecto a la producción de etanol, *Z. mobilis* representa un sistema biológico muy eficaz para producción de este producto de fermentación, ya que el 95% de la glucosa consumida es convertida en etanol y CO<sub>2</sub>, solo 2% del carbono finaliza en biomasa (Sprenger 1996). Sin embargo, la desventaja con respecto a *E. coli* es que *Z. mobilis* metaboliza solo glucosa, fructosa y sacarosa, además de sintetizar grandes cantidades de polímeros a partir de azúcares como la sacarosa y fructosa. En base a esto, resulta mejor expresar genes de *Z. mobilis* en *E. coli*, microorganismo que puede metabolizar una amplia variedad de azúcares.

**Tabla 4.1.** Balance redox y energético de *E. coli*, usando la vía glucolítica o la vía de Entner-Doudoroff para catabolismo de glucosa, en condiciones anaeróbicas.

<b>Balance Redox Glucólisis</b>	<b>Balance Redox Entner-Doudoroff</b>
De glucosa a etanol - 2 NAD en glucólisis + 2 NADH en producción de etanol	De glucosa a etanol - 1 NAD(P) de vía de las pentosas - 1 NAD de glicólisis <u>+ 2 NADH en producción de etanol</u>
<b>Balance de ATP</b>	<b>Balance de ATP</b>
De glucosa a piruvato (glucólisis) por molécula de glucosa - 2 ATP por activación <u>+ 4 ATP producidos</u> 2 ATP por molécula de glucosa Rendimiento neto: 2 ATP por Glucosa	De glucosa a piruvato (Entner-Duodoroff) por molécula de glucosa - 1 ATP por activación <u>+ 2 ATP producidos</u> 1 ATP por molécula de glucosa Rendimiento neto: 1 ATP por Glucosa

#### 4.6 Aplicaciones de la ingeniería de vías metabólicas en bacterias.

Uno de los propósitos de la IVM es dirigir el flujo de carbono hacia la producción de metabolitos de interés, producir un compuesto nuevo o bien incrementar la producción o productividad específica (flux metabólico) de un

compuesto ya presente en el metabolismo celular. La estrategia que generalmente se emplea para modificar el flux en el metabolismo central de carbono es modificando los niveles de expresión de genes que codifican para las enzimas participantes en el control del flujo (Stephanopoulos, 1998; Stephanopoulos, 1999). Con estas estrategias se han obtenido incrementos en las velocidades específicas de producción de etanol o de otros productos de interés industrial (San *et al.*, 2002; Guedon *et al.*, 2002). Sin embargo, a menudo otros intentos han tenido resultados desafortunados (Schaaff *et al.*, 1989; Snoep *et al.*, 1994; Smits *et al.*, 2000).

Para incrementar el flujo de carbono en bacterias, muchos estudios de ingeniería metabólica se han enfocado en la manipulación de los niveles de enzimas a través de la amplificación, eliminación e interrupción de genes, así como en la complementación y adición de vías. Comúnmente, se consideraba que el control del flujo glucolítico residía en el consumo de glucosa; o en las reacciones catalizadas por la hexocinasa, fosfofructocinasa o piruvato cinasa. Sin embargo, ahora se sabe que en *E. coli* el incremento en la hidrólisis de ATP, mediados por un aumento en la actividad de ATPasa en condiciones aeróbicas, aumenta el flux glucolítico en un 70% con respecto a su cepa silvestre (Koebmann *et al.*, 2002). También se ha reportado que el flux de la glucólisis en *S. cerevisiae* incrementa cuando hay una mayor demanda de ATP (Smits *et al.*, 2000), o un mayor consumo de ATP inducido por condiciones de estrés (Taherzadeh *et al.*, 1997; Garay-Arroyo *et al.*, 2003). Además, se han realizado trabajos de manipulación de los niveles de cofactores en *E. coli*, usando fuentes de carbono con diferentes estados de oxidación, p. ej. Manipulando los niveles de las pozas de CoA, Acetil CoA o la proporción de NADH/NAD<sup>+</sup> para incrementar la productividad de compuestos de interés industrial, por ej. 1,2-propanodiol, ester de isoamil-acetato o succinato (Jeppsson *et al.*, 2002; San *et al.*, 2002).

#### 4.7 Flux de formación de etanol

Desde el punto de vista del flux de síntesis de etanol (velocidad específica de síntesis o de producción), el valor es de 0.5–0.8 (Garay-Arroyo *et al.*, 2003) y de aproximadamente 5 g<sub>Et-OH</sub>/g<sub>DCW</sub>.h (Ho *et al.*, 1998), para cepas industriales de *S. cerevisiae* y de *Z. mobilis*, respectivamente, mientras que para KO11 es ligeramente menor de 1 (Hahn-Hagerdal *et al.*, 1994; Ingram *et al.*, 1998), en todos los casos utilizando glucosa como fuente de carbono. Cabe aclarar que *Z. mobilis* utiliza la vía de Entner-Doudoroff para metabolizar glucosa a gliceraldehído 3-P y piruvato, y posteriormente convertir el piruvato a etanol (Osman *et al.*, 1987). *S. cerevisiae*, utiliza la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas para catabolizar glucosa a etanol, mientras que *E. coli* etanológica (KO11) utiliza la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas y la de pentosas fosfato para catabolizar glucosa o xilosa en etanol.

#### 4.8 *Escherichia coli* etanológica KO11

Mediante técnicas de ingeniería de vías metabólicas se ha construido una cepa etanológica de *E. coli*, denominada KO11, Esta cepa se obtuvo integrando en su cromosoma el operón *pet*, el cual contiene los genes que codifican para la piruvato decarboxilasa (*pdh*) y la alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Z. mobilis* bajo el control de la región de regulación de la piruvato formato-liasa (*pfl*; Ingram *et al.*, 1999; Ohta *et al.*, 1991). KO11 convierte eficientemente glucosa, manosa, xilosa, arabinosa, o mezclas de estos azúcares en etanol, obteniéndose en medios ricos rendimientos de conversión de azúcar(es) en etanol cercano a los teóricos (Ohta *et al.*, 1991). Esta cepa también tiene inactivado el gen de la fumarato reductasa (*frd*), lo cual evita la producción de ácido succínico en condiciones anaeróbicas (Ingram *et al.*, 1999). Además la cepa KO11 es muy robusta para tolerar cambios en condiciones ambientales (Ref).

*E. coli* KO11 en cultivos no aireados con medios ricos metaboliza glucosa y xilosa hacia la producción de etanol en condiciones, con productividades de

etanol cercanas a  $1.0 \text{ g}_{\text{Et-OH}} / \text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}^{-1}$  (Hahn-hagerdal 1994). Cabe recalcar que *Z. mobilis* tiene tasas catabólicas más elevadas, con productividades de etanol de  $5.67 \text{ g}_{\text{Et-OH}} / \text{g}_{\text{DCW}} \text{ h}^{-1}$  a partir de glucosa (Panesar et al., 2006). Sin embargo, cuando KO11 es cultivada en medios minerales suplementados con glucosa, solo se alcanzan rendimientos menores al 70% (Martínez et al., 1999). No obstante, al parecer no existen limitaciones fisiológicas para incrementar el rendimiento de conversión de glucosa a etanol en medio mineral (Martínez et al., 1999, Tao et al., 2001; Gonzalez et al., 2002).

### 4.9 Efecto de la carga metabólica

*E. coli* es el microorganismo más utilizado para sobreexpresión de genes homólogos o heterólogos para la producción de proteínas o metabolitos a nivel industrial, sin embargo los altos niveles de expresión de éstos presenta ciertos problemas, por el uso de plásmidos multicopia y promotores fuertes; los cuales dependiendo del tamaño del plásmido, número de copias y fuerza del promotor, así como de su propia transcripción y la traducción de sus productos ocasionan diferentes efectos en la fisiología y el metabolismo de la célula, debido a la demanda de precursores metabólicos para la replicación de estos plásmidos.

Durante la parte inicial del presente proyecto se presentó un problema de carga metabólica durante la evaluación de unos plásmidos con *E. coli* etanologénica, y aunado al trabajo que se había planteado con ZWF, se decidió evaluar el efecto fisiológico de incrementar la disponibilidad de precursores metabólicos de la vía de las pentosas, así como el recambio de NADH y NADPH, mediante el incremento de la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis* para reducir el efecto de carga metabólica por transcripción de plásmidos multicopia en *E. coli*. Cabe aclarar que en este contexto, la enzima ZWF de *Z. mobilis* tiene una mayor afinidad por  $\text{NAD}^+$  que su contraparte de *E. coli*,  $\text{ZWF}_{Zm}$  puede utilizar indistintamente  $\text{NAD}^+$  (con una  $K_m$  de 0.105 mM) o  $\text{NADP}^+$  (con una  $K_m$  de 0.013 mM), y ZWF de *E. coli* usa  $\text{NAD}^+$  (con una  $K_m$  de 1.7 mM) o  $\text{NADP}^+$  (con una  $K_m$  de 0.015 mM) (Csonka y Fraenkel 1977; Scopes 1997).

## 5.- HIPÓTESIS

La modulación de la expresión heteróloga de los genes *zwf*, *edd* y *eda* de la vía de Entner-Doudoroff de *Z. mobilis* o la activación de la vía de E-D nativa en *E. coli*, conjuntamente con la inactivación de *pgi*, permita incrementar los niveles de intermediarios metabólicos y actividades enzimáticas de esta vía. Esto ocasionará la canalización del flujo total de carbono a través de la vía de Entner-Doudoroff durante el catabolismo de glucosa a etanol en *E. coli* etanológica produciendo una disminución en el rendimiento de ATP y en la síntesis de biomasa. En consecuencia, se incrementará el flux de carbono hacia la formación de piruvato y etanol en *E. KO11 pgi* bajo condiciones no aireadas.

---

## 6.- OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el efecto sobre la distribución de flujos de carbono y productividad de etanol provocado por la expresión de la vía de Entner-Doudoroff en *E. coli* etanológica inactivada en la vía glucolítica.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar la presencia de pasos limitantes en el catabolismo de glucosa o xilosa a etanol en *E. coli* etanológica.
2. Evaluar el papel del incremento de actividad de  $ZWF_{Zm}$  o  $ZWF_{Ec}$  sobre el efecto de carga metabólica en *E. coli* JM101.
3. Modular el nivel de la  $ZWF_{Zm}$  o  $ZWF_{Ec}$  junto con  $GALP_{Ec}$  y  $GLK_{Ec}$  sobre la recuperación de la velocidad de crecimiento en *E. coli* JM101 y *E. coli* JM101 *pgi*<sup>-</sup>.
4. Inactivar el gen *pgi* en *E. coli* KO11, complementar esta cepa con la vía de Entner-Doudoroff de *Z. mobilis* y evaluar en ambos casos su efecto sobre el crecimiento celular.
5. Someter a evolución adaptativa la cepa KO11 *pgi*<sup>-</sup> y caracterizar los parámetros cinéticos y perfiles de actividad enzimática de la cepa evolucionada (KO11 E35)
6. Evaluar el efecto del incremento en los niveles de  $ZWF_{Zm}$  o  $ZWF_{Ec}$ ,  $EDD_{Zm}$  y  $EDA_{Zm}$  junto con  $GALP_{Ec}$  y  $GLK_{Ec}$  sobre los parámetros cinéticos de crecimiento y de formación de productos de la cepa KO11 E35.
7. Construir una cepa homoetanológica a partir de la cepa KO11 E35 (KO11 PPAL<sup>-</sup>) y evaluar su potencial para producir etanol a partir de glucosa.
8. Evaluar el efecto que produce el incremento de actividad enzimática de  $PDC_{Zm}$  y  $ADH_{Zm}$  sobre velocidad específica de crecimiento, de consumo de glucosa y de producción de etanol en KO11 PPAL<sup>-</sup>. Estimar y analizar balances de flujos de carbono.

## 7.- METODOLOGÍA

### 7.1 Microorganismos, plásmidos y oligos

Las cepas, plásmidos y oligos utilizadas en este trabajo se enlistan en las Tablas 7.1, 7.2 y 7.3.

**Tabla 7.1.** Microorganismos empleados en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
JM101	F <sup>-</sup> <i>traD36 proA<sup>+</sup> proB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup></i> <i>lacZΔM15/supE, thi, Δ(lac-proAB)</i>	Stock del laboratorio
SM14	JM101 Δ <i>pgi</i>	Flores et al., 2004
DH5α	F <sup>-</sup> φ80d <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169</i> <i>deoR recA1 endA1 hsdR17(rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>) phoA</i> <i>supE44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1</i>	Stock de laboratorio
KO11	<i>E. coli W pfl::pdc adhB cat, Δfrd,</i>	Ohta et al., 1991; Jarboe et al., 2007.
<i>E. coli C</i>	Silvestre	ATCC 8739
KO11 <i>pgi</i>	<i>E. coli W pfl::pdc adhB cat, Δfrd, Δpgi.</i>	Este trabajo
KO11 E35	<i>E. coli W pfl::pdc adhB cat, Δfrd, Δpgi.</i> evolucionada	Este trabajo
KO11 PPAL <sup>-</sup>	KO11 E35 Δ <i>pta-ack, Δldh.</i>	Este trabajo

**Tabla 7.2.** Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pTrc99A	Derivado del vector de expresión pKK233-2, tiene el promotor híbrido <i>trc</i> río arriba del sitio de clonación múltiple (MCS) de pUC18, los terminadores de transcripción <i>rrnB</i> y resistencia a ampicilina.	Amann et al., 1988
pCL1920	Derivado de pSC101 que confiere	Lerner et al., 1990

## METODOLOGIA

	resistencia a espectinomicina (50 mg/ml) en <i>E. coli</i>	
pLOI510	Derivado de pUC19, que contiene los genes <i>pdC</i> y <i>adh</i> de <i>Z. mobilis</i> con secuencias homologas del gen <i>pfB</i> para integrarse en el cromosoma de <i>E. coli</i> .	Ohta <i>et al.</i> , 1991
pZWF <sub>Ec</sub>	Derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>zwf</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Flores <i>et al.</i> , 2004
pZWF <sub>Zm</sub>	Derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>zwf</i> de <i>Z. mobilis</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Este trabajo
pZEA <sub>Zm</sub>	Derivado de pTrc99A que contiene los genes <i>zwf</i> , <i>edd</i> y <i>eda</i> de <i>Z. mobilis</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Este trabajo
pKD4	Plásmido <i>amp<sup>R</sup></i> y <i>kan<sup>R</sup></i> , usado para amplificación del gen <i>kan<sup>R</sup></i> flanqueado por sitios FRT (sitios de recombinación FLP) usado en la interrupción de genes	Datsenko y Wanner 2000
pKD46	Plásmido <i>amp<sup>R</sup></i> , tiene un replicon sensible a temperatura y un sistema de recombinacion del fago lambda	Datsenko y Wanner 2000
pCP20	Plásmido <i>amp<sup>R</sup></i> y <i>cat<sup>R</sup></i> , tiene un replicon sensible a temperatura, y una recombinasa FLP inducible por temperatura	Datsenko y Wanner 2000
pVGlkGalP54	Derivado de pCL1920 que contiene las fusiones de <i>glk</i> al promotor <i>trc5</i> y de <i>galP</i> al promotor <i>trc4</i>	Hernandez Montalvo <i>et al.</i> , 2003

**Tabla 7.3.** Oligos diseñados y usados en este trabajo.

Oligo	Secuencia <sup>1</sup> y <sup>2</sup>	Uso
<b>pgiH1P1</b> <sup>1</sup>	5' ATC AGA AGA GTA TTG CTA <u>ATG</u> AAA AAC ATC AAT CCA	Interrupción del gen <i>pgi</i> de <i>E. coli</i>
<b>pgiH2P2</b> <sup>1</sup>	ACG CAG <b>TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G</b> 3'	
<b>pgia</b>	5' ACT AAC GGT CAG CAC GCG TT 3'	PCR confirmatorio de interrupción de <i>pgi</i>
<b>pgib</b>	5' TCA GAGAGC GGG TTA TGG GT 3'	
<b>Rzwf</b> <sub>Zm</sub> <sup>2</sup>	5' GCG <b>GCC ATG GCA</b> AAT ACC GTT TCG ACG <u>ATG</u> 3'	Amplificación del gen <i>zwf</i> de <i>Z. mobilis</i>
<b>Fzwf</b> <sub>Zm</sub> <sup>2</sup>	5' CGC <b>GGT ACC</b> GTT GAA TGC AGA TCA GTC ATA CCA 3'	
<b>Fedd</b> <sub>Zm</sub> <sup>2</sup>	5' CGC <b>GCC ATG GAG TAA</b> CTT GGT ATG ACT <u>GAT CTG C</u> 3'	Amplificación del gen <i>edd</i> de <i>Z. mobilis</i>
<b>Redd</b> <sub>Zm</sub> <sup>2</sup>	5' GCC <b>GGA TCC</b> GGA AGA TAT CAA ACA ATT CGC GCG G 3'	
<b>Feda</b> <sub>Zm</sub> <sup>2</sup>	5' CGC <b>GGA TCC</b> ATG CGT GAT ATC GAT TCC GTA <u>ATG CG</u> 3'	Amplificación del gen <i>eda</i> de <i>Z. mobilis</i>
<b>Reda</b> <sub>Zm</sub> <sup>2</sup>	5' CGC <b>GGA TCC</b> GCG CTA TTA GGC AAC AGC AGC ACG 3'	
<b>ackptaH1P1</b> <sup>1</sup>	5' GTA TCA ATT ATA GGT ACT TCC <u>ATG</u> TCG AGT AAG TTA	Interrupción de los genes <i>ack</i> y <i>pta</i> de <i>E. coli</i>
<b>ackptaH2P2</b> <sup>1</sup>	GTA CTG GTT <b>GTG TAG GCT GGA GCT GCT TCG</b> 3'	
<b>ldhH1P1</b> <sup>1</sup>	5' ATC ACT GGA GAA AGT CTT <u>ATG</u> AAA CTC GCC GTT TAT	Interrupción del gen <i>ldh</i> de <i>E. coli</i>
<b>ldhH2P2</b> <sup>1</sup>	AGC ACA <b>GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC</b> 3'	
	5' TGC AGG GGA GCG GCA AGA <u>TTA</u> AAA CCA GTT GGT TCG	
	GGC AGG <b>TCA TAT GAA TAT CCT CCT TTA G</b> 3'	

<sup>1</sup> La secuencia en negritas corresponde a los sitios de reconocimiento al plásmido pKD4 para obtener el PCR. La secuencia a la izquierda corresponde a la secuencia de homología al gen que se desea inactivar.

<sup>2</sup> La secuencia con doble subrayado corresponde a los sitios de homología con el gen que se desea amplificar. La secuencia en cajas grises corresponde a sitio de digestión para futuras clonaciones de los genes correspondientes.

En el presente trabajo se utilizaron las cepas de *E. coli* C y una derivada de *E. coli* W, la cepa etanológica KO11, la cual tiene integrado en el cromosoma los genes que codifican para la piruvato decarboxilasa (*pdhZm*) y la alcohol deshidrogenasa B (*adhBZm*) de *Z. mobilis* (*Zm*), esta cepa tiene como marcador de selección un gen que le confiere resistencia a cloramfenicol (Ohta *et al.* 1991).

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes de la vía de Entner-Doudoroff de *Z. mobilis*, la cepa KO11 fue inicialmente interrumpida en el gen que codifica para la fosfoglucoasa isomera (*pgi*), una enzima de la vía

glucolítica. Después la cepa K011 *pgi*- fue transformada con el plásmido pZEA<sub>Zm</sub> derivado del vector pTrc99A (Pharmacia), conteniendo un operon con los genes heterólogos, que codifican para las enzimas ZWF<sub>Zm</sub>, EDD<sub>Zm</sub> y EDA<sub>Zm</sub> de *Z. mobilis* (Tabla 7.2). El plásmido pTrc99A contiene el promotor *trc* inducible por IPTG y un gen que le confiere resistencia a ampicilina como marcador de selección a las cepas transformantes.

## **7.2 Condiciones y medios de cultivo**

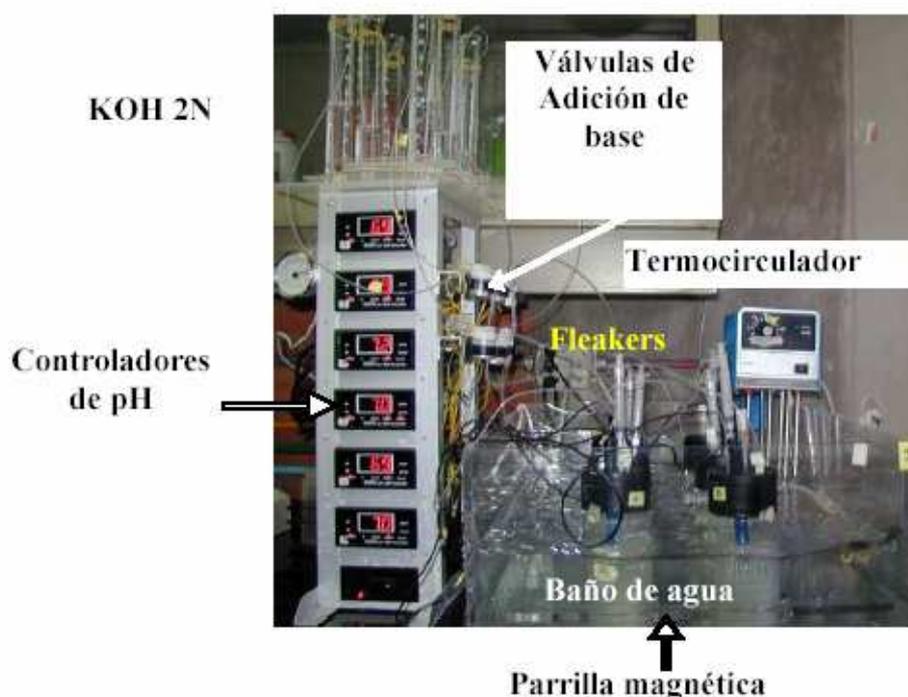
### **7.2.1 Inóculos para cultivos**

A partir de las células congeladas en glicerol (40%) se estriaron placas conteniendo agar (15 g/L), medio Luria, 20 g/l de Glucosa y 40 mg/l de Cm, se incubaron a 35°C de 20 – 24 h. A partir de estas células se toman tres colonias grandes, se resuspenden en un tubo de vidrio con 3 ml de medio LB y se adicionan al matraz que contiene el medio de cultivo para el inóculo. El crecimiento del inóculo se realizó en matraces de 500 ml, conteniendo 200 ml de medio mínimo (M9), con 20 g/l de glucosa como fuente de carbono, temperatura de 35°C y con una agitación de 120 rpm. Los inóculos se incubaron durante 14 h, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 1.3. Todos los cultivos fueron inoculados centrifugando (5000 rpm, 10 min y temperatura ambiente) la cantidad suficiente de inóculo para obtener una DO<sub>600</sub> inicial de 0.1 (0.037 g<sub>DCW</sub>/l), las células fueron transferidas a cada cultivo resuspendiéndolas en el medio respectivo (la variación de la concentración inicial celular en todos los cultivos se debe al error experimental).

### **7.2.2 Medios de cultivo.**

La composición del medio mínimo M9 (Maniatis *et al.*, 1982) para cultivo en mini-fermentadores, contiene por litro: 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g NH<sub>4</sub>Cl; 0.5 g NaCl; 2 ml de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1M; 0.1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1M; 0.1 ml de Tiamina 1 mg/ml (esterilizada por filtración). A menos que se mencione otra cosa, el

medio M9 fue suplementado con 40 g/L de glucosa o xilosa para los cultivos no aireados evaluados en mini-fermentadores, y 2 g/L de glucosa en los cultivos aeróbicos en matraces. El medio Luria (Maniatis *et al.*, 1982) contiene por litro: 10 g Bactotripton; 5 g extracto de levadura; y 5 g NaCl.



**Figura 7.1.** Sistema de Minifermentadores o Fleakers.

### 7.2.3 Condiciones de cultivo.

Los cultivos aeróbicos se realizaron en matraces nefelométricos de 125 ml con 50 ml de medio mínimo, a una temperatura de 37°C, sin control de pH y una velocidad de agitación de 300 rpm. El crecimiento microbiano fue determinado midiendo la DO a 600 nm de muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo.

Los cultivos anaeróbicos se realizaron en sistemas de mini-fermentadores o mini-fleakers (Figura 7.1) (Beall *et al.*, 1991), 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 2N. Para garantizar el mezclados de los nutrientes, los cultivos se mantuvieron a una velocidad de agitación de 100 rpm. Las

actividades enzimáticas fueron determinadas en extractos celulares cosechados durante el crecimiento exponencial (8 h). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. En los resultados se muestran valores promedio y su error experimental.

### **7.3 Métodos analíticos.**

#### **7.3.1 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 cellular weight), de acuerdo a una curva de calibración:  $1 \text{ DO}_{600} = 0.37 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{l}$ . 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.

#### **7.3.2 Determinación de azúcares y ácidos orgánicos.**

La determinación de glucosa y productos de fermentación como los ácidos orgánicos (acético, fórmico, succínico, láctico, pirúvico, etc.) y glicerol fueron determinados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La determinación por HPLC, se llevó a cabo por cromatografía isocrática con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 ml/min en una columna Aminex HPX-87H (Biorad) a 50°C. 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 Milenium (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  $\mu\text{m}$  y se inyectaron automáticamente (Waters 717). Para la confirmación de los azúcares y los productos analizados por HPLC se inyectaron estándares de xilosa, ácidos orgánicos, alcoholes e intermediarios metabólicos.

### **7.3.3 Determinación de etanol.**

La determinación de etanol se realizó por cromatografía de gases (Cromatógrafo de Gases Agilent, Serie 6850, Wilmington, D.E.) utilizando como estándar interno 1-butanol. Se utilizó He como fase móvil (5.0 ml/min, 19.05 psi y 65 cm/s) a través de una columna capilar (Innowax 19091N-133E, de 30 m de longitud 0.25 mm de diámetro interno y con un espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ , J&W Scientific), y 0.2  $\mu\text{l}$  de sobrenadante inyectados automáticamente. 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°C hasta 200°C y la del detector a 250°C.

### **7.3.4 Determinación actividades enzimáticas y de proteínas.**

Los ensayos enzimáticos fueron realizados mediante métodos descritos previamente (Bergmeyer y Gawehn 1974; Hoppner y Doelle 1983; Martínez *et al.* 1999; Peng y Shimizu *et al.*, 2003, Huerta-Beristain 2004)(Anexo C). Después de 8 horas de cultivo en los mini-fermentadores, las células se ajustan a una  $\text{DO}_{600}$  de aproximadamente 1, se cosechan por centrifugación, se lavaron dos veces en amortiguador de lisis específico para cada ensayo, estas células se resuspenden en 1 ml del mismo amortiguador. Las preparaciones libres de células fueron obtenidas por sonicación (4 pulsos de 14-16 micrones cada uno separados por 1 min, así, la presencia de células viables después del proceso de sonicación es nula) manteniendo al tubo que contiene las preparaciones en hielo con etanol, para finalmente por centrifugación (10 min, 4°C) obtener un extracto de proteína que se utiliza para llevar a cabo las determinaciones enzimáticas. Estas determinaciones se llevan a cabo mediante reacciones oxido-reducción acopladas a otras enzimas, monitoreando la oxidación o reducción de NADH o  $\text{NAD}^+$  a 340 nm durante 5 min a 30°C en el

espectrofotómetro Beckman DU-70 (Beckman instrument, Inc. Fullerton, CA.). La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford. Las unidades de actividad enzimática se expresaron como el número de mmoles de sustrato convertidos a producto en un minuto por miligramo de enzima a temperatura y pH específicos.

### **7.4 Evaluación de parámetros.**

Los parámetros evaluados fueron: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ); rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{X/S}$ ); velocidad específica de consumo de azúcar ( $q_S$ ); velocidad específica de formación de productos ( $q_P$ ), los cuales se determinaron durante la fase de crecimiento exponencial y fueron corregidos por factor de dilución en función de la base o ácido adicionado a los cultivos para el control de pH (Huerta-Beristain 2004).

### **7.5 Cálculo de fluxes y balance de carbono.**

Los flujos de carbono son reportados en milimoles de carbono por litro por hora ( $\text{mmol}_C/\text{L h}$ )(anexo B.6), el calculo de dichos flujos se realizó a partir de los valores de velocidad volumétrica de consumo de glucosa y de formación de productos (etanol, fórmico, acético y láctico). Los cuales fueron convertidos a moles de carbono considerando el peso molecular y el número de carbonos contenido en cada especie considerada. La distribución del carbono (en porcentaje respecto a la glucosa consumida) para los mismos experimentos, se llevo a cabo dividiendo los flux de carbono de cada compuesto entre el flux de carbono de consumo de glucosa y multiplicado por cien. Para el caso del bióxido de carbono, por balance estequiométrico, se asumió que se produjo un mol de  $\text{CO}_2$  por cada mol de etanol.

### 8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo esta constituido por tres etapas ligadas entre si, debido a que giran alrededor de la manipulación del metabolismo central (mediante la sobreexpresión o interrupción de genes) para incrementar el flux de producción de etanol en *E. coli* KO11. Así como, dirigir el flujo de carbono hacia una vía deseada y abatir la demanda de precursores para sobreexpresión de genes homólogos ó heterólogos en *E. coli*.

En la primera etapa, se presenta la caracterización metabólica con el fin de identificar posibles pasos enzimáticos que limitan el flux de carbono en la glucólisis hacia la producción de etanol a partir de glucosa o xilosa en *E. coli* etanologénica KO11. Para esto, se evaluó el incremento de actividad de enzimas relacionadas con el transporte de glucosa o xilosa; las enzimas que catalizan reacciones de fosforilación o defosforilación en la glucólisis y una enzima que desvía el flujo de piruvato hacia la formación de etanol en *E. coli* etanologénica. Todo esto en medio mínimo con glucosa bajo condiciones no aireadas.

La segunda etapa, consistió en evaluar el incremento en el nivel de actividad de ZWF homóloga ( $ZWF_{Ec}$  = glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *E. coli*) o heteróloga ( $ZWF_{Zm}$  = glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis*); y su papel sobre la recuperación de la velocidad específica de crecimiento en *Escherichia coli* JM101 con carga metabólica debido a la transcripción de plásmidos multicopia.

Además, se presenta la caracterización de la velocidad específica de crecimiento en *E. coli* JM101 *pgi* (SM14). En este caso se evaluó el efecto que tiene el incremento de nivel de actividad de  $ZWF_{Ec}$  o  $ZWF_{Zm}$  junto con el transportador inespecífico de glucosa GalP y GLK de *E. coli*. En estos casos los estudios fueron en condiciones aeróbicas en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono.

La tercera y última etapa consistió en evaluar la capacidad de una mutante *pgi* etanologénica con una interrupción (*pgi*-) que evita el flujo de

glucosa-6-P hacia la glucólisis y permite desviar el flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato y la de Entner-Doudoroff hacia la producción de etanol, complementado con la sobreexpresión de los genes de la vía de E-D de *Z. mobilis*. Además, se caracterizó la distribución del flujo de carbono hacia la producción de etanol y la fisiología del metabolismo central en la cepa KO11 PPAL- obtenida por evolución adaptativa en medio mínimo con glucosa 40 g/L y no aireados, con interrupción de los genes *ack*, *pta* y *ldh*, y se comparó con una cepa transformante con incremento en el nivel de PDC<sub>Zm</sub> y ADH<sub>Zm</sub>.

### **8.1 PRIMERA ETAPA: Identificación y caracterización de los pasos enzimáticos limitantes de la glucólisis y la vía de síntesis de etanol en *E. coli* KO11.**

#### **8.1.1 Introducción**

Con el fin de elucidar si algunas actividades enzimáticas de la vía glucolítica o de fermentación limitan el flujo de carbono de glucosa o xilosa hacia la formación de etanol en la cepa de *E. coli* etanologénica KO11, se incrementó el nivel de las actividades enzimáticas de cinco pasos del metabolismo central de carbono, considerados clave en la canalización de glucosa o xilosa hacia la formación de productos de fermentación. Las enzimas analizadas fueron, la permeasa de galactosa GALP<sub>Ec</sub>, la cual transporta inespecíficamente glucosa, xilosa y galactosa (Hernández-Montalvo *et al.*, 2003). La Fosfofructocinasa (PFK<sub>Ec</sub>), que cataliza la fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato. La fosfoglicerato cinasa (PGK<sub>Ec</sub>) que cataliza la primera reacción de formación de ATP, mediante una reacción parcialmente reversible, de glicerato 1,3 difosfato en 3 fosfoglicerato y ATP, y la piruvato cinasa heteróloga de *Bacillus stearothermophilus* (PYK<sub>Bs</sub>) que cataliza la formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato y ADP. Esta enzima es activada alostéricamente por AMP y Ribosa-5-fosfato, y no por fructosa-1,6-difosfato como la PYK homóloga de *E. coli*: (Emmerling *et al.*, 1999). Estas tres enzimas están involucradas en la formación o consumo de ATP, con los

mayores valores absolutos de  $\Delta G'^{\circ}$  exergónica en la glucólisis, y en dos casos constituyen etapas con regulación alostérica en esta vía (Stryer 1999). Adicionalmente, se evaluó el incremento en la actividad de una enzima que desvía el flujo de piruvato hacia la formación de etanol en *E. coli* etanologénica, la piruvato decarboxilasa heteróloga de *Zymomonas mobilis* (PDC<sub>Zm</sub>; Martínez *et al.*, 1999). Para modular la actividad enzimática se utilizó un vector inducible por IPTG (pTrc99A).

### 8.1.2 Resumen de resultados y discusión

El efecto de sobreexpresión se evaluó durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria de los cultivos. El nivel de actividad específica de las enzimas analizadas fue incrementado entre 2 y 30 veces respecto a los niveles basales de la cepa control KO11/pTrc99A.

En comparación con la cepa control KO11/pTrc99A, durante la fase exponencial: A) en todos los casos no se afectó la velocidad específica de crecimiento; B) el flux de consumo de glucosa se redujo 63.4% y 67.8% al incrementarse las actividades específicas de PFK<sub>Ec</sub> y PYK<sub>Bs</sub>, respectivamente, y en los otros casos no se afectó; C) en consecuencia, el flux de etanol disminuyó 35.9% y 50.7% cuando se sobreexpresó *pfk<sub>Ec</sub>* y *pyk<sub>Bs</sub>*, respectivamente, sin afectarse en los otros casos. Estos resultados muestran que al incrementar la actividad de PFK<sub>Ec</sub> o PYK<sub>Bs</sub> en KO11 se reduce drásticamente el flux de consumo de glucosa y de formación de etanol, así como un mayor flux de formación de ácidos orgánicos, en respuesta a efectos de regulación alostérica, debidos a una mayor velocidad de formación y acumulación de fosfoenolpiruvato y ATP; y una posible actividad limitada de PDC para canalizar el flux hacia la formación de etanol.

Para la fase estacionaria (comparando con la cepa KO11/pTrc99A): se encontró que: A) el flux de consumo de glucosa se redujo 43 y 11% al incrementar la actividad de PFK<sub>Ec</sub> y PYK<sub>Bs</sub>, respectivamente, y se incrementó 13% al aumentar 6 veces la actividad enzimática de PDC, en los otros casos no

se afectó; B) congruentemente, el flux de etanol disminuyó 51 y 33% sobreexpresando *pfk<sub>Ec</sub>* y *pyk<sub>Bs</sub>*, respectivamente, sin afectarse para los casos de *galP<sub>Ec</sub>* y *pgk<sub>Ec</sub>*.

Los resultados mostraron que en KO11, existe una actividad limitada de PDC<sub>Zm</sub> para canalizar el flux de glucosa o xilosa hacia la formación de etanol. Se logró incrementar el rendimiento teórico de conversión de glucosa o xilosa en etanol en 27%, durante la fase estacionaria el flux de formación de etanol aumento 42 y 44% y el de formación de ácidos orgánicos disminuyó 46 y 76% para glucosa y xilosa, respectivamente al incrementar la actividad intracelular de PDC<sub>Zm</sub> (6.1 veces) en KO11. Por otro lado, probablemente como una respuesta a efectos de regulación alostérica y de actividad limitada de PDC<sub>Zm</sub>, incrementos en la actividad enzimática de fosfofructocinasa o piruvatocinasa redujeron drásticamente el flux de consumo de glucosa o xilosa y de formación de etanol, incrementando el de formación de ácidos orgánicos.

En la cepa KO11, la sobreexpresión de *pdc<sub>Zm</sub>* permitió incrementar el flujo glucolítico y de producción de etanol durante la fase estacionaria, con una concomitante disminución del flux de carbono hacia la formación de ácidos orgánicos. Esto debido a que PDC<sub>Zm</sub> tiene una mayor afinidad por el piruvato en comparación con lactato deshidrogenasa, y al igual que esta ultima, regenera los niveles de NAD<sup>+</sup>, para mantener activa glucólisis. Adicionalmente el incremento en el nivel de PDC<sub>Zm</sub> permite canalizar mayor cantidad de piruvato hacia etanol, disminuyendo tanto el efecto de inhibición alosterica sobre PTS y activacion de lactato deshidrogenasa ocasionado por acumulacion de piruvato (Tarmy y Kaplan 1968). Estos datos confirman que la actividad enzimática de PDC limita el flux de piruvato hacia la formación de etanol.

Los detalles de esta parte del trabajo y los resultados en extenso se muestran en el manuscrito que se presenta en las siguientes páginas: Gerardo Huerta-Beristain, José Utrilla, Georgina Hernández-Chávez, Francisco Bolívar, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez. Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate

decarboxylase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15, 55-64, 2008.

## 8.1.3 Presentación de manuscrito

Journal of  
Molecular Microbiology  
and Biotechnology

J Mol Microbiol Biotechnol 2008;15:55–64  
DOI: 10.1159/000111993

## Specific Ethanol Production Rate in Ethanologenic *Escherichia coli* Strain KO11 Is Limited by Pyruvate Decarboxylase

Gerardo Huerta-Beristain José Utrilla Georgina Hernández-Chávez  
Francisco Bolívar Guillermo Gosset Alfredo Martinez

Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

### Key Words

*Escherichia coli* · Fuel ethanol · Pyruvate decarboxylase · Phosphofructokinase · Pyruvate kinase · Glycolytic flux · Metabolic engineering · Metabolic control

metabolic control analysis showed that ethanol flux in KO11 is negatively controlled by phosphofructokinase and pyruvate kinase, and positively influenced by the PDC<sub>Zm</sub> activity level.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

### Abstract

Modification of ethanol productivity and yield, using mineral medium supplemented with glucose or xylose as carbon sources, was studied in ethanologenic *Escherichia coli* KO11 by increasing the activity of five key carbon metabolism enzymes. KO11 efficiently converted glucose or xylose to ethanol with a yield close to 100% of the theoretical maximum when growing in rich medium. However, when KO11 ferments glucose or xylose in mineral medium, the ethanol yields decreased to only 70 and 60%, respectively. An increase in GALP<sub>Ec</sub> (permease of galactose-glucose-xylose) or PGK<sub>Ec</sub> (phosphoglycerate kinase) activities did not change xylose or glucose and ethanol flux. However, when PDC<sub>Zm</sub> (pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*) activity was increased 7-fold, the yields of ethanol from glucose or xylose were increased to 85 and 75%, respectively, and organic acid formation rates were reduced. Furthermore, as a response to a reduction in acetate and ATP yield, and a limited PDC<sub>Zm</sub> activity, an increase in PFK<sub>Ec</sub> (phosphofructokinase) or PYK<sub>Bs</sub> (pyruvate kinase from *Bacillus stearothermophilus*) activity drastically reduced glucose or xylose consumption and ethanol formation flux. This experimental

### Introduction

Metabolic engineering can be defined as the direct improvement in product formation or cellular properties through the modification of specific biochemical reactions or introduction of new ones with the use of recombinant DNA technology [Stephanopoulos, 1999]. One of the several applications of metabolic engineering deals with the improvement in productivity and yield of native or heterologous products synthesized by cells. Modifying gene expression using recombinant DNA technology can increase specific productivity or metabolic flux and thus lead to better production strains.

Several technologies are currently being developed to reduce energy dependence on fossil fuels and to minimize environmental pollution. Fuel ethanol can be produced in a sustainable way using sugars as raw material. It can also potentially be obtained at a reduced cost from agricultural residues [Aristidou and Penttilä, 2000; Himmel et al., 1997; Ingram et al., 1998]. Lignocellulosic biomass is the most abundant source of sugars [Ingram et al.,

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel  
1464–1801/08/0151–0055\$24.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/mmb

Alfredo Martinez  
Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250 (Mexico)  
Tel. +52 777 329 16 01, Fax +52 777 317 2388, E-Mail alfredo@ibt.unam.mx

1999], but those sugars are polymerized in the hemicellulose and cellulose fractions. Biomass hydrolysis mainly produces hexoses, as glucose, and pentoses, as xylose [Aristidou and Penttilä, 2000; Ingram et al., 1999]. Natural ethanologenic microorganisms, such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* do not metabolize pentoses to ethanol, and the economics of this process requires an efficient conversion of all the sugars to ethanol. Wild-type *Escherichia coli* strains can use a wide range of hexoses and pentoses, including glucose and xylose, as carbon and energy sources. *E. coli* can metabolize all these sugars under anaerobic conditions to pyruvic acid, and thereafter to a mixture of formate, acetate, lactate, succinate and a small amount of ethanol [Böck and Sawers, 1996].

*E. coli* has been engineered for ethanol production [Ingram et al., 1998, 1999; Ohta et al., 1991]. Ethanologenic strain KO11 (one of the most promising strains for industrial applications) is a prototrophic *E. coli* B derivative that contains the *Z. mobilis* ethanol pathway integrated into its chromosome, i.e. pyruvate decarboxylase (PDC) coded by *pdc* and alcohol dehydrogenase coded by *adhB*, under the control of the pyruvate formate lyase (*pfl*) promoter. It also contains a deletion of the anaerobic fumarate reductase gene, which eliminates succinate production [Ingram et al., 1998; Ohta et al., 1991]. Ethanologenic *E. coli* KO11 can use a wide array of sugars [Ingram et al., 1999; Ohta et al., 1991], and its ethanol production capacity has been proven to be very efficient in complex media supplemented with glucose or xylose [Gonzalez et al., 2002, 2003; Ohta et al., 1990; Tao et al., 2001], and also in media containing hemicellulose hydrolysates supplemented with complex nutrients [Martinez et al., 1999]. KO11 has, on average, a specific ethanol production rate ( $q_{Et-OH}$ ) of about 0.8  $g_{Et-OH}/g_{DCW}\cdot h$  during the growth phase in rich media supplemented with xylose, calculated from data presented by Tao et al. [2001]. Microorganisms used for industrial ethanol production, such as *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* have a  $q_{Et-OH}$  of 0.5–0.8 [Garay-Arroyo et al., 2004] and up to 2.5  $g_{Et-OH}/g_{DCW}\cdot h$  [Rogers et al., 1979], respectively, using glucose. Furthermore, with strain KO11, the ethanol yield on glucose or xylose is close to 100% of the theoretical maximum when rich medium is used. However, when mineral medium with glucose or xylose or hemicellulose hydrolysate supplemented with salts is used, conversion yield and specific ethanol production rates are drastically reduced [Martinez et al., 1999, 2001; Underwood et al., 2002b]. In this report, an experimental metabolic control study was conducted using mineral media to evaluate the potential to increase  $q_{Et-OH}$  in KO11. This was achieved by

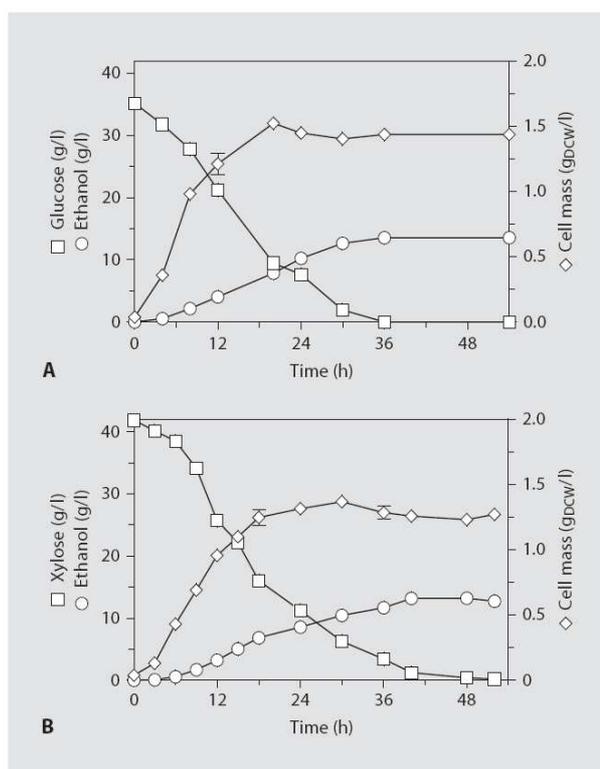


Fig. 1. Fermentation of glucose (A) and xylose (B) by ethanologenic *E. coli* KO11 in M9 mineral media.

modulating the enzyme levels that catalyze key glycolytic steps: glucose or xylose transport, reactions related to ATP consumption or production and pyruvate conversion into acetaldehyde.

## Results and Discussion

### Analysis of Glucose and Xylose Metabolism in *E. coli* KO11 when Grown in Mineral Media

In order to assess *E. coli* KO11 performance in mineral media and reveal whether a metabolic step limits ethanol flux, a systematic study was carried out by increasing specific activities of key carbon metabolism enzymes. KO11 fermentation performance was evaluated using M9 mineral media supplemented with glucose or xylose (fig. 1). A 4% sugar concentration was selected in order to diminish osmotic pressure effects. In comparison with rich medium [Tao et al., 2001], the growth rate and biomass formation were drastically reduced (25 and 60%,

**Table 1.** Recombinant enzyme-specific activities (IU/mg<sub>PROT</sub>) in *E. coli* KO11

Strain	PFK		PGK		PYK		PDC	
	Glc	Xyl	Glc	Xyl	Glc	Xyl	Glc	Xyl
KO11/pTrc99A	0.63	0.85	1.35	1.14	0.98	1.18	0.37	0.54
Transformed KO11	3.73	4.11	3.99	3.10	46.42	37.46	1.83	4.31

*E. coli* KO11 was transformed with pTrc99A or derivative plasmids containing genes coding for the indicated enzymes. Cells were harvested from pH-controlled mini-fleakers at exponential growth using the indicated sugar (see details in the Experimental Procedures section). The inducer (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) level was 0.1 mM.

respectively) using either glucose or xylose. In addition, the specific sugar consumption rate was also reduced, therefore a low ethanol formation volumetric rate was observed: 0.42 and 0.33 g<sub>Et-OH</sub>/l·h for glucose and xylose, respectively, versus 0.8 g<sub>Et-OH</sub>/l·h when rich media supplemented with glucose or xylose are used [Tao et al., 2001]. Ethanol yields were only 70 and 60% of the theoretical maximum, for glucose and xylose respectively. These low yields could be explained by considering that in mineral media sugars are utilized both as a carbon source for growth and for energy and product(s) formation. In contrast, in rich media, such as Luria broth (LB), complex nutrients can be used to build up cell mass and sugars are mainly used for energy and product formation [Ohta et al., 1991].

*GALP<sub>Ec</sub>, PFK<sub>Ec</sub>, PGK<sub>Ec</sub>, PYK<sub>Bs</sub> and PDC<sub>Zm</sub> Activities in Transformed KO11*

In comparison with the parental strain *E. coli* B, when KO11 fermented xylose in rich media, the specific growth and xylose consumption rates increased 30 and 50%, respectively [Tao et al., 2001]. Gene array data have suggested that increased expression of six genes from glycolysis (*pfkA*, *fbaA*, *tpiA*, *gapA*, *pgk* and *pykF*), involved in xylose or glucose catabolism, is the basis for the observed increase in growth rate and glycolytic flux in KO11 [Gonzalez et al., 2002; Tao et al., 2001]. In order to evaluate if it is possible to increase the ethanol yield and its specific rate of production in KO11 using mineral media, it was decided to study five key carbon metabolism activities that potentially could affect glucose and xylose metabolism. KO11 was transformed with plasmids containing genes encoding for the following proteins: the galactose-glucose-xylose transporter (*GALP<sub>Ec</sub>*); the *E. coli* phosphofructokinase (*PFK<sub>Ec</sub>*) that catalyzes the reaction of fructose-6-phosphate into fructose-1,6-biphosphate

using ATP; the homologous phosphoglycerate kinase (*PGK<sub>Ec</sub>*) that catalyzes the reaction of 1,3-diphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate with ATP formation; the pyruvate kinase (*PYK*) of *Bacillus stearothermophilus* (*PYK<sub>Bs</sub>*) that generates ATP and pyruvate from phosphoenolpyruvate (PEP; this enzyme is not regulated allosterically by fructose-1,6-biphosphate, nevertheless it is activated by AMP and ribose-5-phosphate), and the PDC of *Z. mobilis* (*PDC<sub>Zm</sub>*), which converts pyruvate to acetaldehyde and CO<sub>2</sub>.

Derivative strains of KO11 transformed with plasmids were grown in M9 mineral media with glucose or xylose as the sole carbon and energy sources. 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside was added to induce gene expression. Under these conditions, the average activity values when grown in glucose or xylose for *PFK<sub>Ec</sub>*, *PGK<sub>Ec</sub>*, *PYK<sub>Bs</sub>* and *PDC<sub>Zm</sub>* were increased 5-, 3-, 39- and 7-fold, respectively (table 1). A previous report using a strain transformed with plasmid *pgalP<sub>Ec</sub>* and grown in minimal medium with glucose indicated that substrate transport activity was increased 1.5-fold [Hernández-Montalvo et al., 2003]. Differences in enzymatic activity among the four enzymes could be due to different spacing between the Shine-Dalgarno sequence (ribosome binding site) and the initiation codon, different initiation codons, ribosome binding site secondary structure, or other factors [Vellanoweth et al., 1992]. Furthermore, it has been reported that specific activities of purified enzyme is 3-fold higher for *PYK<sub>Bs</sub>* than for *PYK<sub>Ec</sub>* [Sakai et al., 1986; Waygood and Sanwal, 1974].

*GALP<sub>Ec</sub> and PGK<sub>Ec</sub> Activities Do Not Control Carbon Flux to Ethanol*

It has been reported that in *E. coli* strains without a functional phosphotransferase system, *GALP<sub>Ec</sub>* can replace glucose transport [Flores et al., 2002; Hernández-

**Table 2.** Ethanol yields from glucose or xylose in *E. coli* KO11 transformed with the different plasmids used in this work

Plasmid	Yield <sup>a</sup> , % theoretical	
	glucose	xylose
pTrc99A	67 (2.7)	60 (5.7)
pgalP <sub>Ec</sub>	66 (1.4)	55 (1.0)
ppfk <sub>Ec</sub>	69 (0.0)	46 (5.1)
ppgk <sub>Ec</sub>	68 (2.5)	58 (7.8)
ppyk <sub>Bs</sub>	65 (0.0)	51 (0.7)
ppdc <sub>Zm</sub>	85 (4.1)	76 (5.2)

<sup>a</sup> Values in parentheses indicate standard error from calculations.

Montalvo et al., 2003]. In addition, it has been shown that GALP can transport xylose; therefore, an *E. coli* strain overexpressing *galP* could increase the glucose or xylose consumption capacity [Hernández-Montalvo et al., 2001]. Nevertheless, as can be seen in table 2, increased levels of GALP<sub>Ec</sub> or PGK<sub>Ec</sub> do not have a significant effect on ethanol yield from glucose or xylose. It has been reported that *pgk*<sub>Ec</sub> expression is regulated by the growth phase, and the synthesis of PGK is induced more than 10-fold during transition from the exponential to the stationary growth phase [Nelleman et al., 1989]; however, such an activity increase does not provoke a corresponding increase in the glycolytic flux. Actually, the glycolytic flux decreased during the stationary phase, possibly due to a decrease in other glycolytic enzymes [Nelleman et al., 1989]. For *S. cerevisiae*, it had been reported that, with the exception of *pyk*, all glycolytic genes (including *pgk*) have strong promoters [Hauf et al., 2000], and no increase in the glycolytic or ethanol flux could be achieved when *pgk* was overexpressed in *S. cerevisiae*. On the other hand, Snoep et al. [1995] found that an increase in PGK activity in *Z. mobilis* caused a negative effect on the glycolytic flux. Consistent with these previous reports, our results showed that a 3-fold increase in the PGK activity in KO11 did not have a significant effect on the specific glucose or xylose consumption rate or ethanol production. Therefore, these data indicate that glucose or xylose transport and 3-phosphoglycerate formation might not be bottlenecks to carbon flux in KO11 under the conditions studied.

*PFK<sub>Ec</sub> and PYK<sub>Bs</sub> Activities Negatively Control Carbon Flux to Ethanol*

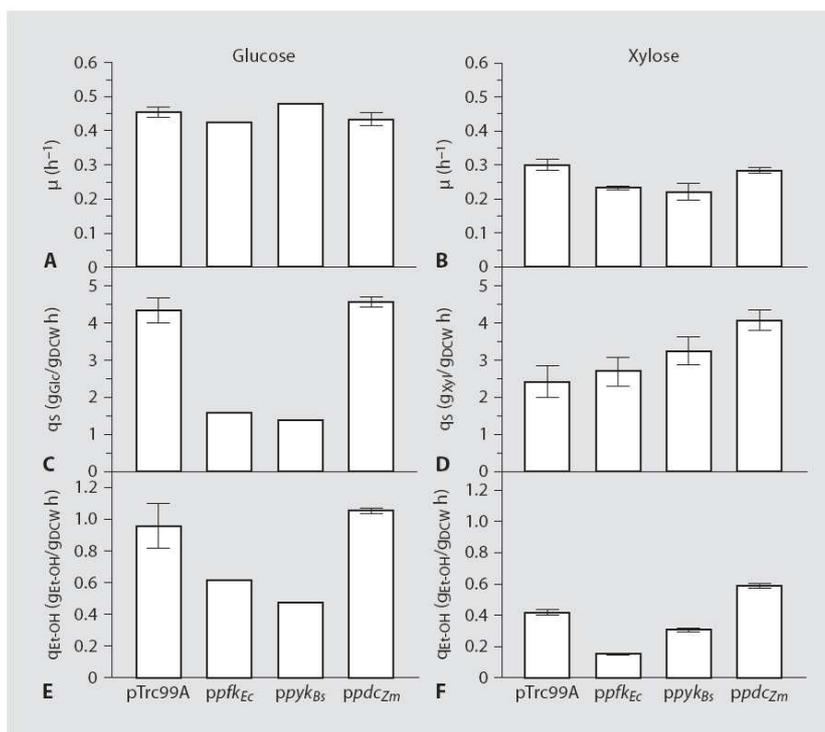
Figure 2 shows the glucose and xylose catabolism pathways to fermentation products in KO11. Growth

rates of plasmid-transformed strains in glucose-mineral media were similar to those observed in control experiments (fig. 3A). The specific glucose consumption rates decreased by 63 and 68% when PFK<sub>Ec</sub> and PYK<sub>Bs</sub> activities were increased compared to KO11/pTrc99A (fig. 3C), and hence the specific ethanol production rates decreased by 36 and 51%, respectively (fig. 3E). On the other hand, strains KO11/ppfk<sub>Ec</sub> and KO11/ppyk<sub>Bs</sub> grown in xylose displayed slightly lower specific growth rates when compared to KO11/pTrc99A (fig. 3B). Specific xylose consumption rates were not affected when KO11 was transformed with *ppfk*<sub>Ec</sub> or *ppyk*<sub>Bs</sub> (fig. 3D), but specific ethanol production rates decreased by 64 and 26%, respectively. Under anaerobic conditions, the ATP yield from xylose catabolism to pyruvate is 0.67 mol<sub>ATP</sub>/mol<sub>Xyl</sub> and it could increase up to 1.67 if 1 mole of acetate is produced per mole of xylose [Tao et al., 2001; Gonzalez et al., 2002]. KO11/ppfk<sub>Ec</sub> and KO11/ppyk<sub>Bs</sub> produced less acetate in comparison with the strain KO11/pTrc99A when grown with xylose, therefore the growth rate reduction could be attributed to a low ATP yield.

During the stationary phase, in comparison to the control strain KO11/pTrc99A, when PFK<sub>Ec</sub> or PYK<sub>Bs</sub> activities were increased, a reduction in glucose consumption rate by 43 and 11%, respectively, was observed (fig. 4). Also in KO11/ppfk<sub>Ec</sub> and KO11/ppyk<sub>Bs</sub> the flux to acetate production decreased by 26 and 46%, respectively, and the formate production rate was decreased by 10 and 33%, respectively. In contrast, glycolytic flux to lactate increased 40 and 35%, respectively. Because of this flux redistribution, ethanol flux diminished by 49 and 33% for KO11/ppfk<sub>Ec</sub> and KO11/ppyk<sub>Bs</sub>, respectively. A large decrease (38%) in ethanol flux was observed when PFK<sub>Ec</sub> activity was increased when grown using xylose; however, fluxes to acetate and formate remained relatively constant, and flux to lactate decreased by one order of magnitude (fig. 4). Increased PYK<sub>Bs</sub> activity reduced acetate and formate production by half; however, xylose flux into ethanol was similar to that in the control strain during the stationary phase. As proposed by Emmerling et al. [1999], when PFK activity is increased, higher lactate production can be explained by a saturation effect in the middle section of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway, and activation of the methylglyoxal pathway which also renders dihydroxyacetone phosphate conversion to lactate. Furthermore, higher PFK and PYK activities could also increase the pyruvate pool, and since this metabolite can act as an allosteric activator of lactate dehydrogenase [Tarmy and Kaplan, 1968], an increase in the flux into lactate is expected.



**Fig. 3.** Summary of results for the exponential phase of cultures with glucose (**A**, **C**, **E**) and xylose (**B**, **D**, **F**). Specific growth rate ( $\mu$ ; **A**, **B**). Specific sugar consumption ( $q_s$ ; **C**, **D**). Specific ethanol formation ( $q_{Et-OH}$ ; **E**, **F**). Legends at the bottom indicate plasmids used to transform KO11.



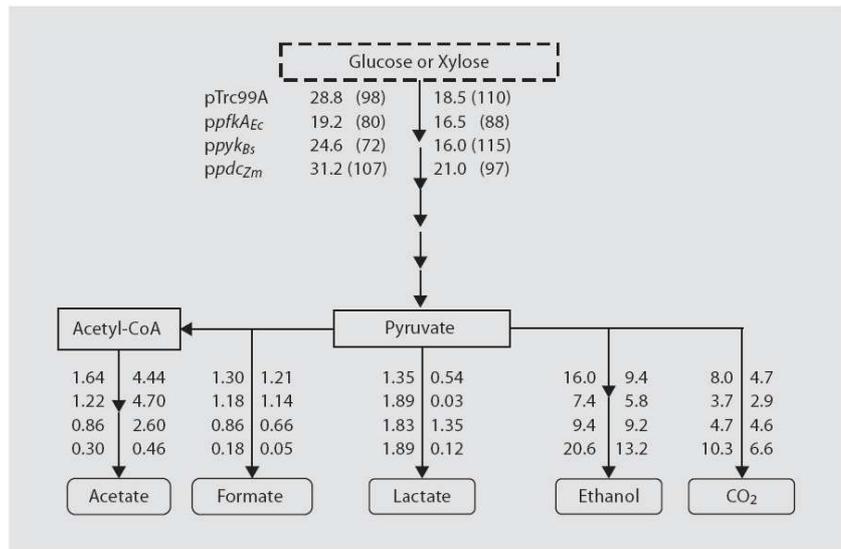
PYK catalyzes the conversion of PEP and ADP into pyruvate and ATP. In this work, the increase in the enzymatic activity of  $PYK_{Bs}$  in KO11, led to a reduced glycolytic flux (fig. 3, 4). It is known that ATP has a significant in vivo inhibitory effect over phosphofructokinase (PFK) and PYK. Nevertheless, perhaps other kinases, such as the phosphoglycerate and acetate kinases, are inhibited as well, as happens in *S. cerevisiae* [Larsson et al., 2000]. Furthermore, it has been suggested for *S. cerevisiae* and verified for *E. coli*, both grown under aerobic conditions, that a high ATP demand causes an increase in glycolytic flux [Koebmann et al., 2002b; Larsson et al., 2000]. Under the non-aerated conditions used in our work, ATP production is covered by glycolysis and acetate production. An increased level of  $PYK_{Bs}$  did not modify the ethanol flux, but did decrease the glucose and xylose consumption rates. Less acetate was produced using both carbon sources (fig. 4), reducing the ATP yield, which in conjunction with the high increment in PYK activity could provoke a metabolic burden that negatively affects the sugar consumption rate. In addition, the flux into lactate was increased, probably because of the higher pyruvate availability and LDH activation by increased levels of this metabolite [Tarmy and Kaplan, 1968] and a possible limitation

to channel pyruvate excess to ethanol. These results suggested that elimination of competing pathways, such as the one for lactate synthesis, and an increase in the activities of enzymes of the ethanologenic heterologous pathway could increase carbon flow to ethanol in KO11.

#### *PDC<sub>Zm</sub> Activity Limits Carbon Flux to Ethanol*

When strain KO11 was grown under anaerobic conditions, it produced ethanol, lactate, acetate and formate (fig. 2, 4). In strain KO11/*ppdc<sub>Zm</sub>*, 7-fold *PDC<sub>Zm</sub>* amplification did not increase the ethanol flux during the exponential phase on glucose cultures (fig. 3E). The specific glucose consumption rate was not affected under these conditions (fig. 3C). During the stationary phase, *PDC<sub>Zm</sub>* increased activity, significantly decreased acetate and formate fluxes, and the glucose uptake rate was increased by 8.3%; the combination of these factors increased the ethanol flux by 29%. When xylose was used as the carbon source, the specific xylose consumption rate and ethanol flux increased by 68 and 40%, respectively, during the growth phase (fig. 3D, F). During the stationary phase, fluxes to acetate and formate were reduced by 10- and 25-fold in comparison with control culture (KO11/*pTrc99A*), the xylose consumption rate increased by 14%,

**Fig. 4.** Summary of results for the stationary phase. Fluxes are shown in millimoles of carbon per  $g_{DCW}$  per hour ( $mmol_{Carbon}/g_{DCW} h$ ). Results for batch cultures using glucose (data on left side) and xylose (data on right side). Values in parentheses indicate the percentage of carbon recovery. Legends on the left side indicate the plasmids used to transform KO11 (pTrc99A = control experiment).



and the ethanol flux increased by 40%. These results with both sugars demonstrated that PDC<sub>Zm</sub> activity in KO11 is limiting and hence positively controls the flux to ethanol formation, since a 7-fold amplification of its activity caused a 1.3-fold increase into the ethanol flux. It was also observed that increased PDC<sub>Zm</sub> activity stimulates glucose and xylose consumption rates.

When xylose was used with strain KO11/ppdc<sub>Zm</sub>, with the exception of the flux into acetate, all other carbon fluxes (formate and lactate flux) were lower in comparison with the fluxes observed in the cultures with glucose. We suggest that the lower ATP yield attained when xylose is used as carbon and energy source (0.67 mol of ATP per mol of xylose) caused a low energy state in the cell that induced the ACK-PTA pathway (fig. 2), probably channeling more pyruvate into acetate and thus increasing ATP availability. Estimated CO<sub>2</sub> values are included in figure 4 to show that carbon balance fits close to 100% for experiments with strain KO11 transformed with either pTrc99A or ppdc<sub>Zm</sub>. Some glucose was missing in experiments with ppfkA<sub>Ec</sub> and ppyk<sub>Bs</sub>. It is suggested that more CO<sub>2</sub> was produced in other pathways (like the pentose phosphate pathway and formate conversion to CO<sub>2</sub>), and some carbon was directed to other metabolites that we did not measure (i.e. glycerol).

#### Ethanol Yield and Physiological Explanation

Amplification of some enzymatic activities tested in this work had a strong impact on flux distribution, and therefore in sugar conversion to ethanol (table 2). In com-

parison with the control strain KO11/pTrc99A, no significant change was observed in ethanol yield when activities for GALP, PFK<sub>Ec</sub>, PGK<sub>Ec</sub> and PYK<sub>Bs</sub> were amplified in cultures using glucose. When xylose was utilized, no change was observed with PGK<sub>Ec</sub>, but a reduction of 25 and 15% in ethanol yield was observed for PFK<sub>Ec</sub> and PYK<sub>Bs</sub>, respectively. However, an improvement of 27% in yield was observed when PDC<sub>Zm</sub> was overexpressed using either glucose or xylose. These data support the hypothesis that PDC<sub>Zm</sub> is the limiting reaction in the KO11 ethanologenic strain and, in concordance with others work, indicated that the glycolytic flux is controlled by reactions outside glycolysis [Koebmann et al., 2002b].

Underwood et al. [2002b] described that the ethanol yield of a xylose fermenting KO11 in mineral salts medium can be increased from 63 to 94% by addition of acetate to the medium. In addition, a mutation in the *ack* gene also increased the ethanol yield to 93%, identifying that the need for acetate is due to a rapid reduction in acetyl-CoA to ethanol, at the expense of carbon for glutamate synthesis to overcome the osmotic effect of 90 g/l xylose in the medium. These studies suggested that the PDC activity level does not limit the ethanol yield. However, since the concentration of sugars used in the present study was only 40 g/l, a significant osmotic effect is not expected. Underwood et al. [2002a, b] also described that a reduction in the level of NADH, which is an allosteric inhibitor of citrate synthase, through the addition of pyruvate or acetaldehyde, or the replacement of the homologous *E. coli* citrate synthase with a non-allosterically regulated

**Table 3.** Strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant genotype	Source
Strains		
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>recA</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> B	prototrophic	ATCC11303
<i>E. coli</i> KO11	<i>E. coli</i> B $\Delta$ <i>frd</i> , <i>pfl</i> :: <i>pdC adhB cat</i>	Ohta et al. [1991]
Plasmids		
(pTrc99A derivatives)		
<i>pgalP<sub>Ec</sub></i>	<i>bla</i> , <i>galP<sub>Ec</sub></i>	Hernández-Montalvo et al. [2003]
<i>ppfkA<sub>Ec</sub></i>	<i>bla</i> , <i>pfkA<sub>Ec</sub></i>	Emmerling et al. [1999]
<i>ppgk<sub>Ec</sub></i>	<i>bla</i> , <i>pgk<sub>Ec</sub></i>	This work
<i>ppyk<sub>Bs</sub></i>	<i>bla</i> , <i>pyk<sub>Bs</sub></i>	Emmerling et al. [1999]
<i>ppdc<sub>Zm</sub></i>	<i>bla</i> , <i>pdC<sub>Zm</sub></i>	This work
pUC19 derivatives		
pLOI276	<i>bla</i> , P <sub>lac</sub> <i>pdC</i>	Conway et al. [1987b]
pTOPO derivatives		
IpTOPO- <i>pdC</i>	<i>kan</i> , <i>pdC<sub>Zm</sub></i>	This work

*Ec* = *E. coli*; *Bs* = *B. stearothermophilus*; *Zm* = *Z. mobilis*.

enzyme from *Bacillus subtilis*, increases the flux to ethanol. These data are in agreement with the results presented here, because a larger flux to ethanol, mediated through a higher PDC activity, reduces NADH availability and therefore diminishes citrate synthase inhibition.

Altogether, these results demonstrate that PDC<sub>Zm</sub> limits the flux to ethanol through a decrease in the NADH availability in glycolysis, and competes directly for the pyruvate pool with fermentative branches in strain KO11. However, it cannot be discarded that part of the glycolytic flux control may be distributed over other glycolytic reactions of the pathway, perhaps in combination with ATP-consuming processes.

### Experimental Procedures

#### Strains and Plasmids

The strains and plasmids used in this work are listed in table 3. The prototrophic ethanologenic *E. coli* strain KO11 [Ohta et al., 1991], an *E. coli* B derivative, was used in all fermentation experiments. Strain XL1Blue was used for plasmid propagation and amplification. Strain KO11 was used as the host to study the effect of the modulated expression of genes coding for selected enzymes. For all the recombinant DNA techniques, cells were grown in LB agar plates [Maniatis et al., 1982] containing 20 g/l of glucose. Ampicillin was used for selection and propagation of flask cultures at 200 and 50 mg/l in fermentation experiments. Transformation with the plasmids shown in table 3 was performed using the standard CaCl<sub>2</sub> chemical method to generate KO11 competent cells [Maniatis et al., 1982]. Stock cultures were stored in 40%

glycerol at -70°C. Working cultures were transferred to LB solid medium containing 2% glucose or xylose and chloramphenicol (40 mg/l) for KO11, and chloramphenicol and ampicillin for KO11 containing pTrc99A<sup>TM</sup> derivatives.

The full-length gene sequence for *pgk<sub>Ec</sub>* was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification using specific primers designed according to the known sequences reported in WIB Argonne National Laboratory (<http://www.kegg.com/>). The nucleotide sequences of primers used are 5'-C GAG AGG ATC ACC ATG GCG TGA ATT AAG ATG ACC G-3' and 5'-C GAC GGT ACC GTG ATT TTT TAC TTC TTA GCG CGC-3' (initial and terminal codons are highlighted in bold type and recognition sequences for *Nco* I and *Kpn* I are underlined). The PCRs using genomic DNA as template from *E. coli* B were as follows: 1 cycle of 10 min at 95°C; 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, 3 min at 68°C, and 1 cycle of 10 min at 68°C. This fragment (1.2 kb) was simultaneously digested with *Nco*I and *Kpn*I, purified, and cloned in pTrc99A<sup>TM</sup> (previously digested with the same two restriction enzymes). *ppgk<sub>Ec</sub>* (5.33 kb) construction was verified by restriction analysis and enzymatic activity.

The *pdC<sub>Zm</sub>* gene was amplified by PCR using DNA from plasmid pLOI276 [Conway et al., 1987a] as template. Primers used for the amplification of *pdC<sub>Zm</sub>* were 5'-GT CGG CCG GCC AAG GAG GAG TAA GCA ATG AGT TAT ACT GTC GG-3' and 5'-GG CGC GCC TTA CGG CTG TTG GCG GGC AGC-3' (initial and terminus codons are highlighted in bold type and recognition sequences for *Fse*I and *Asc*I are underlined). The resulting fragment (1.72 kb) was cloned in pCR-BluntII-TOPO<sup>TM</sup>, to obtain plasmid IpTOPO-*pdC<sub>Zm</sub>*. This plasmid was digested with *Eco*RV (5' end) and *Bam*HI (3' end) and the 1.77-kb fragment containing gene *pdC<sub>Zm</sub>* was purified and cloned in pTrc99A<sup>TM</sup> (previously digested with *Sma*I and *Bam*HI). The resulting plasmid *ppdc<sub>Zm</sub>* (5.95 kb) was verified by restriction analysis and enzymatic activity.

## Inocula Development

Three fresh colonies were transferred to culture tubes containing 3 ml of LB. Suspensions were transferred to 500-ml conical flasks containing 200 ml of medium LB-glucose (2%), and incubated for 12 h at 35°C and 120 rpm (C24C shaking incubator, New Brunswick Scientific Inc., New Brunswick, N.J., USA) with proper antibiotics. Enough cells were spun down to obtain an initial  $OD_{600\text{ nm}}$  of 0.1 (roughly equivalent to 0.037  $g_{DCW}/l$ ) in all cultures.

## Media Composition and Culture Conditions

Batch fermentations were performed with M9 mineral medium [Maniatis et al., 1982] supplemented with 40 g/l of glucose or xylose (pH adjusted to 7.0 with 2 N KOH), per liter: 6 g  $Na_2HPO_4$ , 3 g  $KH_2PO_4$ , 1 g  $NH_4Cl$  and 0.5 g NaCl. The following components were sterilized by filtration and then added (per liter of final medium): 2 ml of 1 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 ml of 0.1 M  $CaCl_2$ , 1 ml of 1 mg/ml thiamine-HCl. Cultures were carried out in fleaker mini-fermentors [Beall et al., 1991] containing 200 ml medium, 50 mg/l of ampicillin and 0.1 mM of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, without aeration, at 35°C, pH 7, and 100 rpm. pH was maintained constant with KOH 2 N automatic additions. All fermentations were carried out one time in duplicate; average and standard errors are shown in plots and tables.

## Analytical Methods

Growth was determined spectrophotometrically as optical density at 600 nm (DU-70, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, Calif., USA) and converted to dry cell weight per liter using a calibration curve (1 optical density = 0.37  $g_{DCW}/l$ ). Samples were centrifuged and cell-free culture broth was frozen until analysis. Acetic, formic, succinic, lactic, and pyruvic acids were determined by HPLC analysis (Waters U6K, Millipore Co., Milford, Mass., USA), using an Aminex HPX-87H ion exclusion column (300  $\times$  7.8 mm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA). 5.0 mM  $H_2SO_4$  solution was used as mobile phase (0.5 ml/min) at 50°C and a photodiode array detector at 210 nm (Model 996, Waters, Millipore Co.). Glucose was determined with an enzymatic analyzer (Model 2700, Yellow Spring Instruments, Co. Inc., Yellow Springs, Ohio, USA). Ethanol was analyzed by gas chromatography using n-butanol as internal standard (6850 Series GC System, Agilent, Wilmington, Dela., USA).

## Enzyme Activity Determinations

Cells in exponential growth phase (6 h of fermentation in pH-controlled mini-fleakers) were harvested by centrifugation (10,000 g for 10 min), washed twice with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2 at 4°C), resuspended in the same buffer, and dis-

rupted by sonication using four 15-second pulses in a cold bath (Ultrasonic Disrupter, Soniprep 150). The cell debris was removed by centrifugation (10,000 g, 10 min, 4°C), and the resulting crude cell extracts were immediately used to determine enzymatic activities. Enzyme activities were determined spectrophotometrically (Biomate 5, ThermoSpectronic), coupling reactions to  $NADH^+$  reduction (extinction coefficient of  $6.22\text{ cm}^{-1}\text{ mM}^{-1}$ ) at 340 nm and 30°C. One international unit (IU) of specific enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to convert 1 mmol of substrate into the specific product per minute per milligram of protein. Protein concentrations were measured using the Lowry method [Lowry et al., 1951]. All determinations were performed in triplicate. Enzyme activities were estimated by reported methods: Maitra and Lobo [1971] for PFK and PGK; Sakai et al. [1986] for PYK; and Hoppner and Doelle [1983] and Martinez et al. [1999] for PDC.

## Parameter Calculations

Specific growth rates were calculated as the slope of linear regressions of the  $\ln$  of  $g_{DCW}/l$  vs. time during the exponential growth phase. Specific rates of glucose or xylose consumption ( $q_s$ ), ethanol production ( $q_{Et-OH}$ ), and fermentation product production (acetate, formate, lactate, etc.) were estimated as the specific growth rate multiplied by the corresponding yield on cell mass formation during the exponential phase. Specific rates were also estimated during the stationary phase, as the ratio between glucose consumption or product formation, and the product of average dry cellular weight and elapsed time at the onset of stationary phase and glucose depletion. Fluxes during this phase are reported in millimoles of carbon per  $g_{DCW}$  per hour ( $mmol_{Carbon}/g_{DCW} \cdot h$ ). Carbon recovery was estimated from these data, assuming that no biomass was formed during this time, and that stoichiometric amounts of carbon dioxide and ethanol are produced.

## Acknowledgements

Strains and plasmids were provided by Dr. Lonnie O. Ingram (KO11, pLOI276), and Uwe Sauer (*ppfk<sub>Ec</sub>* and *ppyk<sub>Bs</sub>*). We thank Mercedes Enzaldo, Juan Hurtado-Ramírez and Arturo Ocadiz-Ramírez for technical assistance, E. López and P. Gaytan for oligonucleotide synthesis, and Susana Romero for IpTOPO-*pdC<sub>Zm</sub>* construction. This work was supported by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) grants: CONACyT – SAGAR-PA 2004-C01-224 and CONACyT – Estado de Morelos MOR-2004-C02-048. G.H.-B. held a scholarship from CONACyT.

## References

- Aristidou A, Penttilä M: Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:187–198.
- 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.
- Böck A, Sawers G: Fermentation; in Neidhardt FC (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. Washington, American Society for Microbiology Press, 1996, vol 1, pp 262–282.
- Conway T, Osman YA, Konnan JI, Hoffmann EM, Ingram LO: Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *J Bacteriol* 1987a;169: 949–954.

- Conway T, Sewell GW, Osman YA, Ingram LO: Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J Bacteriol 1987b;169:2591-2597.
- Emmerling M, Bailey JE, Sauer U: Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. Metab Eng 1999;1:117-127.
- Emmerling M, Bailey JE, Sauer U: Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng 2000;67:623-627.
- Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA, Bolívar F: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by <sup>13</sup>C labeling and NMR spectroscopy. Metab Eng 2002;4:124-137.
- Garay-Arroyo A, Covarrubias AA, Clark I, Niño I, Gosset G, Martínez A: Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. Appl Microbiol Biotechnol 2004;63:734-741.
- Gonzalez R, Tao H, Purvis JE, York SW, Shanmugam KT, Ingram LO: Gene array-based identification of changes that contribute to ethanol tolerance in ethanologenic *Escherichia coli*: comparison of KO11 (Parent) to LY01 (Resistant Mutant). Biotechnol Prog 2003;19:612-623.
- 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.
- Hauf J, Zimmermann FK, Müller S: Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microbiol Technol 2000;26:688-698.
- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chávez G, Bolívar F, Valle F, Gosset G: Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. Biotechnol Bioeng 2003;83:687-694.
- Hernández-Montalvo V, Valle F, Bolívar F, Gosset G: Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. Appl Microbiol Biotechnol 2001;57:186-191.
- Himmel ME, Adney WS, Baker JO, Elander R, McMillan JD, Nieves RA, Sheehan JJ, Thomas SR, Vinzant TB, Zhang M: Advanced bioethanol production technologies: a perspective. ACS Symp Ser 1997;666:2-45.
- Hoppner TC, Doelle HW: Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 1983;17:152-157.
- Ingram LO, Gomez PF, Lai X, Moniruzzaman M, Wood BE, Yomano LP, York SW: Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. Biotechnol Bioeng 1998;58:204-214.
- Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martínez A, Morales F, Saleh A, Underwood SA, Yomano LP, York SW, Zaldivar J, Zhou S: Enteric bacterial catalyst for fuel ethanol production. Biotechnol Prog 1999;15:855-866.
- Koebmann BJ, Andersen HW, Solem C, Jensen PR: Experimental determination of control of glycolysis in *Lactococcus lactis*. Antonie van Leeuwenhoek 2002a;82:237-248.
- 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 2002b;184:3909-3916.
- Lagunas R, Dominguez C, Busturia A, Saez MJ: Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. J Bacteriol 1982;152:19-25.
- Larsson C, Pahlman I-L, Gustafsson L: The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2000;16:797-809.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.
- Maitra PK, Lobo Z: A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. J Biol Chem 1971;246:475-488.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- Martínez A, Rodríguez ME, Wells ML, York SW, Preston JF, Ingram LO: Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. Biotechnol Prog 2001;17:287-293.
- Martínez 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.
- Nelleman LJ, Holm F, Atlung T, Hansen FG: Cloning and characterization of the *Escherichia coli* phosphoglycerate kinase (*pgk*) gene. Gene 1989;77:185-191.
- Ohta K, Alterthum F, Ingram LO: Effects of environmental conditions on xylose fermentation by recombinant *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 1990;56:463-465.
- Ohta K, Beall DS, 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.
- Rogers PL, Lee KJ, Tribe DE: Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. Biotechnol Lett 1979;1:165-170.
- Sakai H, Susuki K, Imahori K: Purification and properties of pyruvate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. J Biochem 1986;99:1157-1167.
- Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann FK: Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. Yeast 1989;5:285-290.
- Snoep JL, Yomano LP, Westerhoff HV, Ingram LO: Protein burden in *Zymomonas mobilis*: negative flux and growth control due to overproduction of glycolytic enzymes. Microbiology 1995;141:2329-2337.
- Stephanopoulos G: Metabolic fluxes and metabolic engineering. Metab Eng 1999;1:1-11.
- Tao H, Gonzalez R, Martínez A, Rodríguez 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.
- Tarmy EM, Kaplan NO: Kinetics of *Escherichia coli* B-D-Lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. J Biol Chem 1968;243:2587-2596.
- Underwood SA, Buszko ML, Shanmugam KT, Ingram LO: Flux through citrate synthase limits the growth of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. Appl Environ Microbiol. 2002a;68:1071-1081.
- Underwood SA, Zhou S, Causey TB, Yomano LP, Shanmugam KT, Ingram LO: Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 2002b;68:6263-6272.
- Vellanoweth RL, Rabinowitz JC: The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo. Mol Microbiol 1992;6:1105-1114.
- Waygood EB, Sanwal BD: The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. I. Physicochemical and regulatory properties of the enzymes activated by fructose 1,6-diphosphate. J Biol Chem 1974;249:265-274.

## **8.2 SEGUNDA ETAPA: Papel de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa homóloga ( $ZWF_{Ec}$ ) o heteróloga ( $ZWF_{Zm}$ ) sobre el efecto de carga metabólica en *E. coli* JM101**

### **8.2.1 Introducción**

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos más utilizado para controlar la expresión de genes homólogos ó heterólogos y llevar a cabo estudios básicos, de producción de proteínas recombinantes o metabolitos de interés comercial. Frecuentemente es necesario utilizar plásmidos multicopia para lograr altos niveles de expresión, sin embargo está estrategia conduce a reducciones drásticas en la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), debido (entre otros factores) a incrementos en la demanda de: nucleótidos y energía para replicar el plásmido; carga de ARN y ribosomas; aminoácidos y poder reductor para sintetizar la(s) proteína(s). La ingeniería metabólica permite dirigir el flujo de carbono a través de vías deseadas y potencialmente abatir la demanda de precursores. En esta parte del trabajo se evaluó como la generación de poder reductor (NADPH o NADH) permite recuperar la  $\mu$  en cepas de *E. coli* con carga metabólica. Se evaluó la generación de NADPH y las relaciones NADPH/NADP<sup>+</sup> y NADH/NAD<sup>+</sup> al sobre-expresar *zwf* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) homóloga de *E. coli* (*zwf<sub>Ec</sub>*), ó *zwf* de *Zymomonas mobilis* (*zwf<sub>Zm</sub>*) en cepas silvestres de *E. coli*.

Para evaluar si es posible evitar la reducción en la velocidad de crecimiento ocasionado en *E. coli* por la replicación y transcripción de plásmidos multicopia, se evaluó el efecto fisiológico de incrementar la disponibilidad de precursores metabólicos de la vía de las pentosas, así como la modificación en las relaciones de NADPH/NADP<sup>+</sup> y NADH/NAD<sup>+</sup>. La evaluación se llevo a cabo mediante incrementos modulados en la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ZWF) de *Z. mobilis* o de *E. coli*. En este contexto  $ZWF_{Zm}$  puede usar indistintamente cada uno de las coenzimas; NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>, sin embargo,  $ZWF_{Ec}$  usa NAD<sup>+</sup> (con una Km de 1.7) o NADP<sup>+</sup> (con una Km de 0.015): la afinidad por NAD<sup>+</sup> es baja en comparación con NADP<sup>+</sup>

(Csonka y Fraenkel 1977). En contraste  $ZWF_{Zm}$  puede usar indistintamente los mismos coenzimas, pero a diferencia de  $ZWF_{Ec}$  la afinidad por  $NAD^+$  es 16 veces mas alta (con una  $K_m$  de 0.105), mientras que la afinidad por  $NADP^+$  es similar (con una  $K_m$  de 0.013)(Scopes 1997).

### 8.2.2 Resumen de resultados y discusión

Las cepas JM101/pTrc99A y JM101/pZWF<sub>Ec</sub> sin inducción por IPTG mostraron una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.54 h<sup>-1</sup> y 0.49 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas velocidades son bajas en comparación con JM101 ( $\mu$  = 0.66 h<sup>-1</sup>). No obstante, cuando se indujo la expresión de  $zwf_{Ec}$  en JM101/pZWF<sub>Ec</sub> con 1  $\mu$ M de IPTG se observa un incremento en la  $\mu$  a 0.52 h<sup>-1</sup>, y a 0.58 h<sup>-1</sup> con 10  $\mu$ M, incrementando también la actividad enzimática de 6 a 60 UI/mg<sub>PROT</sub>. A concentraciones mayores de inductor se obtiene una actividad enzimática mas elevada, pero la  $\mu$  se reduce.

En contraste, el efecto en la velocidad de crecimiento en JM101/pZWF<sub>Zm</sub> sin inducción por IPTG mostró una  $\mu$  de 0.51 h<sup>-1</sup>, y cuando es inducido con 1 a 30  $\mu$ M de IPTG se observa un incremento en la  $\mu$  de 0.55 h<sup>-1</sup> a 0.64 h<sup>-1</sup>. Así mismo, el nivel de actividad enzimática se incrementa de 0.7 – 3.3 UI/mg<sub>PROT</sub>. A concentraciones mayores del inductor (100  $\mu$ M) el nivel de actividad enzimática se incrementa, sin afectarse la velocidad específica de crecimiento.

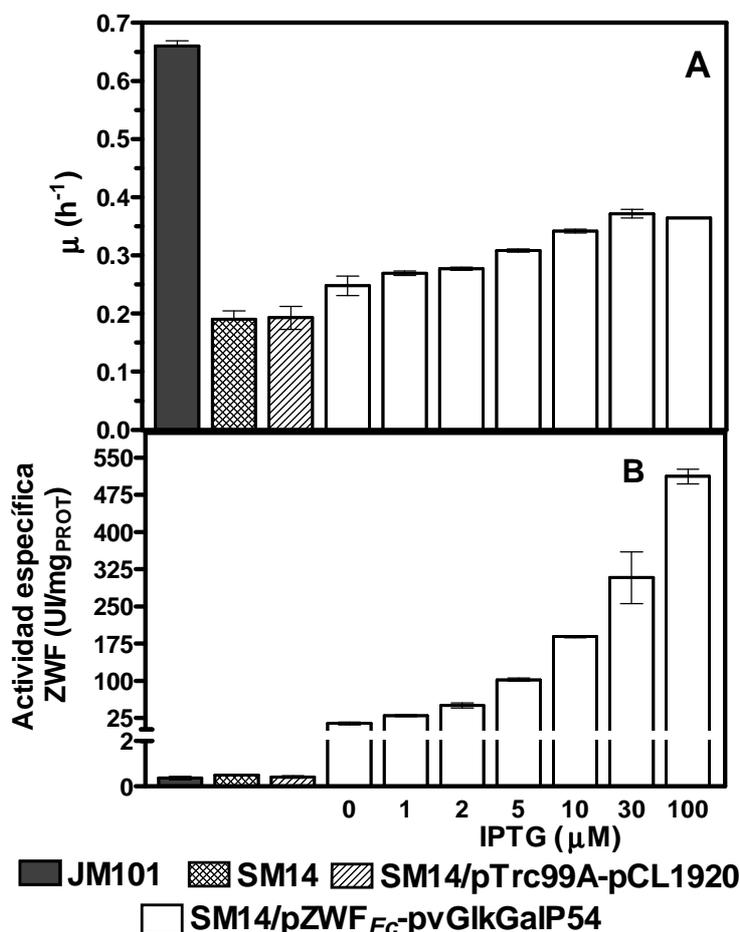
Los resultados indican que incrementos en el nivel de actividad de ZWF homóloga o heteróloga, aumentan el flujo de carbono a través del brazo oxidativo de la vía de las pentosas. Esto provoca cambios en la velocidad específica de crecimiento de *E. coli* JM101, debido a que algunos precursores para biosíntesis, como nucleótidos (necesarios para la transcripción del plásmido) y aminoácidos son sintetizados a partir de esta vía. Sin embargo, la sobreexpresión de  $zwf$  homóloga no permite recuperar completamente la velocidad específica de crecimiento, aun cuando los niveles de actividad enzimática son muy elevados. No obstante, cuando se incrementó el nivel de ZWF de *Z. mobilis*, la velocidad específica de crecimiento fue recuperada al

100%. Esto es debido probablemente a que ZWF de *Z. mobilis* utiliza preferentemente NAD<sup>+</sup> sobre NADP<sup>+</sup> como cofactores (Scopes., 1997), de tal forma que se sugiere que los niveles de NADH y NADPH generados por las enzimas ZWF de *E. coli* están equilibrados. Por lo tanto, al forzar un mayor flujo de carbono por el brazo oxidativo de la vía de las pentosas, se genera NADPH necesario para biosíntesis y una mayor disponibilidad de NADH para generación de ATP, dando como resultado una completa recuperación de la velocidad específica de crecimiento.

Por otro lado, las proporciones de NADH/NAD<sup>+</sup> en JM101/pZWF<sub>Ec</sub> y JM101/pZWF<sub>Zm</sub> fueron similares, indicando que la inducción de ambas *zwf* incrementa la disponibilidad de NADH, y probablemente la producción de ATP. De esta manera, también se encontró que los niveles de NADPH/NADP<sup>+</sup> fueron reducidos cuando los niveles de actividad de ZWF<sub>Ec</sub> y ZWF<sub>Zm</sub> fueron incrementados; manteniéndose una mayor proporción en JM101/pZWF<sub>Ec</sub> que en las cepas control (JM101/pTrc99A y JM101). Estos resultados sugieren que la velocidad de crecimiento no se recupera completamente en JM101/pZWF<sub>Ec</sub> debido probablemente al nivel elevado de NADPH. Sin embargo el nivel de NADPH/NADP<sup>+</sup> fue mas bajo cuando fue inducido *zwf*<sub>Zm</sub>; el valor cuando la  $\mu$  fue completamente recuperada fue tan bajo como el obtenido en la cepa silvestre. Probablemente el exceso en NADPH afecta el crecimiento celular, principalmente por la inhibición de la citrato sintetasa en el TCA, (Lim et al., 2002). La inhibición del crecimiento celular debido a un exceso de NADPH también ha sido observado en mutantes de *E. coli* en el gen *pgi* que codifica para la fosfoglucosa isomerasa (Canonaco et al., 2001).

Los detalles de esta parte del trabajo y los resultados en extenso se presentan en el manuscrito sometido (anexo A): Gerardo Huerta-Beristain, Guillermo Gosset, Alfredo Martínez. Increased activity level of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* alleviates the metabolic burden effect in *Escherichia coli*. Sometido a Biotechnology Letters, Marzo de 2009.

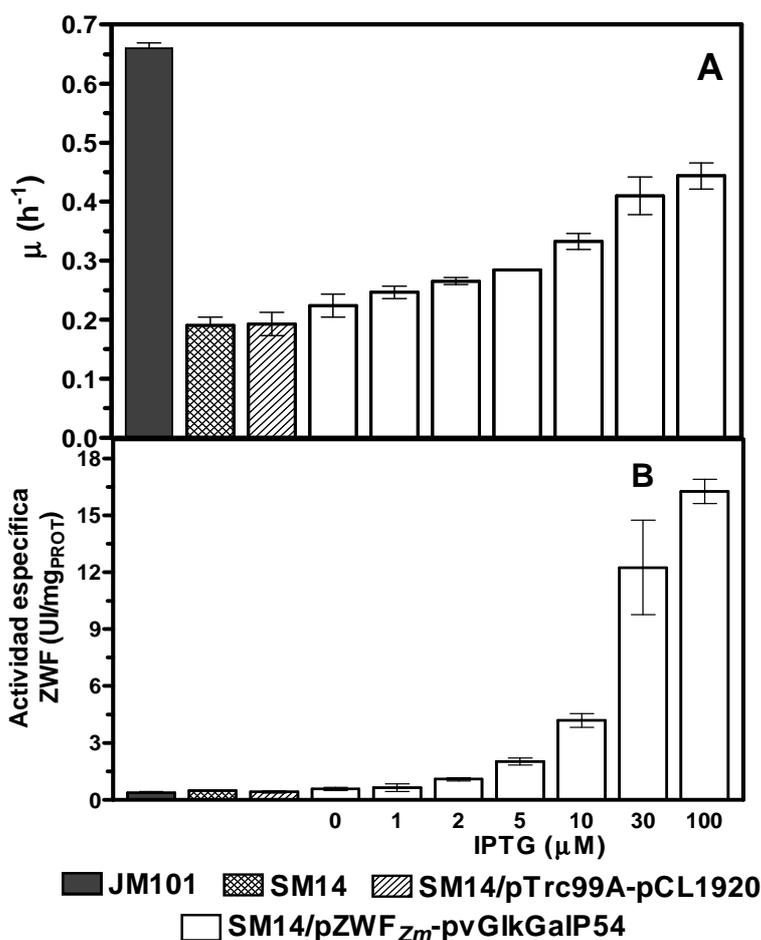
**8.2.3 Recuperación de la velocidad específica de crecimiento de *E. coli pgi* por incremento de los niveles de ZWF<sub>Ec</sub> ó ZWF<sub>Zm</sub> junto con GALP<sub>Ec</sub> y GLK<sub>Ec</sub>**



**Figura 8.1.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), (A) y actividad enzimática de ZWF (B) en la cepa transformante SM14/pZWF<sub>Ec</sub>-pvG1kGalP54 con diferentes concentraciones de IPTG. Las cepas JM101, SM14 y SM14/pTrc99A-pCL1920 son controles.

La reducción de la velocidad específica de crecimiento en cepas de *E. coli* bloqueadas en la vía glucolítica se debe a un efecto combinado de la interrupción de la vía *per se* y a la limitación de ZWF para canalizar el flujo de carbono hacia la rama oxidativa de la vía de las pentosas; en condiciones aerobias (Flores et al., 2004; Kabir y Shimizu, 2003). Además, se ha reportado

que la inactivación del gen *pgi* ocasiona una limitación en el transporte de glucosa, debido a que la interrupción en la glucólisis provoca una acumulación de glucosa-6-fosfato, lo cual acelera la degradación del transcripto (*ptsG*), el cual codifica para el principal transportador de glucosa (PtsG) en *E. coli*. Lo anterior disminuye el consumo de glucosa y reduce la síntesis de biomasa (Kabir y Shimizu, 2003; Kimata *et al.*, 2001).



**Figura 8.2.** Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), y actividad enzimática de ZWF en la cepa SM14/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 con diferentes concentraciones de IPTG. Las cepas SM14 y SM14/pTrc99A-pCL1920 son controles.

En base a esto, se evaluó el efecto sobre la velocidad específica de crecimiento de *E. coli* SM14 (JM101 *pgi*) por aumento en los niveles de ZWF<sub>Ec</sub> o

ZWF<sub>Zm</sub> junto con GALP<sub>Ec</sub> y GLK<sub>Ec</sub> (Figuras 8.1 y 8.2). La evaluación se llevo a cabo en medio mineral (M9), 2 g/L de glucosa y diferentes concentraciones de IPTG, bajo condiciones aerobicas. Las cepas transformantes fueron: SM14/pZWF<sub>Ec</sub>-pvGlkGalP54 y SM14/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54.

Como se observa en la figura 8.1, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es de solo 0.2 h<sup>-1</sup> para la cepa *pgi*, lo cual representa una reducción del 70% en la  $\mu$  en comparación con la cepa progenitora (JM101,  $\mu = 0.66$  h<sup>-1</sup>). La cepa SM14/pZWF<sub>Ec</sub>-pvGlkGalP54 sin inducción con IPTG mostró una  $\mu$  de 0.2 h<sup>-1</sup> y al inducir con 30 y 100  $\mu$ M de IPTG la  $\mu$  se incrementó a 0.34 h<sup>-1</sup>. La actividad específica de ZWF se incrementó de 10 UI/mg<sub>PROT</sub> en SM14/pZWF<sub>Ec</sub>-pvGlkGalP54 sin inducción a 260 UI/mg<sub>PROT</sub> cuando se induce con 30  $\mu$ M de IPTG. Sin embargo aunque no se determino la actividad de GalP sobre el transporte de glucosa, es probable que la glucosa este siendo internalizada al interior de la célula por esta permeasa y posteriormente fosforilada por la hoxocinasa, para contender con el problema de transporte de glucosa en las cepas interrumpidas en el gen *pgi*.

En contraste, SM14/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 sin inducción con IPTG mostró una  $\mu = 0.22$  h<sup>-1</sup> y al inducir con 100  $\mu$ M de IPTG, la  $\mu$  incremento a 0.44 h<sup>-1</sup> (Figura 8.2A), mientras que la actividad específica de ZWF se incrementó de 0.6 a 16.3 UI/mg<sub>PROT</sub>. (Figura 8.2B).

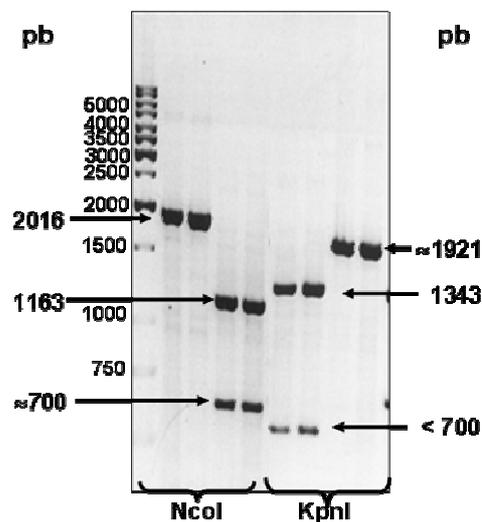
En resumen, las cepas SM14/pZWF<sub>Ec</sub>-pvGlkGalP54 y SM14/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 mostraron una recuperación parcial de la velocidad de crecimiento respecto a la cepa JM101, equivalente a 51.5%, y 66.7% respectivamente.

La sobreexpresión de *zwf*<sub>Ec</sub> ó *zwf*<sub>Zm</sub> en conjunto con *galP* y *glk* (plásmido pvGlkGalP54) en la cepa SM14, permitió incrementar la  $\mu$  debido a la recuperación del transporte y fosforilación de glucosa y a un incremento en el flujo de carbono hacia la vía de las pentosas; para generación de intermediario de biosíntesis y cofactores. Sin embargo, la  $\mu$  no se recupera al 100%, lo que sugiere que hay otro(s) paso(s) limitante(s) del flujo de carbono en las cepas *pgi*-

**8.3 TERCERA ETAPA: Caracterización del metabolismo y fisiología de KO11 *pgi* y derivadas evolucionadas y modificadas para obtener una cepa homoetanológica que cataboliza la glucosa por la vía de Entner-Doudoroff**

**8.3.1 Construcción de la cepa KO11 *pgi***

Con el fin elucidar la respuesta del metabolismo central ocasionada por la inactivación del gen *pgi* en *E. coli* etanológica cepa KO11, se construyó la cepa KO11 *pgi* mediante la inserción dirigida de productos de PCR, estrategia reportada por Datsenko y Wanner 2000. Para comprobar la interrupción de gen *pgi* se realizaron ensayos de PCR y actividad enzimática.



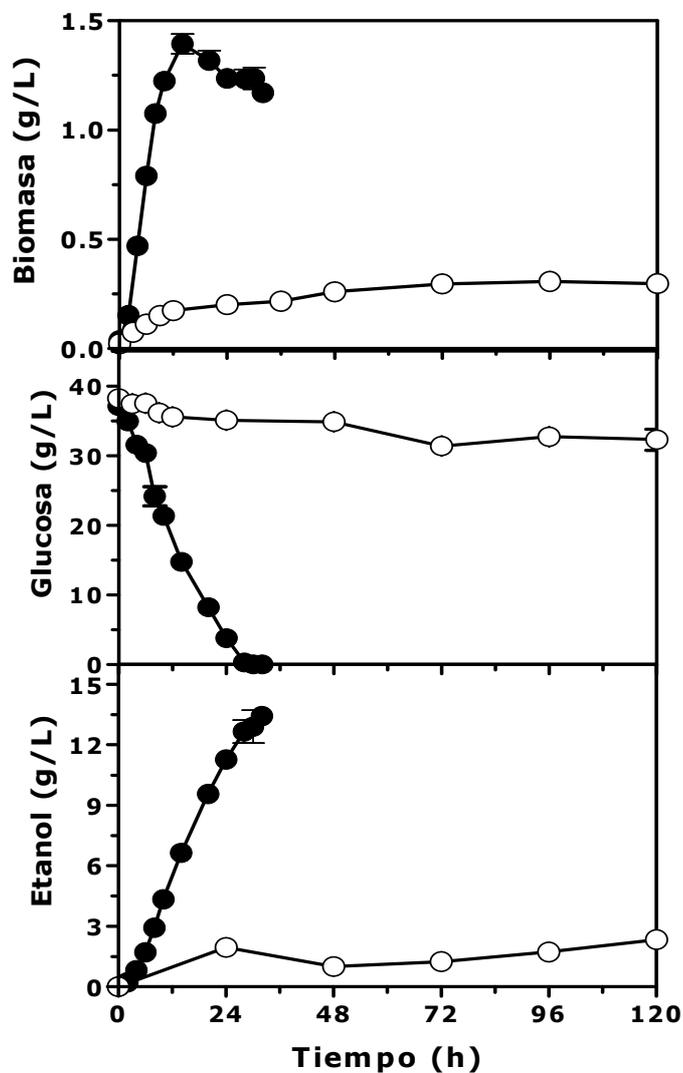
**Figura 8.3.** Patron de restricción del PCR obtenido a partir de ADN cromosomal de KO11 ó KO11 *pgi*. carriles de izquierda a derecha. Carril 1, marcador 1 kb. Digestiones con Digestiones con *NcoI*.; líneas 2 y 3, KO11; líneas 4 y 5, KO11 *pgi*. Digestiones con *KpnI*.; líneas 6 y 7, KO11; líneas 8 y 9, KO11 *pgi*.

*PCR.* Se amplificó con oligos específicos (Tabla 7.3) la región de 2016 y 1921 pb, 200 pb río arriba y río debajo de la región estructural del gen *pgi* en la cepa sin inactivación y con inactivación del gen *pgi*. Adicionalmente para analizar los productos de PCR, se realizaron digestiones específicas; con *KpnI* generando dos fragmentos uno de 1343 pb y otro de 703 pb, y para fragmentos

que contienen el gen de *Km* se realizó una digestión con *NcoI*, generando dos fragmentos, uno de 1163 pb y otro de  $\approx 700$  pb (Figura 8.3).

*Actividad enzimática.* Se determinó la actividad glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI) como lo reporta Peng y Shimizu (2003) (Anexo C). Se comprobó que KO11 *pgi*<sup>-</sup> no presentan actividad PGI, mientras que KO11 y JM101 presentaron valores de actividad específica de PGI de 2.21 y 2.06 UI/mg<sub>PROT</sub>, respectivamente.

### 8.3.2 Evaluación de KO11 *pgi*<sup>-</sup> y KO11 en medio mineral



**Figura 8.4.** Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar y producción de etanol de *E. coli* KO11 y KO11*pgi*, condiciones no aireadas, medio mineral (M9)-4% glucosa. Símbolos ○ KO11 *pgi*, ● KO11.

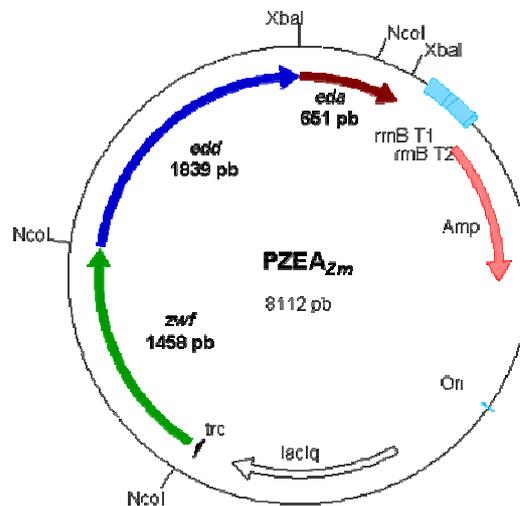
Uno de los principales propósitos del presente trabajo consistió en determinar si es posible canalizar el flujo de glucosa a través de la vía de Entner-Doudoroff (E-D) en lugar de la de Embder-Meyerhoff-Parnas (EMP); con el fin de evaluar el desempeño del metabolismo central ocasionada por la inactivación del gen *pgi* en *E. coli* etanológica KO11 en condiciones de fermentación usando medio mineral suplementado con glucosa (Figura 8.4).

*E. coli pgi* podría crecer dependiendo del flujo de carbono que se canalice por la enzima ZWF hacia la vía de las pentosas fosfato o de E-D, así como a la misma actividad que presenten estas vías alternas para el metabolismo de glucosa. Así, al parecer esta enzima y/o la vías mencionadas están limitadas para canalizar el flujo de carbono. Lo anterior da como resultado la disminución de los niveles de intermediarios necesarios para biosíntesis celular y en consecuencia un drástico decremento en las velocidades específicas de crecimiento en condiciones aeróbicas. Al parecer en las condiciones evaluadas (no aireadas), *E. coli* KO11 *pgi* solo crece cuando hay oxígeno en el medio al inicio del cultivo, pero una vez que este se agota, la célula deja de crecer (Figura 8.4). Este efecto se debe a que bajo estas condiciones KO11 *pgi* es incapaz de regenerar los niveles de NADP<sup>+</sup> y/o NAD<sup>+</sup>, cofactor más usado en la reacción catalizada por ZWF (Figura 3.1). De tal forma que se propuso que el incremento en el nivel de las enzimas de la vía de E-D de *Z. mobilis* en KO11 *pgi* podría incrementar el flujo de carbono a través de ZWF y este ser canalizado a la síntesis de piruvato.

### 8.3.3 Construcción del plásmido pZEA<sub>Zm</sub>

El plásmido pZEA<sub>Zm</sub> fue construido mediante la amplificación por PCR y clonación individual de los genes *zwf*, *edd* y *eda* que codifican para las enzimas, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa de *Z. mobilis*, respectivamente, con

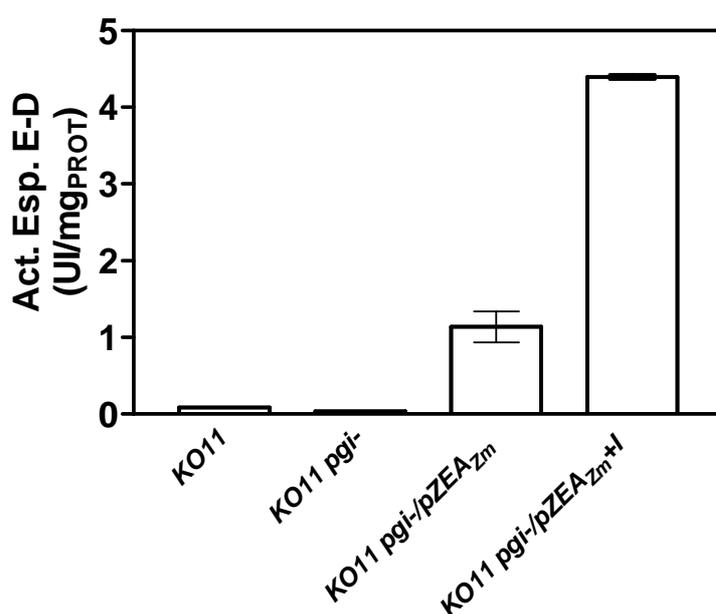
oligos específicos (Tabla 7.3) para cada gen a partir de ADN cromosomal de *Z. mobilis*. La clonación individual de los genes se realizó en el sitio *Sma*I bajo el control del promotor *trc* inducible por IPTG en el vector pTrc99A, obteniéndose los plásmidos pZWF<sub>Zm</sub>, pEDD<sub>Zm</sub> y pEDA<sub>Zm</sub>, para su conservación fueron transformados en la cepa DH5α. Posteriormente, para formar el operon artificial *zwf-edd-eda* de *Z. mobilis*, bajo el control del promotor *trc* en pTrc99A, los plásmidos pZWF<sub>Zm</sub> y pEDD<sub>Zm</sub> se digirieron en el sitio *Nco*I, el primero libera un fragmento de 1,700 pb que corresponde al gen *zwf*. Este fragmento fue clonado en el sitio *Nco*I del plásmido pEDD<sub>Zm</sub>, generando el plásmido pZWFEDD<sub>Zm</sub>. Después, el plásmido pEDA<sub>Zm</sub> se digirió con *Xba*I y el fragmento liberado de 651 pb, que corresponde al gen *eda*, se clonó en el sitio *Xba*I del plásmido pZWFEDD<sub>Zm</sub> para obtener el plásmido pZEA<sub>Zm</sub> (Figura 8.5), este plásmido se analizó por patrón de restricción para comprobar que el marco de lectura del operon sintético (genes *zwf*, *edd* y *eda*) de *Z. mobilis* quedara bajo la regulación del promotor *trc* inducible por IPTG. Se comprobó por secuenciación la construcción del operon de *Z. mobilis* en el plásmido pZEA<sub>Zm</sub>.



**Figura 8.5.** Mapa del plásmido pZEA<sub>Zm</sub>, con los genes *zwf*, *edd* y *eda* de *Z. mobilis* bajo regulación del promotor *trc* inducible por IPTG.

**8.3.4 Efecto de la sobreexpresión de *zwf<sub>Zm</sub>*, *edd<sub>Zm</sub>* y *eda<sub>Zm</sub>* en la cepa KO11 *pgi***

La cepa KO11 *pgi*/pZEA<sub>Zm</sub> fue crecida en M9-20 g/L glucosa, con y sin IPTG (100 μM); se evaluaron las velocidades específicas de crecimiento y la actividad específica de la vía de E-D en células cosechadas después de 10 horas de iniciado los cultivos sin aireación.

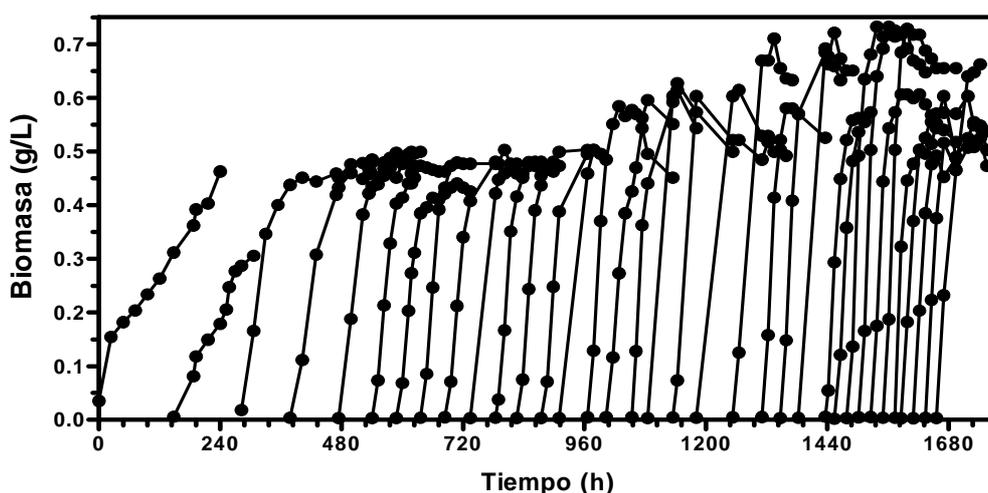


**Figura 8.6.** Actividad enzimática de la vía de Entner-Doudoroff, en las cepas KO11 *pgi*- y KO11 *pgi*-/pZEA<sub>Zm</sub>, en cultivos sin IPTG y con 100 μM de IPTG (+I). La cepa KO11 se uso como control.

Los resultados mostraron, que en comparación a KO11 *pgi*, KO11 *pgi*-/pZEA<sub>Zm</sub> sin y con inducción por IPTG presentó una actividad específica de la vía de E-D 34.4 y 131.7 veces mayor, respectivamente (Figura 8.6). Sin embargo, como ya se describió el crecimiento de KO11 *pgi* en estas condiciones es limitado y no fue posible que la expresión de los genes contenidos en pZEA<sub>Zm</sub> contrarrestaran, en estas condiciones, el efecto de la interrupción en *pgi* (Datos no mostrados). Los resultados de actividad enzimática indican que la construcción es funcional, pero los datos de

crecimiento también sugieren un efecto de carga metabólica, ocasionada por la transcripción del plásmidos multicopia. Como se presentó en la sección 8.2.2, se sabe que este fenómeno se presenta por incrementos en la expresión de genes en plásmidos multicopia en *E. coli* (Flores et al., 2004, Huerta-Beristain et al., 2009 en revisión). Esto nos permitió plantear que parte del efecto de carga metabólica, además de la demanda de ciertos intermediarios metabólicos, puede ser debido a un desbalance del poder reductor (proporciones NADPH/NADP<sup>+</sup> y NADH/NAD<sup>+</sup>) (Huerta-Beristain et al., 2009 en revisión).

### 8.3.5 Evolución adaptativa de KO11 *pgi* en cultivos no aireados



**Figura 8.7.** Crecimiento de KO11 *pgi* y poblaciones derivadas sometida a evolución adaptativa en condiciones anaeróbicas en M9 con 4% glucosa. Cada transferencia indicada por cada línea fue realizada cuando los cultivos alcanzaban una DO<sub>600nm</sub> alrededor de 1.0 (0.37 g/L biomasa) ó cada 24 horas.

En base a las limitaciones en velocidad de crecimiento y canalización de glucosa hacia la síntesis de etanol en la cepa KO11 *pgi*-, y a la habilidad de los sistemas biológicos para adaptarse ante diferentes perturbaciones, ya sean genéticas (inactivación de un gen), metabólicas o ambientales, mediante mecanismos genéticos (introducción de mutaciones espontáneas) y metabólicos (redistribución de flujos) que involucra la evolución adaptativa (Fong *et al.*,

2005), se sometió a este tipo de evolución a la cepa KO11 *pgi*- creciéndola en condiciones anaeróbicas en minifermentadores con 200 ml de M9 - 40 g/L de glucosa, (35°C, 100 rpm y presión de selección Cloranfenicol 40 µg/ml) durante 60 días (Figura 8.7). Cada minifermentadores se inoculaba con células del minifermentador anterior y la DO<sub>600nm</sub> inicial era de 0.01. Las muestras para medir la DO<sub>600nm</sub> fueron tomadas cada 24 horas. En estos cultivos se determinó la producción de biomasa (Figura 8.7) y la producción de etanol. Los resultados obtenidos muestran que la cepa KO11 *pgi*- mejoró su t<sub>d</sub> (tiempo de duplicación) de 138.6 h en el primer pase, a un t<sub>d</sub> = 3.65 h en la transferencia número 35. La cepa evolucionada se denominó KO11 E35. Esto indica que la cepa KO11 *pgi* sufrió cambios a nivel genético y/o metabólico que le permiten incrementar la formación de biomasa y en consecuencia la velocidad de crecimiento (Tabla 8.1).

### **8.3.6 Caracterización de la cepa KO11 *pgi*- E35.**

**Parámetros cinéticos.** Como parte de la caracterización de la cepa KO11 E35, se realizó la evaluación de los parámetros cinéticos de fermentación de la cepa KO11 E35 en minifermentador con M9-4% glucosa (Tabla 8.1). Las cepas KO11 y KO11 *pgi* fueron usadas como controles.

**Tabla 8.1.** Parámetros cinéticos de fermentación, durante la fase de crecimiento exponencial de KO11 *pgi* y KO11 E35; en comparación con la cepa KO11.

	KO11	KO11 <i>pgi</i>	KO11 E35
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.49	0.005	0.12
q <sub>s</sub> (g <sub>Glc</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	4.69	0.213	1.5
Y <sub>p/s</sub> (g <sub>EtoH</sub> /g <sub>Glc</sub> )	0.35	0.125	0.29
q <sub>EtoH</sub> (g <sub>EtoH</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	1.02	0.035	0.39
q <sub>KOH</sub> (ml <sub>KOH</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	4.77	0.287	1.76

Los resultados mostraron que la cepa KO11 E35 incremento su  $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_{Et-OH}$  en 24, 7.1 y 11.1 veces en comparación con la cepa KO11 *pgi*, (Tabla 8.1). En contraste, en comparación con KO11, la  $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_{Et-OH}$  de KO11 E35 representa solo el 25, 32 y 38 % los valores de KO11, respectivamente, (Tabla 8.1). Además, no se encontró actividad enzimática de PGI en E35. Estos resultados sugieren que la cepa KO11 *pgi*- E35 sufrió cambios a nivel genético y/o metabólico redirigiendo probablemente el flujo de carbono a través de las vía de las pentosas fosfato y de Entner-Doudoroff, como consecuencia de la interrupción de la vía glucolítica. Adicionalmente, en la cepa KO11 E35 su  $q_{KOH}$  (velocidad específica de consumo de KOH) incremento de 0.28 a 1.76  $ml_{KOH}/g_{DCW} h$ , lo que muestra un incremento en el flujo de carbono hacia la formación de ácidos orgánicos en comparación con la cepa KO11 *pgi*.

**Determinación de actividades enzimáticas clave.** En base a estas modificaciones de los parámetros cinéticos de fermentación en KO11 E35, se evaluaron los niveles de actividades enzimáticas clave del metabolismo central (ZWF, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; PGI, glucosa-6-fosfato isomerasa y E-D, vía de Entner-Doudoroff) y de las enzimas que compiten por el piruvato (PFL, piruvato formato liasa; LDH, lactato deshidrogenasa; PDC, piruvato decarboxilasa y ADH, alcohol deshidrogenasa). Para fines de comparación se usaron las cepas KO11 y KO11 *pgi*.

En la cepa KO11 E35, los niveles de las actividades enzimática de ZWF (usando  $NADP^+$  como cofactor) y E-D se incrementaron en 11.5 y 2.5 veces con respecto a la cepa KO11, mientras que el incremento para estas mismas enzimas fue de 6 y 7 veces con respecto a KO11 *pgi*, respectivamente (Tabla 8.2). Cuando se usó  $NAD^+$  como cofactor, la actividad de ZWF incrementó 58.7 y 4.4 veces con respecto a KO11 y KO11 *pgi* (Tabla 8.2). Estos resultados sugieren que la cepa evolucionada mejoró el flujo de carbono a través de la parte inicial de la vía de las pentosas y de Entner-Doudoroff, mediante el incremento de los niveles de ZWF, por un lado reduciendo la acumulación de glucosa-6-fosfato (intermediario que induce la degradación del RNA mensajero

de *ptsG*), y por otro incrementando el flujo de carbono a través de la vía de E-D. En consecuencia, una mayor cantidad de glucosa es introducida a la célula, incrementando la  $\mu$  y su  $q_s$  con respecto a KO11 *pgi*. KO11 E35 presenta una distribución de flujo de carbono hacia la formación de acético, fórmico y láctico; mediante incrementos (entre el 30 y 70%, con respecto a KO11 y KO11 *pgi*) en el nivel de las actividades de ACK, PFL y LDH. Es factible asumir que en este esquema metabólico la cepa KO11 E35 tiene un bajo rendimiento energético en condiciones anaeróbicas. El incremento del flujo en la vía de E-D puede ser resultado de una desregulación de la misma vía, en base a que un efecto de la evolución adaptativa es la redistribución de los flujos metabólicos a través de vías metabólicas existentes (Fong et al., 2005), en este caso parte de la vía de las pentosas y la vía de E-D.

**Tabla 8.2.** Actividades enzimáticas específicas (en UI/mg<sub>PROT</sub>) en las cepas KO11, KO11 *pgi* y KO11 E35.

Actividad	KO11	KO11 <i>pgi</i>	KO11 E35
ZWF (con diferente cofactor)			
NADP <sup>+</sup>	0.17	0.32	1.95
NAD <sup>+</sup>	0.015	0.20	0.88
PGI	2.21	0.0	0.0
E-D	0.08	0.03	0.20
PFL	0.06	0.05	0.08
PDC	0.43	0.28	0.65
ADH	0.13	0.12	0.22
LDH	0.66	0.61	1.1
ACK	0.52	0.62	0.62

En cuanto a las actividades enzimáticas de vías que compiten por piruvato se observó que: el nivel de actividad de PFL en la cepa KO11 E35 (Tabla 8.2) incrementó (alrededor de 30 y 60%) con respecto a las cepas control. Así mismo la actividad ACK aumentó 25% con respecto a KO11, sin

embargo, en comparación a KO11 *pgi* fue igual. Además el nivel de actividad de LDH incrementó 90 y 80% en KO11 E35 (Tabla 8.2) en comparación a las cepas KO11 *pgi* y KO11. Este incremento de actividad de LDH en KO11 E35, puede deberse en parte a la acumulación de piruvato intracelular (Tarmy y Kaplan, 1968).

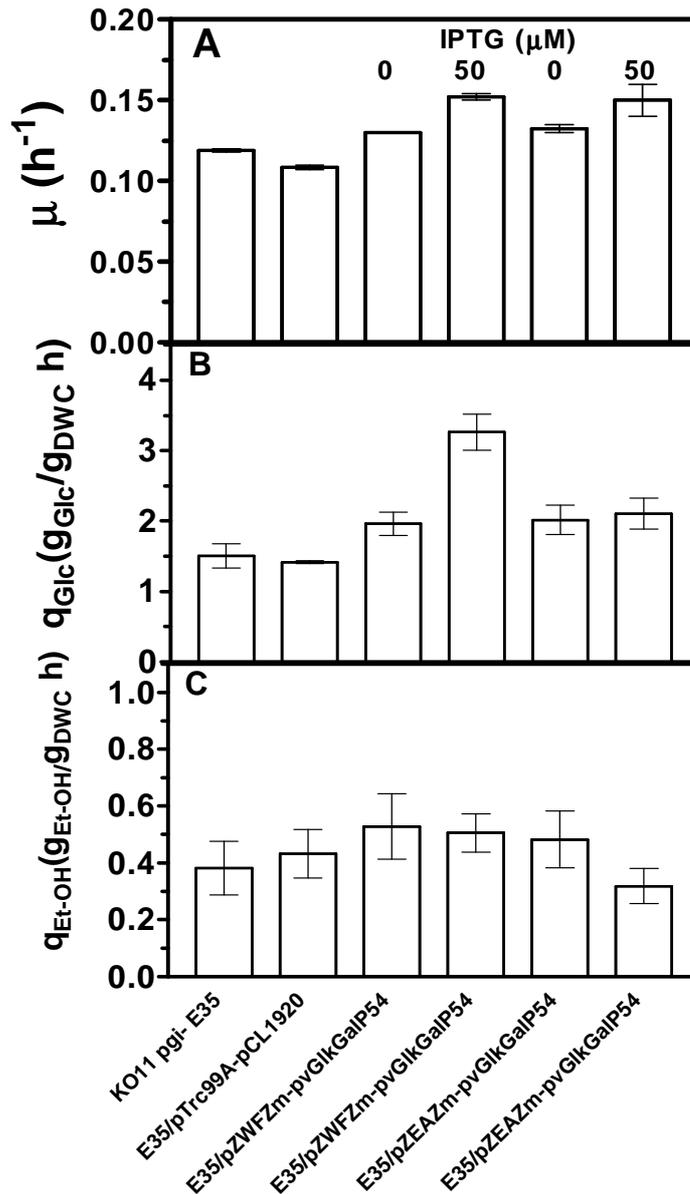
El nivel de actividad de PDC en la cepa KO11 E35 incrementó al doble con respecto a la cepa KO11 *pgi*, sin embargo con respecto a la cepa KO11 el nivel de actividad es mayor solo en un 50% (Tabla 8.2). Además, la actividad de ADH en la cepa KO11 E35 (Tabla 8.2) incrementó en 70 y 90% con respecto a las cepas KO11 y KO11 *pgi*- respectivamente. Esto indica que el incremento de actividad de las enzimas PDC y ADH en la cepa evolucionada con respecto a la cepa KO11 *pgi* permite incrementar la  $q_{EtOH}$ , aunque esta sigue siendo menor a la  $q_{EtOH}$  de la cepa KO11 con valores menores de actividad de PDC y ADH. Estos resultados sugieren que la cepa KO11 E35 modificó su flujo de carbono a la síntesis de acetato, con el fin de obtener ATP necesario para biosíntesis, y de lactato para regeneración de poder reductor en forma de  $NAD^+$ .

**Actividad enzimática de ZWF ante  $NAD^+$  ó  $NADP^+$ .** Los resultados mostraron que la actividad de ZWF en la cepa KO11 E35 con respecto a KO11 se incrementó 11.5 y 58.7 veces usando  $NADP^+$  ó  $NAD^+$  como cofactores, respectivamente (Tabla 8.2), lo que indica que la enzima incrementó su concentración y no mostró un cambio en la afinidad por los cofactores.

### **8.3.7 Efecto del incremento del nivel de $ZWF_{Zm}$ o $ZWF_{Zm}$ $EDD_{Zm}$ y $EDA_{Zm}$ junto con $GALP_{Ec}$ y $GLK_{Ec}$ en KO11 E35**

En base a los resultados anteriores y con el fin de incrementar el flux glucolítico hacia la formación de etanol en KO11 E35, se evaluó el efecto ocasionado por el incremento de  $ZWF_{Zm}$  o  $ZWF_{Zm}$ - $EDD_{Zm}$ - $EDA_{Zm}$  en conjunto con  $GALP_{Ec}$  y  $GLK_{Ec}$  en *E. coli* KO11 E35 ( $KO11\ E35/pZWF_{Zm}$ - $pvGlkGalP54$  y  $pZEA_{Zm}$ - $pvGlkGalP54$ ). Los cultivos se realizaron en condiciones no aireadas, en medio mínimo M9, con 40 g/L de glucosa y se determinaron los parámetros

cinéticos de fermentación de estas cepas transformantes con 50  $\mu\text{M}$  de IPTG, comparando los resultados con las cepas transformantes sin inducir y las cepas control (Figura 8.8). La inducción de la expresión de los genes contenidos en los plásmidos se realizó con 50  $\mu\text{M}$  de IPTG.



**Figura 8.8.** Parámetros cinéticos de fermentación de la cepa KO11 E35/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 y KO11 E35/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 con 0 y 50  $\mu\text{M}$  de IPTG crecidas en medio mínimo M9, glucosa 40 g/L. KO11 *pgi*, KO11 E35 y KO11 E35 /pTrc99A-pCL1920 son controles.

Las cepas KO11 E35/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 y KO11 E35/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 con una concentración de 50  $\mu$ M de IPTG incrementaron ligeramente la síntesis de biomasa y velocidad específica de crecimiento (Figura 8.8A) en comparación a KO11 E35.

Con respecto a la velocidad específica de producción de etanol. No se observó un cambio significativo en las cepas KO11 E35/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 y KO11 E35/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 con y sin inducción por IPTG (Figura 8.8C), respecto a KO11 E35/pTrc99A-pCL1920. Esto indica que la inducción de la expresión de *zwf<sub>Zm</sub>* ó *zwf<sub>Zm</sub>*, *edd<sub>Zm</sub>*, *eda<sub>Zm</sub>*, en conjunto con *glk<sub>Ec</sub>* y *galP<sub>Ec</sub>* en la cepa KO11 E35 no afecta la  $q_{Et-OH}$ . Sin embargo como se puede ver en la gráfica de  $q_s$  (velocidad específica de consumo de glucosa) en KO11 E35/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 con inducción por IPTG incrementó con respecto a las cepas KO11 E35 y KO11 E35/pTrc99A-pCL1920 (Figura 8.8B), esto sugiere que en esta cepa se lleva a cabo una redistribución del flujo de carbono hacia la formación de ácidos orgánicos.

Los resultados de la sobreexpresión de *zwf<sub>Zm</sub>* en conjunto con *glk<sub>Ec</sub>* y *galP<sub>Ec</sub>* en la cepa KO11 E35 mostraron un incremento de la  $q_s$  probablemente debido al incremento del transporte y fosforilación de glucosa (función que en las cepas mutantes en *pgi-* está limitado; Kimata *et al.*, 2001) y probablemente a un incremento en la disponibilidad de piruvato, que favorece la síntesis de ácidos orgánicos, mayoritariamente ácido láctico, esto concuerda con el aumento de actividad de LDH en KO11 E35 con respecto a KO11 *pgi-*. Además, el incremento en los niveles de ZWF<sub>Zm</sub> permite proponer que se convierte preferencialmente NAD<sup>+</sup> a NADH (y no NADP<sup>+</sup> en NADPH), haciendo que este cofactor sea reciclado en vías fermentativas: en la síntesis de etanol y láctico. De esta manera se evita la acumulación de NADPH que inhibe el crecimiento celular (Kabir y Shimizu, 2003). Este dato concuerda con los resultados observados en SM14 (JM101 *pgi-*) en condiciones aeróbicas, donde el incremento de los niveles enzimáticos de ZWF<sub>Zm</sub>, GLK<sub>Ec</sub> y GALP<sub>Ec</sub>, permite

recuperar en 67% la velocidad específica de crecimiento con respecto a *E. coli* JM101 (datos mostrados en la sección 8.2.3).

#### 8.4 Construcción de una cepa homoetanológica.

La sobreexpresión de genes clave en KO11 E35 permite redirigir el flujo de carbono de piruvato hacia la síntesis de lactato y acetato. Por tanto, para canalizar un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de etanol se propuso inactivar los genes que codifican para las enzimas que compiten por piruvato (*ack*, *pta* y *ldhA*), mediante la estrategia reportada por Datsenko y Wanner 2000. La cepa resultante se denominó KO11 PPAL<sup>-</sup> (genotipo: KO11 E35  $\Delta$ *ack-pta::FRT*,  $\Delta$ *ldhA::FRT*) o cepa homoetanológica.

##### 8.4.1 Caracterización de la cepa homoetanológica KO11 PPAL<sup>-</sup>

**Tabla 8.3.** Parámetros cinéticos de cultivos de KO11 E35 y KO11 PPAL<sup>-</sup>. La cepa KO11 se usó con fines de comparación. ND, Datos no determinados.

	KO11	KO11 E35	KO11 PPAL <sup>-</sup>
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.49	0.12	0.13
q <sub>s</sub> (g <sub>Glc</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	4.69	1.5	1.65
Y <sub>p/s</sub> (g <sub>EtoH</sub> /g <sub>Glc</sub> )	0.48	0.29	0.25
q <sub>EtoH</sub> (g <sub>EtoH</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	1.02	0.42	0.41
q <sub>Acet</sub> (g <sub>Acet</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	0.63	0.55	0
q <sub>Form</sub> (g <sub>Form</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	1.1	0.89	0.032
q <sub>Lact</sub> (g <sub>Lact</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	0	0.11	0
q <sub>Succ</sub> (g <sub>Succ</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	ND	0	0.006
q <sub>Fum</sub> (g <sub>Fum</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	ND	0	0.002
q <sub>Pyr</sub> (g <sub>Pyr</sub> /g <sub>DCW</sub> h)	ND	0	0.92

En *E. coli* KO11 PPAL<sup>-</sup> se evaluaron las velocidades específicas de crecimiento, de consumo de glucosa y de producción de etanol; así como las actividades enzimáticas de ZWF y de la vía de Entner-Doudoroff, y de la vía de síntesis de etanol heteróloga (PDC y ADH), en medio mínimo M9 con glucosa

40 g/L y condiciones no aireadas. Para fines de comparación se usaron las cepas KO11 y KO11 E35.

Los resultados mostraron que en KO11 PPAL<sup>-</sup> la  $\mu$  y  $q_{Et-OH}$  fueron iguales a los observados en KO11 E35, aunado a esto, la  $q_S$  es ligeramente mayor en la cepa homoetanológica (Tabla 8.3). En contraste, en comparación con la cepa parental KO11, los valores para  $\mu$ ,  $q_S$  y  $q_{Et-OH}$  de KO11 PAPL<sup>-</sup> fueron alrededor de una tercera parte (Tabla 8.3).

Estos resultados indican que la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> redirige su flujo metabólico a través de la dos primeras reacciones de las pentosas fosfato y de la vía de Entner-Doudoroff, como consecuencia de la interrupción de la vía glucolítica cuando metaboliza glucosa como fuente de carbono.

Adicionalmente, en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> se cuantificaron los productos de fermentación y se comprobó que no produce acético ni láctico, sin embargo acumula pequeñas cantidades de fórmico, succínico, fumárico y piruvato (anexo B.3). Cabe mencionar que esta cepa homoetanológica es capaz de crecer en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono bajo condiciones no aireadas usando la vía de Entner-Doudoroff como única vía metabólica.

**Tabla 8.4.** Comparación de los niveles de diferentes actividades enzimáticas en las cepas KO11, KO11 E35 y KO11 PAPL<sup>-</sup>.

ACTIVIDAD ESPECÍFICA	KO11	KO11 E35	KO11 PAPL <sup>-</sup>
ZWF	0.17	1.95	2.91
E-D	0.08	0.20	0.21
PDC	0.43	0.65	0.64
ADH	0.13	0.22	0.23

También en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup>, fueron evaluados los niveles de actividad específica de ZWF y E-D del metabolismo central y de la vía heteróloga de formación de etanol (PDC, y ADH); encontrando un incremento en la actividad enzimática de ZWF 17 y 0.5 veces en KO11 PPAL<sup>-</sup> (Tabla 8.4) con respecto a KO11 y KO11 E35, respectivamente. La actividad de la vía de

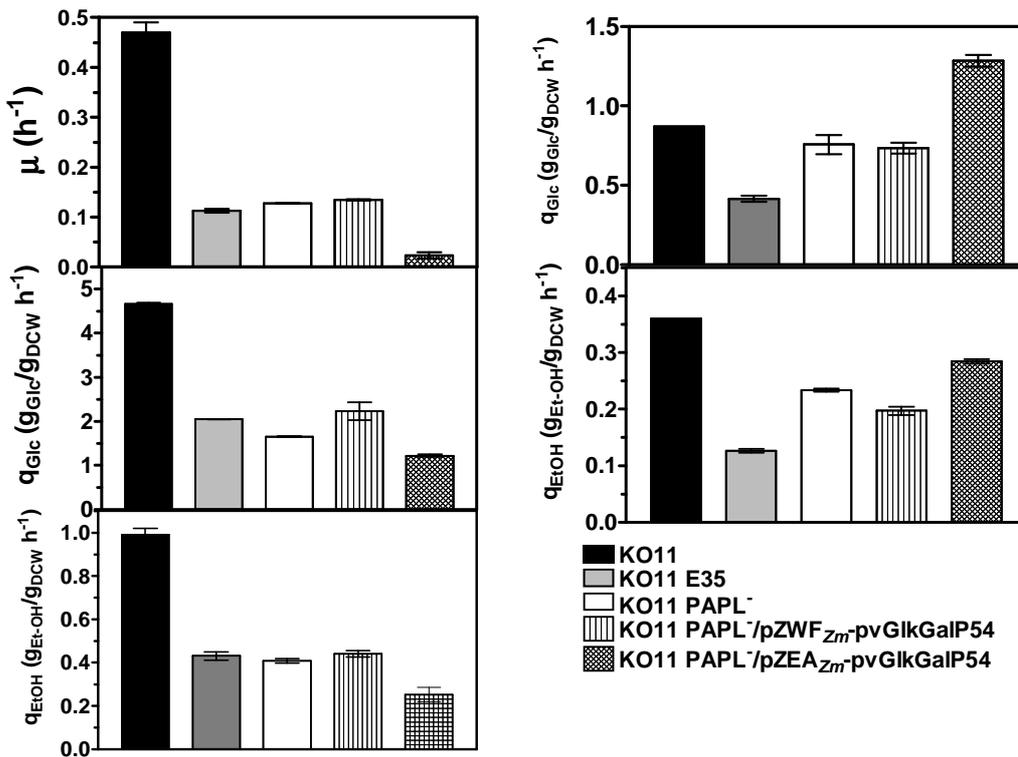
Entner-Doudoroff en KO11 PPAL<sup>-</sup> y en KO11 E35 fueron iguales, por lo tanto la actividad de mantiene 2.5 veces mayor con respecto a KO11 (Tabla 8.4). Esto indica que la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> mantiene el flujo de carbono a través de las dos primeras reacciones de la vía de las pentosas y de la vía de Entner-Doudoroff, mediante el incremento de actividad de ZWF. Este incremento de ZWF evita la acumulación de Glucosa-6-fosfato (intermediario que induce la degradación del RNA mensajero de *ptsG*; Kimata et al., 2001) aunque el consumo de glucosa no incrementó, sin embargo la velocidad de crecimiento permanece igual a la cepa KO11 E35 (Tabla 8.3).

Además el incremento de la vía de E-D en KO11 E35 y KO11 PPAL<sup>-</sup> es probablemente debido a una desregulación de la vía, por efecto de la evolución adaptativa; o a la necesidad de la célula para evitar la acumulación intracelular de 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato, intermediario que es tóxico en la célula y provoca un efecto bacteriostático (Fuhrman et al., 1998), redistribuyendo los flujos metabólicos a través de vías metabólicas existentes (Fong et al., 2005) y en consecuencia en la cepa homoetanológica no cambia el nivel de actividad de E-D con respecto a KO11 E35.

En cuanto a los niveles de actividad de PDC en las cepas KO11 PPAL<sup>-</sup> y KO11 E35 son iguales, sin embargo con respecto a la cepa KO11 el nivel de actividad es mayor en 50% (Tabla 8.4). En contraste, la actividad de ADH en KO11 PPAL<sup>-</sup> fue igual que en KO11 E35 (Tabla 8.4). Esto indica que la actividad de PDC y ADH tanto en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> como en KO11 E35 probablemente están limitando el flujo de piruvato a etanol, en consecuencia en KO11 PPAL<sup>-</sup> hay una acumulación de piruvato y probablemente una acumulación de PEP la cual puede ocasionar una inhibición de enzimas (como glucocinasa) de glucólisis o afectando la fosforilación de glucosa (Ogawa et al., 2007). En base a estos resultados se decidió incrementar los niveles de GALP y GLK en KO11 PPAL<sup>-</sup> junto con ZWF<sub>Zm</sub> o la vía de E-D heteróloga, con el propósito de incrementar el consumo de glucosa y canalizar el flujo hacia la síntesis de piruvato a través de la vía de E-D.

**8.5.2 Caracterización del incremento del nivel de  $ZWF_{Zm}$  o  $ZWF_{Zm}$   $EDD_{Zm}$  y  $EDA_{Zm}$  junto con  $GALP_{Ec}$  y  $GLK_{Ec}$  en KO11 PPAL<sup>-</sup>**

Se evaluó el efecto sobre la velocidad específica de crecimiento, de consumo de glucosa, de formación de etanol y otros productos de fermentación, en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 y KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54. Los controles fueron KO11, KO11 PPAL<sup>-</sup> y KO11 E35.



**Figura 8.9.** Parámetros cinéticos de cultivo de KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 y KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 durante la fase exponencial (gráficas izquierda) y estacionaria (gráficas derecha), en medio mínimo M9, glucosa 40 g/L y 50 μM de IPTG en condiciones no aireadas. KO11 E35 y KO11 PPAL<sup>-</sup> fueron controles.

Durante el crecimiento en fase exponencial del cultivo, KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 mostró una  $\mu$  y  $q_{Et-OH}$  iguales a las cepas control (Figura 8.9), en contraste la  $q_s$  fue 37 y 7% mayor que la de KO11 PPAL<sup>-</sup> y KO11 E35 (Figura 8.9). Por otro lado, la otra cepa transformante, KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlcGalP54 mostró una  $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_{Et-OH}$  de 0.022 h<sup>-1</sup>, 1.2 g<sub>Glc</sub>/g<sub>DCW</sub> h y 0.41

$g_{EtOH}/g_{DCW}$  h, respectivamente, los tres parámetros son menores con respecto a las cepas control. En cuanto a la velocidades específicas de formación de productos de fermentación durante la fase exponencial (Anexo B.3) la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> y sus dos transformantes, no producen acético, ni láctico, como era de esperarse, a diferencia de la cepa KO11 E35 que produce estos ácidos orgánicos.

Durante la fase estacionaria del cultivo, KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 mostró una  $q_s$  y  $q_{Et-OH}$  iguales a la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> (Figura 8.9), sin embargo con respecto a la cepa KO11 E35 la  $q_s$  y  $q_{Et-OH}$  es mayor en 76 y 54%. Por otro lado, KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 mostró una  $q_s$  y  $q_{Et-OH}$  de 1.3  $g_{Glc}/g_{DCW}$  h y 0.28  $g_{EtOH}/g_{DCW}$  h (Figura 8.9), respectivamente, los dos parámetros son mayores con respecto a KO11 PPAL<sup>-</sup>.

En el caso de KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 se encontró un ligero flujo a acetato, lactato y formato con respecto a KO11 PPAL<sup>-</sup>. Probablemente favorecido a través de otras vías de síntesis y por acumulación de piruvato intracelular (anexo B.4).

Por otro lado, los niveles de actividad específica en KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 con respecto a KO11 PPAL<sup>-</sup>, fueron para ZWF 8 veces mayor, para E-D se mantuvo el mismo nivel, para PDC se reduce 20% y el nivel de ADH permanece igual (Tabla 8.5); esto indica que el incremento en los niveles de ZWF<sub>Zm</sub>, GLK<sub>Ec</sub> y GALP<sub>Ec</sub> en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> ocasionan un incremento en la velocidad específica consumo de glucosa, aunque la velocidad específica de crecimiento y de producción de etanol no cambia durante la fase exponencial del cultivo con respecto a la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> (Figura 8.9). Por otro lado, los niveles de actividad específica de KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 con respecto a KO11 PPAL<sup>-</sup>, fueron para ZWF 6 veces mayor, para la vía de E-D incrementó 11 veces, sin embargo la actividad de PDC y ADH permanecen iguales (Tabla 8.5). Estos resultados indican que el incremento en los niveles de ZWF<sub>Zm</sub>, EDD<sub>Zm</sub>, EDA<sub>Zm</sub>, GLK<sub>Ec</sub> y GALP<sub>Ec</sub> en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> ocasionan un

efecto negativo sobre la  $\mu$ ,  $q_s$  y  $q_{Et-OH}$  disminuyendo estos parámetros cinéticos durante la fase exponencial (Figura 8.9).

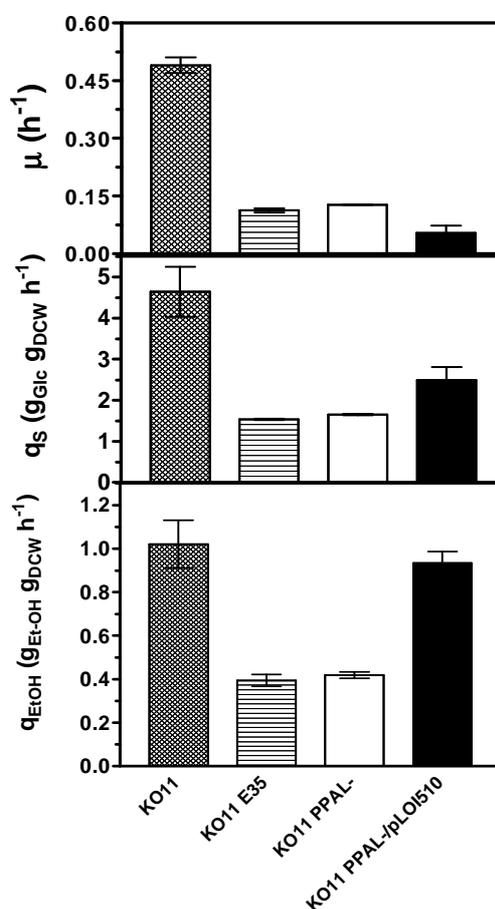
**Tabla 8.5.** Actividades enzimáticas en las cepas KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54 y KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54, en cultivos en medio M9 suplementados con 40 g/l de glucosa, 50  $\mu$ M de IPTG en condiciones no aireadas. KO11 PAPL<sup>-</sup> fue utilizada como control.

Enzima	KO11 PPAL <sup>-</sup>	KO11 PPAL <sup>-</sup> / pZWF <sub>Zm</sub> -pvGlkGalP54	KO11 PPAL <sup>-</sup> / pZEA <sub>Zm</sub> -pvGlkGalP54
ZWF	2.91	21.76	17.3
E-D	0.16	0.16	1.75
PDC	0.64	0.55	0.54
ADH	0.13	0.13	0.14

Finalmente, en las cepas transformantes de KO11 PPAL<sup>-</sup> se observa un efecto similar a la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup>, es decir se sugiere que la enzima PDC está limitando el flujo de carbono a través de la vía de síntesis de etanol, como ya se había observado anteriormente en la cepa KO11 (Huerta-Beristain, et al., 2008) y el incremento de flujo de carbono cuando se incrementaron los niveles de ZWF<sub>Zm</sub>, GLK<sub>Ec</sub> y GALP<sub>Ec</sub> en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> ocasionaron una acumulación de piruvato (anexo B.4), el cual probablemente activó la vía de síntesis de fórmico y acetyl-CoA, además favoreció la acumulación de fosfoenolpiruvato activando la vía de síntesis de succinato (Yang et la., 1999). Aunado a esto la acumulación de PEP provoca inhibición de enzimas glucolíticas como Glucocinasa, regulando de esta forma el consumo de glucosa (Ogawa et al., 2007). En base a esto se propuso evaluar el incremento de actividad enzimática de PDC y ADH en la cepa homoetanológica KO11 PPAL<sup>-</sup> para contrarrestar la limitación por PDC del flujo de carbono hacia etanol.

### 8.5.3 Efecto del incremento del nivel de actividad de $PDC_{Zm}$ y $ADH_{Zm}$ en KO11 PPAL<sup>-</sup>

Para incrementar el flux de carbono hacia la producción de etanol, se evaluó el efecto debido al incremento en el nivel de las enzimas PDC y ADH en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> (cepa transformante: KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510), en cultivos en medio mínimo M9, con 40 g/L de glucosa, condiciones no aireadas y con 100  $\mu$ M de IPTG (Anexo B.5). Las cepas KO11 y KO11 PPAL<sup>-</sup> fueron usadas como controles.



**Figura 8.10.** Resultados del efecto de la sobreexpresión de  $pdz_{Zm}$  y  $adhB_{Zm}$  en KO11 PPAL<sup>-</sup>, durante la fase de crecimiento. KO11 y KO11 PPAL<sup>-</sup> fueron los controles.

Los resultados mostraron que un incremento de 5 veces en la actividad de PDC en KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510 con respecto a KO11 provocó una

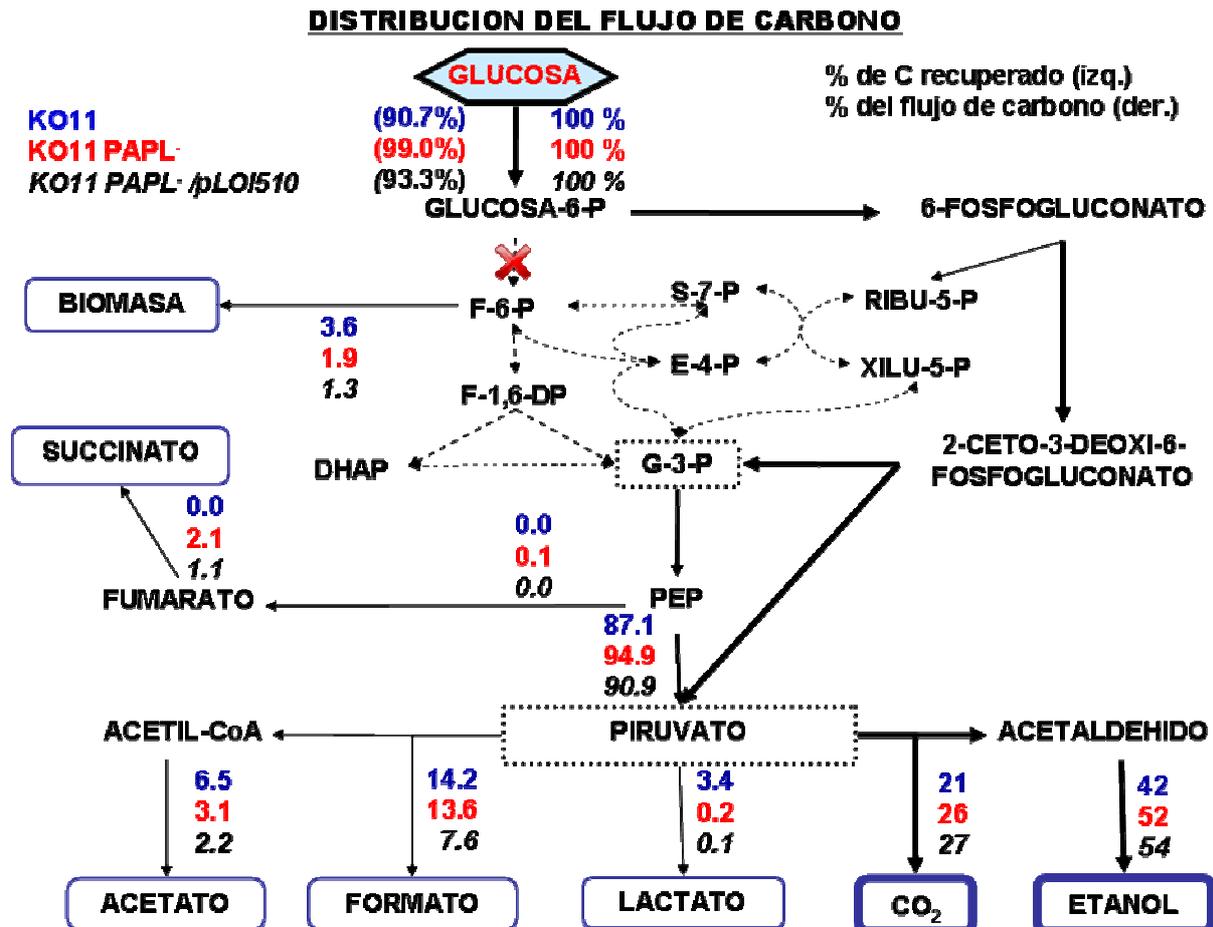
disminución de 88 y 40% en la  $\mu$  y la  $q_s$ , respectivamente (Figura 8.10), durante la fase exponencial del cultivo, ocasionado probablemente por un bajo rendimiento energético y demanda de intermediarios metabólicos para biosíntesis en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> (carga metabólica). En contraste, la redistribución del flux glucolítico mostró una  $q_{EtOH}$  similar a la cepa KO11 (Figura 8.10, anexo B.6).

Estos resultados sugieren que en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510 el flujo de carbono es dirigido principalmente a la síntesis de etanol, usando la vía de Entner-Doudoroff como única vía para el catabolismo de glucosa. Además, se produjo la mitad de biomasa en KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510 con respecto a KO11 y un bajo flujo de carbono hacia la producción de acetato, formato y lactato (Figura 8.1; anexo B.5). En consecuencia, el rendimiento de conversión de glucosa a etanol en medio mineral, fue incrementado de 67.5% para KO11 a 80.9% para KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510 (Tabla 8.6).

### 8.5.4 Análisis de la distribución de flujos de carbono

El análisis de la distribución del flujo de carbono y el balance de carbono, fue estimado a partir de las velocidades volumétricas de consumo de glucosa y de formación de productos de fermentación, cuantificados por cromatografía de gases y HPLC. Los principales productos detectados fueron: etanol, acetato, formato y lactato. En la sección de metodología se muestra como se estimaron los flux de carbono ( $\text{mmol}_c/\text{L}/\text{h}$ ) (anexo B.6) y la distribución del flujo de carbono. En la figura 8.11 se muestra un esquema comparando la distribución de flujos de carbono hacia la síntesis de productos de fermentación a partir de glucosa la glucosa consumida (considerado como el 100% del flujo). La recuperación de carbono a partir de los productos cuantificados fue alrededor del 100% (Figura 8.11), mostrando la consistencia de los resultados obtenidos. Este análisis confirma que la sobreexpresión de *pdcz<sub>m</sub>* y *adhB<sub>zm</sub>* aumenta el flujo de carbono hacia la producción de etanol y reduce dicho flujo hacia la producción de ácidos orgánicos, en la cepa KO11

PPAL<sup>-</sup>/pLOI510. Además estos resultados sugieren que el flujo de carbono en la cepa homoetanológica KO11 PPAL<sup>-</sup> al igual que en KO11 está determinado por el nivel de la enzima PDC, como reportamos previamente, el nivel de PDC<sub>Zm</sub> limita el flujo hacia la producción de etanol en *E. coli* KO11 (Huerta-Beristain et al., 2008).



**Figura 8.11.** Distribución del flujo de carbono para KO11 y KO11 PAPL<sup>-</sup> y KO11 PAPL<sup>-</sup>/pLOI510 en fase estacionaria. Los datos de flujos de carbono están dados en porcentaje, en base a las velocidades volumétricas de consumo de azúcar y formación de productos en mmol<sub>Carbono</sub>/L/h.

### 8.6 Efecto sobre el rendimiento de conversión de glucosa en etanol

El bloqueo de la vía glucolítica en *E. coli* etanológica ocasionó una reducción en el rendimiento teórico de producción de etanol a partir de glucosa en medio mínimo M9. Sin embargo, cuando se incrementó la actividad de PDC

y ADHB dicho rendimiento de conversión de glucosa a etanol respecto al teórico aumentó 13% en comparación con la cepa control (Tabla 8.6). Esto corrobora la hipótesis de que la manipulación del metabolismo central del carbono y/o de las vías fermentativas permite modificar la distribución de flujos e incrementar los rendimientos de conversión de sustratos en productos.

En este trabajo la modulación de la expresión heteróloga de los genes *zwf*, *edd* y *eda* de la vía de Entner-Doudoroff de *Z. mobilis* en *E. coli* KO11 *pgi*<sup>-</sup>, afectó negativamente el flux de carbono a través de la vía de Entner-Doudoroff durante el catabolismo de glucosa hacia la formación de piruvato y etanol bajo condiciones no aireadas, debido probablemente a la disminución en el rendimiento de ATP y en la síntesis de biomasa.

**Tabla 8.6.** Rendimiento de conversión de glucosa en etanol respecto al teórico en la cepa KO11 y sus derivadas. Los datos mostrados son el promedio de dos experimentos, con su respectivo error estándar

<b>Cepa</b>	<b>% respecto al teórico</b>
<b>KO11</b>	<b>67.5 ± 3.5</b>
<b>KO11 <i>pgi</i><sup>-</sup></b>	<b>25.1 ± 2.2</b>
<b>KO11 E35</b>	<b>58.0 ± 3.5</b>
<b>KO11 PPAL<sup>-</sup></b>	<b>74.8 ± 1.6</b>
<b>KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54</b>	<b>64.3 ± 4.2</b>
<b>KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54</b>	<b>57.0 ± 1.3</b>
<b>KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510</b>	<b>80.9 ± 2.9</b>

Rendimiento de etanol a partir de glucosa con respecto al rendimiento teórico (0.51 g<sub>etanol</sub> / g<sub>azúcar</sub>).

Sin embargo, la cepa homoetanolgénica KO11 PPAL<sup>-</sup> obtenida a partir de la cepa evolucionada KO11 E35, mostró incrementos en las actividades enzimáticas de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ZWF) y de la vía de Entner-Doudoroff, con respecto a KO11. Además, un incremento en el nivel de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa en KO11 PPAL<sup>-</sup> permitieron obtener velocidades específicas de formación de etanol similares a las de KO11, pero con la mitad de masa celular y sin flujos de carbono hacia acetato, lactato

y formato. Incrementando el rendimiento etanol/glucosa en medio mineral. De esta manera se demostró que es posible obtener el mismo flujo de carbono usando las dos reacciones iniciales de la vías de las pentosas fosfato y la vía de E-D como rutas alternativas a la vía de Embder-Meyerhoff-Parnas para el catabolismo de glucosa a etanol en *Escherichia coli*.

---

## 9.- CONCLUSIONES

1. El control del flux glucolítico en *E. coli* etanológica KO11 está fuera de la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas y se demostró que la actividad enzimática heteróloga de piruvato decarboxilasa limita el flux de piruvato hacia la formación de etanol.
2. La carga metabólica ocasionada por transcripción de plásmidos multicopia en *E. coli* JM101 fue contrarrestada por incrementos en la síntesis de intermediarios metabólicos de la vía de las pentosas y modificaciones en las relaciones NADH/NAD<sup>+</sup> y NADPH/NADP<sup>+</sup>.
3. En la cepa SM14 (JM101 *pgi*), el incremento de actividad de  $ZWF_{Zm}$ ,  $GLK_{Ec}$  y  $GALP_{Ec}$  permitió la recuperación del transporte y fosforilación de glucosa, que junto con incrementos en la síntesis de intermediarios metabólicos de la vía de las pentosas y la cogeneración de NADPH y NADH, permiten recuperar parcialmente la velocidad específica de crecimiento.
4. KO11 *pgi* tiene un crecimiento marginal en condiciones de fermentación; sin embargo, por evolución adaptativa se obtuvo la cepa E35, la cual recuperó 25% la velocidad de crecimiento respecto a KO11 en condiciones de fermentación. No obstante, en E35 se ve favorecida la formación de ácidos orgánicos.
5. En la cepa KO11 E35 el incremento de los niveles de  $ZWF_{Zm}$ ,  $GLK_{Ec}$  y  $GALP_{Ec}$  permitió incrementar el flujo glucolítico y el de formación de lactato, corroborando la limitación de  $PDC_{Zm}$  para canalizar el flujo de carbono hacia la producción de etanol.
6. A partir de E35 se construyó una variante interrumpiendo las vías fermentativas nativas de *E. coli*. La cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> (KO11 E35  $\Delta ack-pta::FRT$ ,  $\Delta ldhA::FRT$ ), la cual a parte de etanol, favorece la acumulación de piruvato, confirma que existe limitación de  $PDC_{Zm}$  para dirigir el flujo de carbono hacia etanol.

7. KO11 PPAL<sup>-</sup> produce poca biomasa debido al bajo rendimiento energético de ATP; resultado de la canalización del flujo de carbono principalmente a través de la vía de de Entner-Doudoroff y de la inactivación de síntesis de acetato.
8. La sobreexpresión de *pdc<sub>zm</sub>* y *adh<sub>zm</sub>* en *E. coli* KO11 PPAL<sup>-</sup> permitió obtener una cepa homoetanologénica con flujos específicos de producción de etanol a niveles similares a los de KO11.
9. En conjunto, estos resultados demostraron que es posible obtener el mismo flujo específico de carbono usando la vía de Entner-Doudoroff como ruta alterna a la vía de Embden Meyerhoff Parnas para el catabolismo de glucosa a etanol.

## 10.- PERSPECTIVAS

En cepas de *E. coli* usadas para la expresión de proteínas recombinantes, integrar en cromósoma el gen *zwf<sub>Zm</sub>*, con el propósito de mejorar la producción de proteínas heterólogas y reducir el efecto de carga metabólica.

Integrar en el cromosoma de KO11 PPAL<sup>-</sup> una copia de los genes de *zwf*, *pdh* y *adhB* de *Z. mobilis*, bajo regulación de algún promotor fuerte.

Mediante estudios de flujos metabólicos con carbono marcado y espectrometría de masas, confirmar que el flujo de carbono, hacia la producción de etanol, en la cepa KO11 PPAL<sup>-</sup> se da mayoritariamente a través de la vía de Entner-Doudoroff.

Utilizar como cepa base a KO11 PPAL<sup>-</sup> y modificarla para realizar estudios de producción de metabolitos relacionados con la vía de las pentosas fosfato, Entner-Doudoroff, rutas heterólogas y vías donde se requiera una cantidad elevada de NADH o NADPH, tales como la de síntesis de riboflavina, lactato, alanina y poli-hidroxi-butirato, entre otros.

Con las cepas KO11 E35/pZEA<sub>Zm</sub> ó KO11 PPAL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>, evaluar una estrategia de cultivo donde se pueda crecer la cepa en condiciones aeróbicas y alcanzar una alta biomasa y después inducir la expresión de la vía de Entner-Doudoroff en condiciones anaeróbicas, inhibiendo el flujo a través de la glucólisis.

---

## 11.- REFERENCIAS

1. **Algar E. M., Scopes R.K.** 1985. Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol.* 2:275-287.
2. **Amann E., Ochts B., Karl-Josef A.** 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69:301-315.
3. **Arfman N., Worrell V., Ingram L. O.** 1992. Use of the *tac* promoter and *lacI<sup>q</sup>* for the controlled expression of *Zymomonas mobilis* fermentative genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol.* 174:7370-7378.
4. **Bailey E. J.** 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science.* 252: 1668-1674.
5. **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.
6. **Bergmeyer J., Gawehn, K.** 1974 "Methods of enzymatic analysis". VCH, Weinheim, Germany.
7. **Böck A., Sawers G.** 1996. Fermentation: En *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Eds. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology. Press Washington D.C. 1:262-282.
8. **Canonaco F., Hess T. A., Heri S., Wang T., Szyperski T., Sauer U.** 2001. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett* 204:247-252.
9. **Conway T., Fliege R., Jones-Kilpatrick D., Liu J., Barnell W. O., Egan S. E.** 1991. Cloning characterization and expression of the *Zymomonas mobilis eda* gene that encodes 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase of the Entner-Duodoroff pathway. *Mol Microbiol.* 5 (12): 2901-2911.
10. **Conway, T.** 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev.* 1:1-27.

11. **Csonka LN, Fraenkel DG.** 1977. Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 252: 3382-91.
12. **Datsenko K. A., Wanner B.L.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:6640-5.
13. **Emmerling M., Bailey J. E., Sauer U.** 1999. Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. Metabolic Eng 1:117-127.
14. **Faik P., Kornberg H. L.** 1973. Isolation and properties of *E. coli* mutants affected in gluconate uptake. FEBS Lett. 32: 260-264.
15. **Favela T. E.** 1993. Biotecnología alimentaria “Producción de alcohol de *Zymomonas mobilis*”. Cap. 19. Edit. Limusa. Pag. 617-636.
16. **Flores N.** 1995. Construcción y caracterización de cepas de *Escherichia coli* mutantes en el sistema de carbohidratos PTS. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM. México.
17. **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 (13)C labeling and NMR spectroscopy. Metab Eng. 4:124-37.
18. **Flores S., Herrera R. de Anda, Gosset G., Bolivar F.** 2004. Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. Biotechnol Bioeng. 87: 485-494.
19. **Fong S. S., Nanchen A., Palsson B. O., Sauer U.** 2005. Latent pathway activation and increased pathway capacity enable *Escherichia coli* adaptation to loss of key metabolic enzymes. J Biol Chem. 281(12): 8024-33.
20. **Fraenkel D. G.** 1996. Glycolysis: En *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. Eds. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology. Press Washington D.C. 1:189-198.

- 
21. **Fuhrman L. K., Wanken A., Nickerson K.W., Conway T.** 1998. Rapid accumulation of intracellular 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate in an Entner-Doudoroff aldolase mutant results in bacteriostasis. *FEMS Microbiol Lett.* 159:261-6.
22. **Garay-Arroyo A., Covarrubias A. A., Clark I., Niño I., Gosset G., Martinez A.** 2003. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 63:734-41.
23. **Gonzalez R., Tao, H., Shanmugam K. T., York S. W. e Ingram L. O.** 2002. Global gene expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xilose. *Biotechnol Progress* 18:6-20.
24. **Guedon E., Desvaux M., Petitdemange H.** 2002. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol.* 68:53-8.
25. **Hahn Hagerdal B., Jeppsson H., Mohagheghi A.** 1994. An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing microorganisms in a xylose-rich acid hydrolysate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41:62-72.
26. **Han M-J., Yoon S-S., Lee S-Y.** 2001. Proteome análisis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing poly (3-hydroxybutyrate). *J Bacteriol.* 183:301-308.
27. **Hernández-Montalvo V, Martinez A, Hernandez-Chavez G, Bolivar F, Valle F, Gosset G.** 2003. Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol Bioeng.* 83(6): 687-94.
28. **Ho N. W. Y., Chen Z., Brainard A. P.** 1998. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1852-1859.

- 
29. **Hong S. H., Park S. J., Moon S. Y., Park J. P., Lee S. Y.** 2003. *In silico* prediction and validation of the importance of the entner-duodoroff pathway in poly (3-hydroxybutyrate) production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng.* 83: 854-863.
30. **Hoppner T. C., Doelle H. W.** 1983. Purification and kinetics characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 17:152-157.
31. **Hua Q., Yang C., Baba T., Mori H., Shimizu K.** 2003. Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J Bacteriol.* 185 (24): 7053-7067.
32. **Huerta-Beristain G., F. Bolivar, G. Gosset y A. Martinez.** The role of the reducing power and heterologous glucose-6-phosphate dehydrogenase activity on the metabolic burden effect in *Escherichia coli*. *Biotechnol letter.* (En revisión).
33. **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 Biotech.* 15: 55-64.
34. **Huerta B. G.,** 2004. Manipulación del metabolismo central de *Escherichia coli* para incrementar la productividad de etanol. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM. México.
35. **Ingram L. O., Gomez P. F., Lai X., Moniruzzaman M., Wood B. E., Yomano L.P., York S. W.** 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol Bioeng;* 58:204-214.
36. **Ingram L. O., Aldrich H. C., Borges A. 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 Progress.* 15: 855-866.

- 
37. **Jarboe, L.R., Grabar, T.B., Yomano, L.P., Shanmugan, K.T., Ingram, L.O.** 2007. Development of Ethanologenic Bacteria. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 108, 237-261.
  38. **Jeppsson M., Johansson B., Hahn-Hagerdal B., Gorwa-Grauslund M. F.** 2002. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Appl Environ Microbiol.* **68**:1604-1609.
  39. **Kabir M. M., 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.
  40. **Koebmann B. J., Westerhoff H. V., Snoep J. L., Nilsson D., Jensen P. R.** 2002a. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.* 184:3909-3916.
  41. **Kimata K., Tanaka Y., Inada T., 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): 3587-95.
  42. **Lerner CG, Inouye M.** 1990. Low copy number plasmids for regulated low-level expression of cloned genes in *Escherichia coli* with blue/white insert screening capability. *Nucleic Acids Res.* 18:4631.
  43. **Lim S-J., Jung Y-M., Shin H-D., Lee Y-H.** 2002. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J Biosc Bioeng* 93:543-549.
  44. **Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.** 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring N. Y.: Cold spring harbor laboratory press. pp. 68-69.
  45. **Martínez, A., York, S. W., Yomano, L. P., Pineda, V. L., Davis, F. C., Shelton, J. C. e Ingram, L.O.** 1999. Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdC*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol Progress* 15, 891–897.

- 
46. **Marx A., Hans S., Mockel B., Bathe B., de Graaf A. A. 2003.** Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* 104(1-3): 185-97.
  47. **McDonald T. P., Walmsley A. R., Henderson P. J. F. 1997.** Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H<sup>+</sup> symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J Biol Chem.* 272:15189-15199.
  48. **Nielsen J. 2001.** Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 263-283
  49. **Ogawa t., Mori H., Tomita M., Yoshino M. 2007.** Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 158:159-163.
  50. **Ohta K, Beall, D.S. Shanmugam, K.T. Ingram L.O. 1991** Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:893-900.
  51. **Osman Y. A., Conway T., Bonetti S. J., Ingram L. O. 1987.** Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: enzyme and metabolite levels during batch fermentation. *J Bacteriol.* 169:3726-3736.
  52. **Panesar P. S., Marwaha S. S., Kennedy J. F. 2006.** *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *J Chem Technol Biotechnol.* 81:623-635
  53. **Peekhaus N., Conway T. 1998** What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 180(14):3495-502.
  54. **Peng L, Shimizu K. 2003.** Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61: 163-178.
  55. **Postma P. W., Lengeler J. W., Jacobson G. R. 1996.** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology (F.C.

- 
- Neidhardt, Ed.), 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 1, pp.1149-1174, Am Soc Microbiol., Washington, DC.
56. **San K. Y., Bennett G. N., Berrios-Rivera S. J., Vadali R. V., Yang Y. T., Horton E., Rudolph F. B., Sariyar B., Blackwood K.** 2002. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 4:182-92.
57. **Sauer U., Canonaco F., Heri S., Perrenoud A., Fischer E.** 2003. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 279:6613-6619.
58. **Schaaff I., Heinisch J., Zimmermann F. K.** 1989. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast.* 5:285-290.
59. **Scopes R. K.** 1997. Allosteric control of *Zymomonas mibilis* glucose-6-phosphate dehydrogenase by phosphoenolpiruvate. *J Biochem.* 326: 731-735.
60. **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.
61. **Snoep J. L., Arfman N., Yomano L. P., Fliege R. K., Conway T., Ingram L. O.** 1994. Reconstruction of glucose uptake and phosphorylation in a glucose-negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J Bacteriol.* 176:2133-5.
62. **Snoep J. L., Arfman N., Yomano L. P., Westerhoff H. V., Conway T., Ingram L. O.** 1996. Control of glycolytic flux in *Zymomonas mobilis* by glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Biotechnol Bioeng.* 141:2329-2337.
63. **Sprenger G. A.** 1995. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol* 164:324-330.

- 
64. **Sprenger G. A.** 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. FEMS Microbiol letters. 145:301-307.
65. **Stephanopoulos G.** 1998. Metabolic engineering. Biotechnol Bioeng. 58:119-120.
66. **Stephanopoulos G.** 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. Metab Eng. 1:1-11.
67. **Stryer L.** 1999. *Biochemistry*. Fourth edition. W.H. Freeman and Company, New York.
68. **Szyperski T.** 1995. Biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C-labeling of proteinogenic amino acids –An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. Eur J Biochem. 232:433-4448.
69. **Taherzadeh M. J., Niklasson C., Lidén G.** 1997. Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. Chem. Eng. Sci. 52:2653-2659.
70. **Tao H., González R., Martínez A., Rodríguez M., Ingram L. O., Preston J. F. y Shanmugam K. T.** 2001. Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. J Bacteriol. 183:2979-2988.
71. **Tarmy E. M., Kaplan N. O.** 1968. Kinetics of *Escherichia coli* B D-Lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. J Biol Chem 243:2587-2596.
72. **Yang Y-T., San K-Y., Benect GN.** 1999. Redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* with fermentative lactate dehydrogenase overexpression and deletion. Metab Eng 1:141-152.
73. **Wang Q., Wu C., Chen T., Chen X., Zhao X.** 2006. Expression of galactose permease and pyruvate carboxylase in *Escherichia coli ptsG* mutant increases the growth rate and succinate yield under anaerobics conditions. Biotechnol Lett. 28: 89-93.

---

## 12. ANEXOS

### Anexo A. Presentación del manuscrito

Allocate this manuscript in the section: Microbial and Enzyme Technology

#### **Increased activity levels of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* alleviates the metabolic burden effect in *Escherichia coli***

Gerardo Huerta-Beristain, Guillermo Gosset and Alfredo Martinez\*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México

\* Corresponding author: E-mail: alfredo@ibt.unam.mx

Tel: (+777) 32916 01 Fax: (+777) 317 2388

**Keywords** *Escherichia coli*; Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Growth rate; Metabolic burden; NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio, *Zymomonas mobilis*

Received

Accepted

**Abstract** To analyze the effects that increased activity levels of glucose-6-phosphate dehydrogenase (ZWF) had on the metabolic burden effect in *Escherichia coli*, *i.e.* in the specific growth rate ( $\mu$ ) and in the NADH/NAD<sup>+</sup> and NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios, strain JM101 was transformed with two pTrc99A derivatives. pZWF<sub>Ec</sub> and pZWF<sub>Zm</sub> were used to modulate the activity of ZWF from *E. coli* (ZWF<sub>Ec</sub>) and *Zymomonas mobilis* (ZWF<sub>Zm</sub>). ZWF<sub>Ec</sub> and ZWF<sub>Zm</sub> have different catalytic properties, including dissimilar affinities to reduce NADP<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup>. The presence of plasmid pTrc99A reduced the  $\mu$  by 25%, but increases in ZWF<sub>Ec</sub> and ZWF<sub>Zm</sub> activities allowed 88% and 100% recovery of the growth rate. In addition to an increase of precursor levels from the pentose phosphate pathway, results show that, in comparison to the

wild type strain, increases in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio promote the increase on  $\mu$ , but increases in the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio decrease this parameter.

### **Introduction**

*Escherichia coli* is a microbial host widely used for the overexpression of homologous and heterologous genes in the industrial production of proteins and metabolites. Frequently, high gene expression levels are obtained using multicopy plasmids and strong promoters. Plasmid size, plasmid copy number, promoter strength, plasmid replication, and the translation of expressed genes can have a variety of effects on host physiology (Birbaum and Bailey, 1991). It has been recognized that the introduction and expression of foreign DNA in a host organism often modifies its metabolism in ways that may damage normal metabolic performance (Diaz-Ricci and Hernandez, 2000). Metabolic burden is due to an increase in the biosynthetic demand not only for precursors and energy for plasmid replication, but also for the synthesis and translation of plasmid-encoded mRNA (Glick 1995; Flores et al., 2004). Metabolic burden also induces perturbations on the regulatory systems of *E. coli* altering central metabolic pathways (Diaz-Ricci and Hernandez, 2000). Metabolic burden associated with plasmid replication without an encoding gene is lower when compared to the effect of over-expressing genes encoding a recombinant protein (Anderson et al., 1996; Bentley 1990; Rozkov et al., 2004). The effects of metabolic burden include reduction in the specific growth rate, biomass yield, and the specific yield of proteins or metabolites (Birbaum and Bailey et al., 1991).

Several works have been reported with the aim to counteract the effects of metabolic burden. Most of these studies have been related to increasing the cellular energy level; altering metabolic gene expression by inactivation of global regulators; amplifying the carbon flux through a metabolic pathway for the formation of intermediates, cofactors and energy for biosynthesis and other

---

metabolic processes (Flores et al., 2004; Ow et al., 2006), as well as modifying glucose transport capacities of *E. coli* (Chou et al., 1994). It has been widely reported that when *E. coli* grows aerobically in mineral medium, 22 to 30% of the internalized glucose is driven toward the pentose phosphate pathway through glucose-6-phosphate dehydrogenase; part of this carbon flux is directed to nucleotide, amino acid and vitamin biosynthesis (Flores et al., 2002; Kabir and Shimizu 2003). In this process, ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate are used as precursors for nucleotide and aromatic amino acids, respectively. NADPH participates mostly in biosynthetic reactions and is mainly produced by glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from the oxidative branch of the pentose phosphate pathway (Figure 1). It is known, that glucose-6-phosphate dehydrogenase from *E. coli* ( $ZWF_{Ec}$ ) and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Z. mobilis* ( $ZWF_{Zm}$ ) have different catalytic properties, including dissimilar affinities for  $NADP^+$  and  $NAD^+$  (Csonka and Fraenkel 1977; Scopes 1997). Thus, different effects with regard to  $NADH/NAD^+$  and  $NADPH/NADP^+$  ratios can be expected when overexpressing genes encoding  $ZWF_{Ec}$  or  $ZWF_{Zm}$ . In this study, the physiological effects of amplifying the carbon flux through the pentose phosphate pathway (PPP), as well as modifications in the  $NADPH/NADP^+$  and  $NADH/NAD^+$  ratios were evaluated by increasing the intracellular ZWF activity, either from *E. coli* or *Z. mobilis*, to study their effect on the metabolic burden in *E. coli*.

### Figure 1

## **Materials and methods**

### Strains and plasmids

---

Strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *E. coli* strain DH5 $\alpha$  was used for plasmid propagation. For all recombinant DNA techniques, cells were grown in Luria Broth (LB) or LB agar plates (Sambrook et al., 1989). Ampicillin was used for selection and propagation of cultures at 200 and 50 mg/l, respectively. *E. coli* strains and plasmids used in this study are described in Table 1. They were obtained using the standard CaCl<sub>2</sub> chemical method to generate competent cells (Sambrook et al., 1989). Stock cultures were stored in glycerol (40%) at -70°C. Cultures were grown aerobically in shake flasks with M9 medium supplemented with 2 g/l of glucose. Plasmid pZWF<sub>Zm</sub> was generated by cloning the *zwf*<sub>Zm</sub> gene into the MCS of the pTrc99A vector. Gene *zwf*<sub>Zm</sub> was obtained by PCR amplification using specific primers (Table 1) designed according to known sequences (<http://www.kegg.com/>). PCR reactions using genomic DNA as template from *Z. mobilis* were as follows: 1 cycle of 10 min at 95°C, 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, 3 min at 68°C, and 1 cycle of 10 min at 68°C. The DNA fragment obtained by PCR (1.49 kb) was digested with *Nco*I, purified and cloned in the *Nco*I site of pTrc99A obtaining the pZWF<sub>Zm</sub> plasmid (5.65 kb). Gene *zwf*<sub>Ec</sub> is also under the control of the *trc* promoter of the pTrc99A vector (Table 1; Flores et al., 2004).

### Table 1

#### Culture media and growth conditions

Working strains were transferred from glycerol stocks to LB solid medium without antibiotics for JM101, and with ampicillin (50 mg/l) for JM101 containing pTrc99A derivatives. Inocula were grown overnight in shake flasks (37°C, 300 rpm) in mineral M9 medium (Sambrook et al., 1989) supplemented with 2 g/l glucose. M9 contains per liter: 6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl and 0.5 g NaCl. The following components were sterilized by filtration and then added to the above mixture (per liter of final medium): 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub>, 1 ml

---

thiamine hydrochloride (1 mg/ml). Batch cultures were grown in 250 ml shake flasks (37°C, 300 rpm) containing 50 ml of mineral M9 medium, 50 mg/l ampicillin and different isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentrations. Cultures were started from exponential phase growing inocula ( $OD_{600\text{ nm}} \sim 1.0 = 0.37\text{ g/l}$ ); test cultures were initiated by adding cells to an initial  $OD_{600\text{ nm}} = 0.05$ . All cultures were carried out in triplicate; averages and standard errors are shown in plots.

### Analytical techniques

Samples were periodically taken from cultures to measure their optical density at 600 nm, whereas cell mass was calculated using a previously determined conversion factor of  $1\text{ }OD_{600} = 0.37\text{ g/l}$  dry cell weight. Specific growth rate determinations were calculated as the slope of linear regressions of the logarithm of dry cell mass weight ( $g_{DCW/l}$ ) vs time during the exponential growth phase of the cultures. Samples for enzymatic activity determination were prepared from cells growing in the exponential phase (6 h culture elapsed time), harvested by centrifugation (10,000 x g, 10 min), washed twice with 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 20 mM KCl, 5 mM  $MnSO_4$ , 2 mM DTT and 0.1 mM EDTA, dissolved in the same buffer and disrupted by sonication (four 15-s pulses in a cold bath; Ultrasonic Disrupter, Soniprep 150). Cell debris was removed by centrifugation (10,000 x g, 10 min, 4°C); the resulting crude cell extracts were immediately used for determination of enzymatic activities or stored at -20 °C.

ZWF specific activity was determined spectrophotometrically (Biomate 5, ThermoSpectronic, NY); coupling reactions to  $NADP^+$  and  $NAD^+$  reduction (extinction coefficient of  $6.22\text{ cm}^{-1}\text{ mM}^{-1}$

---

<sup>1</sup>) at 340 nm and 30°C (Peng and Shimizu, 2003). Enzymatic activities are reported as international units (IU) per milligram of protein. Protein concentrations were measured using the Bradford assay. All determinations were performed in triplicate.

Quantification of NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, NADH and NADPH was carried out with a modification of the method reported by Bergmeyer (1985). Briefly, 2 ml of bacterial suspension were taken with a pipette and immersed either in 1 ml 0.3 N HCl to extract NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup>, or in 1 ml 0.3 N KOH to extract NADH and NADPH. Alkaline extracts were supplemented with 10 mg/ml CuCl to precipitate interfering thiols. Before assaying nucleotides, extracts were neutralized by the addition of either 0.3 N Triethanolamine-HCl to the alkaline extract or 0.3 N KOH to the acid extract (Lilius et al., 1979). Nucleotides were quantified spectrophotometrically (Biomate 5, ThermoSpectronic, NY); coupling reactions to NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> reduction or NADH and NADPH oxidation (extinction coefficient of 6.22 cm<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>) at 340 nm and 30°C. The oxidation of NADH was catalyzed with lactate dehydrogenase (LDH), and the one for NADPH with glutamate dehydrogenase. NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> were quantified by the change into their respective reduced forms. These quantifications were carried out by coupling the reactions with alcohol dehydrogenase (ADH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (ZWF) enzymes, respectively. The assay conditions were: wavelength 340 nm, temperature 30 °C, and light path 10 mm.

## Results

To analyze the effects that increased activity levels of glucose-6-phosphate dehydrogenase (ZWF) had on the metabolic burden effect in *E. coli*, *i.e.* in the specific growth rate ( $\mu$ ) and in the NADH/NAD<sup>+</sup> and NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios, strain JM101 was transformed with three different multicopy plasmids containing the same promoter: pTrc99A, pZWF<sub>Ec</sub> and pZWF<sub>Zm</sub> (Table 1).

---

### Growth rate recovery of JM101 by increasing the $ZWF_{Ec}$ or $ZWF_{Zm}$ level

To test whether the negative effect of the metabolic burden on the specific growth rate ( $\mu$ ) could be counteracted by increases in the  $ZWF_{Ec}$  or  $ZWF_{Zm}$  activity, the overexpression of  $zwf_{Ec}$  or  $zwf_{Zm}$  was evaluated. JM101/pTrc99A showed a  $\mu$  of  $0.54 \text{ h}^{-1}$ , whereas for JM101 the  $\mu$  was  $0.66 \text{ h}^{-1}$  (Figure 2A). These results indicate that the presence of plasmid pTrc99A causes a detectable metabolic burden effect, manifested as an 18% reduction in  $\mu$ . JM101/p $ZWF_{Ec}$  without IPTG induction showed a higher reduction in growth rate ( $\mu = 0.49 \text{ h}^{-1}$ ) in comparison with JM101 and JM101/pTrc99A (Figure 2A). The induction of the cloned  $zwf_{Ec}$  gene in JM101/p $ZWF_{Ec}$  with  $1 \mu\text{M}$  IPTG increased the growth rate to  $0.52 \text{ h}^{-1}$  and to  $0.58 \text{ h}^{-1}$  with  $10 \mu\text{M}$  IPTG (Figure 2A). In this case, the ZWF specific activity level in JM101/p $ZWF_{Ec}$  was enhanced from 6.23 to  $59.55 \text{ IU}\cdot\text{mg protein}^{-1}$  (Figure 2B). Further increments in induction with 30 and  $100 \mu\text{M}$  IPTG produce a higher enhancement in specific activity, but  $\mu$  was lower than values found with  $10 \mu\text{M}$  (Figure 2A and 2B).

#### Figure 2

Table 2 shows that  $ZWF_{Zm}$  has at least one order of magnitude higher affinity for  $\text{NAD}^+$  than  $ZWF_{Ec}$ , hence we propose that the expression of  $zwf_{Zm}$  can increase the NADH level in an upper degree than  $ZWF_{Ec}$ , and a higher energetic yield can be expected, causing the relief of the metabolic burden effect.

#### Table 2

---

A reduction in  $\mu$  was also observed in strain JM101/pZWF<sub>Zm</sub> in the absence of IPTG when compared to strain JM101/pTrc99A. This result indicates a basal level of expression of gene *zwf*<sub>Zm</sub> that affects the growth rate of JM101/pZWF<sub>Zm</sub> (Figure 3A). Nevertheless, when the expression of *zwf*<sub>Zm</sub> was induced, the specific growth rate with 1  $\mu$ M IPTG increased to 0.55 h<sup>-1</sup> and to 0.64 h<sup>-1</sup> with 100  $\mu$ M IPTG (Figure 3A). In this case the ZWF<sub>Zm</sub> specific activity increased from 0.63 to 5.22 IU·mg protein<sup>-1</sup> (Figure 3B), reaching the same specific growth rate than the wild type strain without metabolic load. Consequently, the negative effect on  $\mu$  of the metabolic burden was counteracted to a higher degree by increasing the ZWF<sub>Zm</sub> specific activity level than the ZWF<sub>Ec</sub>.

### Figure 3

The role of the reducing power turnover in the growth rate recovery of JM101/pZWF<sub>Ec</sub> and JM101/pZWF<sub>Zm</sub>

NADH/NAD<sup>+</sup> and NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios were measured to determine the effect of increasing ZWF<sub>Ec</sub> or ZWF<sub>Zm</sub> activities on the synthesis capacity of those two cofactors. In these experiments, 10 and 100  $\mu$ M IPTG concentrations were used to induce cloned *zwf* genes, *i.e.* levels for which the maximal growth rate recovery was observed for *zwf*<sub>Ec</sub> and *zwf*<sub>Zm</sub>, respectively.

The increase in ZWF<sub>Ec</sub> and ZWF<sub>Zm</sub> specific activity levels provoked an increase (2.18 and 2.28-fold, respectively) of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio with respect the control strains (JM101 and JM101/pTrc99A) (Figure 4A). It is noteworthy that in strains JM101/pZWF<sub>Ec</sub> and JM101/pZWF<sub>Zm</sub> without induction, the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio was similar than in the wild type and control strains containing pTrc99A.

### Figure 4

---

Interestingly the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio increased 3.1-fold in JM101/pTrc99A when compared with the wild type strain without plasmid. This results correlates with the decrease observed in the growth rate (see Figure 2 and 3). In comparison with JM101/pTrc99A, escape transcription of ZWF<sub>Ec</sub> (0 μM IPTG) increased the specific activity levels (Figure 2B), causing an increase in the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio (Figure. 4B), and intensify the reduction in μ (Figure 2A). When ZWF<sub>Ec</sub> was induced with 10 μM IPTG the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio was similar to that found in JM101/pTrc99A. A different behavior was obtained whit JM101/pZWF<sub>Zm</sub>. In comparison with JM101/pTrc99A, no increase in specific activity levels where found when ZWF<sub>Zm</sub> was not induced (0 μM IPTG; Figure 3B), accordingly μ did not change (Figure 3A), but there was a decrease in the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio (Figure. 4B). When ZWF<sub>Zm</sub> was induced with 100 μM IPTG the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio was similar to that found in the wild type strain without plasmid, *i.e.* one third lower than with JM101/pTrc99A, ZWF activity increased and μ value was similar to the one shown by JM101 without plasmid (Figure 3). These results show that in comparison to the wild type strain, increases in the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio promote the increase in the specific growth rate and an increase on the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio decrease this parameter.

## Discussion

The reduction in growth rate is a common response in *E. coli* when it is transformed with multicopy plasmids expressing cloned genes. This behavior may be a consequence of the metabolic burden due to the extra biosynthetic demands for plasmid DNA synthesis, gene expression and translation, or perturbations to the *E. coli* regulatory system affecting central metabolic pathways (Diaz-Ricci and Hernandez 2000). As shown by Flores et al (2004), the overexpression of *E. coli zwf* in JM101

---

resulted in partial recovery of growth rate. In the present work, we observed that both JM101/pZWF<sub>Ec</sub> and JM101/pZWF<sub>Zm</sub> without IPTG induction of the cloned *zwf* genes showed a reduction in growth rate in comparison to JM101/pTrc99A. Partial growth rate recovery was observed when the homologous ZWF specific activity level in JM101/pZWF<sub>Ec</sub> increased 9 times (Figure 2B). These results suggest that increases in ZWF<sub>Ec</sub> activity augments the carbon flow through the oxidative branch of the pentose phosphate pathway, thereby increasing cofactor and building block availability, such as NADPH, R-5-P, and E-4-P (Figure 1). A similar effect was also observed in a recent work, where FruR transcriptional regulator inactivation in plasmid-bearing *E. coli* resulted in partial recovery of growth rate (Ow et al., 2007). These authors attributed this response to an increase in the flux, pointing towards elevated biosynthetic activity, while several enzymes involved in transcriptional and translational processes were upregulated.

The total recovery of growth rate was observed when the ZWF specific activity level in JM101/pZWF<sub>Zm</sub> increased ca. 8-times, from 0.63 to 5.22 IU·mg protein<sup>-1</sup>. This value is eleven-fold lower than the ZWF specific activity observed with JM101/pZWF<sub>Ec</sub> to attain partial growth recovery. Thereby, we hypothesize that this limitation could be explained by variations in the reducing power turnover due to the catalytic properties of the different ZWF enzymes used in this work. It is also probable that multicopy plasmid-bearing cells have NADH limitation.

Our results with JM101/pZWF<sub>Zm</sub> are in accordance with the recent work reported by Ramon et al. (2007), who reported that the cellular stress response to heterologous protein overexpression and secretion is interconnected with the energetic state of the cells. NADPH and NADH are the major reducing power agents in *E. coli*. NADPH is mostly produced in the pentose phosphate pathway as a cofactor and its generation is associated with anabolic reactions, whereas the generation of NADH is related to catabolic and energy-yielding reactions. Also, it has been observed that an increase in

---

NADH turnover due to overproduction of NADH oxidase leads to 70% increase in glucose uptake and a reduction in intracellular redox (Vemuri et al., 2006). In the same study, it was shown that *E. coli* responds by inducing genes involved in the TCA cycle and PDH complex, *i.e.* pathways that synthesize NADH and generate CO<sub>2</sub>. Additionally, once the enzymes levels are no longer limiting, cofactor availability and/or the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio may become limiting (Berríos-Rivera et al., 2002). In our study, the NADH/NAD<sup>+</sup> ratios in JM101/pZWF<sub>Ec</sub> and JM101/pZWF<sub>Zm</sub> were similar, indicating that the induction of both *zwf* increased the availability of NADH, and likely ATP production. It was found that the NADPH/NADP<sup>+</sup> levels were reduced when ZWF<sub>Ec</sub> and ZWF<sub>Zm</sub> activity levels were increased; this ratio was higher in JM101/pZWF<sub>Ec</sub> than in JM101/pTrc99A and JM101 control strains. These results suggest that the growth rate did not completely recover in this construction probably because of the increased NADPH level. However, the NADPH/NADP<sup>+</sup> levels were lower when *zwf*<sub>Zm</sub> was induced; the actual value when  $\mu$  was entirely recovered was as low as the one obtained in the wild type strain. Probably the excess in NADPH hinders cell growth, mainly due to the inhibition of citrate synthase in the TCA cycle (Lim et al., 2002). The inhibition of cellular growth rate due to an excess of NADPH has also been observed in a phosphoglucose isomerase *E. coli* mutant (Canonaco et al., 2001).

## Conclusion

The metabolic burden originated by multicopy plasmid expression in *E. coli* was alleviated by the enhanced expression of the heterologous *zwf*<sub>Zm</sub> gene, which probably caused an increase of precursor levels from the pentose phosphate pathway. These precursors are necessary for the biosynthesis of plasmid DNA, plasmid mRNA and encoded proteins. Remarkably, the enhanced

---

expression of the *zwfZm* gene augmented the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio and likely ATP production, but allow to kept the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio at similar values encountered in the untransformed strain, indicating that higher ratios hinders the cell growth.

**Acknowledgments** We thank Mercedes Enzaldo, Arturo Ocadiz and Alma Martínez-Valle for technical assistance. This work was supported by grants from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT), Estado de Morelos (Project MOR-2004-C02-048), and PAPIIT-DGAPA–UNAM (Project IN220908). G.H-B. held a scholarship from CONACyT.

## References

- Amann E, Ochts B, Karl-Josef A (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors are useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69:301-315
- Andersson L, Yang S, Neubauer P, Endorse SO (1996) Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 15:255-63
- Bentley WE, Murjalili N, Anderen DC, Davis RH, Kompala DS (1990) Plasmid-encoded protein-The principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng* 35:668-681
- Bergmeyer HU (1985) *Methods of enzymatic analysis*. Vol. VII (Metabolites 2). Federal Republic of Germany: Verlagsgesellschaft mbH. 641 pp.
- Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY (2002) The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. *Metabolic Eng* 4:230-237

- 
- Birnbaum S, Bailey JE (1991) Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 37:736-745
- Canonaco F, Hess TA, Heri S, Wang T, Szyperski T, Sauer U (2001) Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett* 204:247-252
- Chou C-H, Bennett GN, San KY (1994) Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol Bioeng* 10:644-647
- Csonka LN, Fraenkel DG (1977) Pathways of NADPH formation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 252:3382-91
- Diaz-Ricci JC, Hernandez ME (2000) Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. *Critical Rev Biotechnol* 20:79-108
- 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 (13)C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng.* 4(2): 124-37
- Flores S, de Anda-Herrera R, Gosset G, Bolívar FG (2004) Growth-rate recovery of *Escherichia coli* cultures carrying a multicopy plasmid, by engineering of the pentose-phosphate pathway. *Biotechnol Bioeng* 87:485-494
- Glick BR (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv* 13:247-261
- Kabir M M, 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

- 
- Lim S-J, Jung Y-M, Shin H-D, Lee Y-H (2002) Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J Biosc Bioeng* 93:543-549
- Lilius E-M, Multanen V-M, Toivonen V (1979) Quantitative extraction and estimation of intracellular nicotinamide nucleotides of *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 99:22-27
- Ow DS-W, Nissom PM, Philp R, Oh SK-W, Yap MG-S (2006) Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  during batch fermentation. *Enzyme Microbial Technol* 39:391-398
- Ow DS-W, Lee RM-Y, Nissom PM, Philp R, Oh SK-W, Yap MG-S (2007) Inactivating FruR global regulator in plasmid bearing *Escherichia coli* alters metabolic gene expression and improves growth rate. *J. Bacteriol* 131:261-269
- Peng L, Shimizu K (2003) Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:163-178
- Ramon R, Ferrer P, Valero F (2007) Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 130:39-46
- Rozkov A, Avignone-Rossa CA, Ertl PF, Jones P, O'Kennedy RD, Smith JJ, Dale JW, Bushell ME (2004) Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnol Bioeng* 88:909-915
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Scopes RK (1997) Allosteric control of *Zymomonas mobilis* glucose-6-phosphate dehydrogenase by phosphoenolpyruvate. *J Biochem* 326:731-735

Vemuri GN, Altman E, Snagurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA (2006) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl Environ Microbiol* 72:3653-3661

**Table 1** Strains, plasmids and primers used in this work

	Relevant genotype	References
<b>Strain</b>		
JM101	F' <i>traD36 proA</i> <sup>+</sup> <i>proB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZΔM15/supE</i> , <i>thi</i> , Δ( <i>lac-proAB</i> )	Laboratory stock
DH5α	F' φ80 <i>dlacZΔM15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>rk</i> <sup>-</sup> <i>mk</i> <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ <sup>-</sup> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Laboratory stock
<b>Plasmids</b>		
pTrc99A	pKK233-2 derived multicopy plasmid with MCS	Amann <i>et al.</i> , 1988
pZWF <sub>Ec</sub>	pTrc99A carrying the <i>E. coli</i> <i>zwf</i> gene	Flores <i>et al.</i> , 2004
pZWF <sub>Zm</sub>	pTrc99A carrying the <i>Z. mobilis</i> <i>zwf</i> gene.	This study
<b>Primer Sequence</b>		
<i>zwf</i> <sub>Zm</sub> 5'	5' GCG <u>GCC ATG GCA</u> AAT ACC GTT TCG ACG ATG 3'	This work
<i>zwf</i> <sub>Zm</sub> 3'	5' CGC <u>GGT ACC</u> GTT GAA TGC AGA TCA GTC ATA CCA 3'	This work

Underlined sequence in oligonucleotides indicates *NcoI* site for cloning in pTrc99A

**Table 2** Affinity constants for ZWF variants used in this work.

ZWF source (References)	Km values (mM)	
<i>Escherichia coli</i> (Csonka and Fraenkel 1977)	NADP <sup>+</sup>	0.015
	NAD <sup>+</sup>	1.70
	G-6-P	0.07
<i>Zymomonas mobilis</i> (Scopes 1997)	NADP <sup>+</sup>	0.013
	NAD <sup>+</sup>	0.105
	G-6-P	0.40

---

**Figure legends**

**Fig. 1** Carbon metabolism central pathways from the upper section of glycolysis. Square indicates overexpressed genes. Two molecules of NADPH are produced per one molecule of glucose-6-phosphate that passes through the pentose phosphate pathway. Purine or pyrimidine nucleotides are synthesized from R-5-P. Abbreviations: 6-PG, 6-phosphogluconate; ABP, aromatic biosynthesis pathway; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; E-4-P, erytrose-4-phosphate; F-6-P, fructose-6-phosphate; F-1,6-DP, fructose-1-6-diphosphate; G-3-P, glyceraldehyde-3-phosphate; His, histidine metabolism; OAA, oxalacetate; PEP, phosphoenolpyruvate; PTS, phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system; Pur, purine metabolism; Pym, pyrimidine metabolism; PYR, pyruvate; R-5-P, ribose-5-phosphate.

**Fig. 2** Growth rate (A) and ZWF specific activity (B) values in JM101 cultures transformed with the multicopy plasmid pZWF<sub>Ec</sub>. JM101 and JM101/pTrc99A were used as control strains.

**Fig. 3** Growth rate (A) and ZWF specific activity (B) values in JM101 cultures transformed with the multicopy plasmid pZWF<sub>Zm</sub>. JM101 and JM101/pTrc99A were used as control strains.

**Fig. 4** Nicotinamide adenine dinucleotide ratios in strain *E. coli* JM101 and transformant derivatives. JM101 and JM101/pTrc99A were used as control strains.

Fig. 1

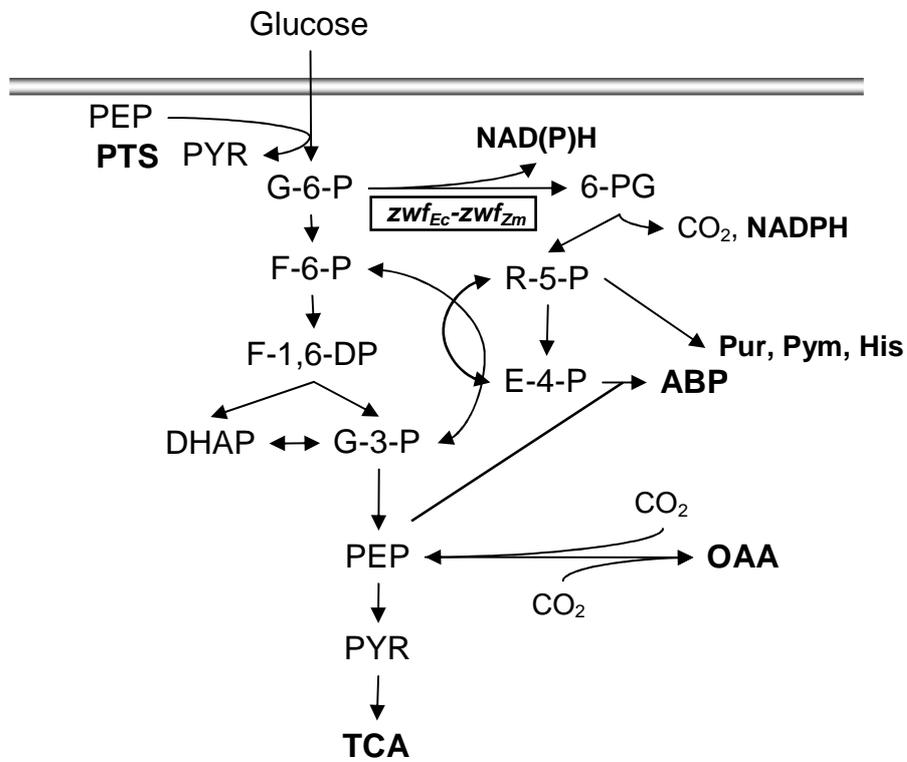


Fig 2.

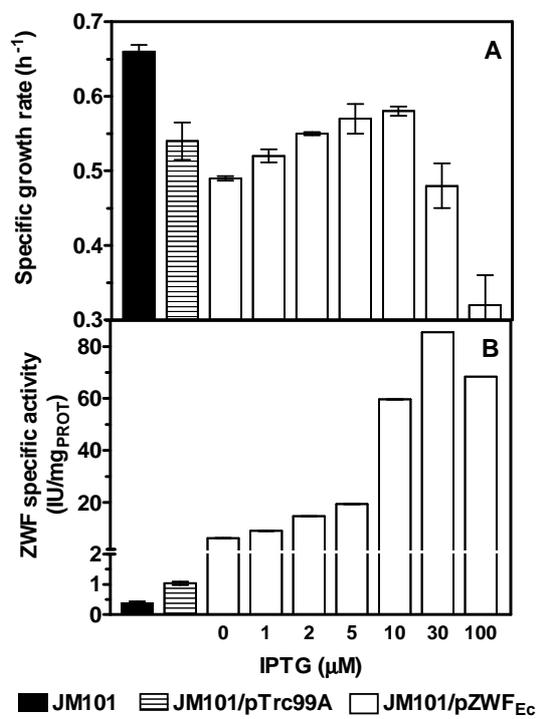


Fig. 3

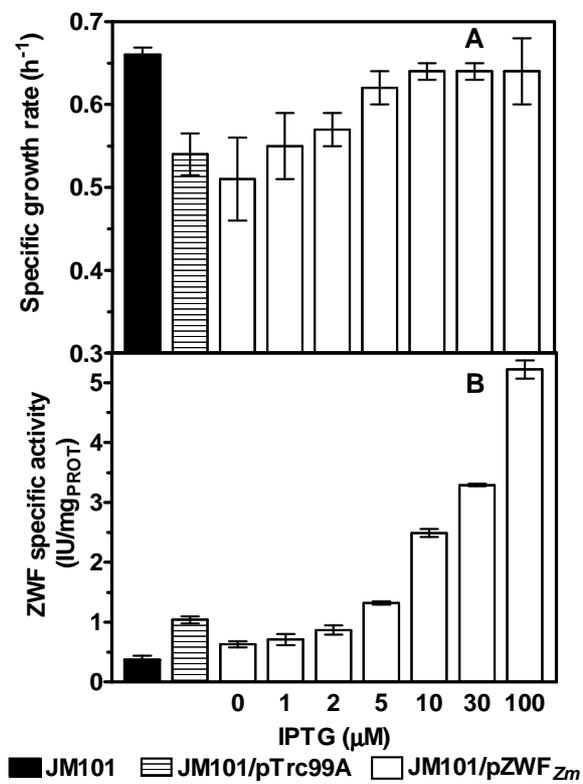
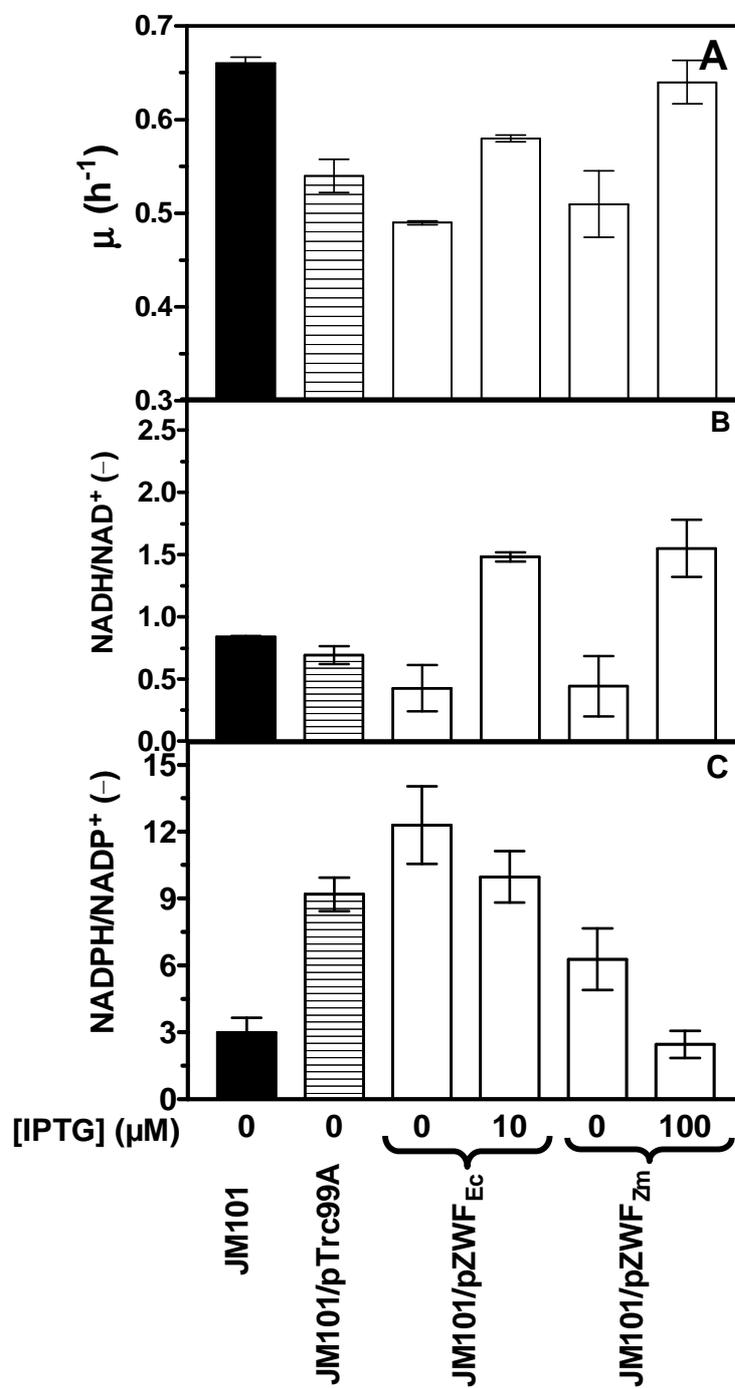
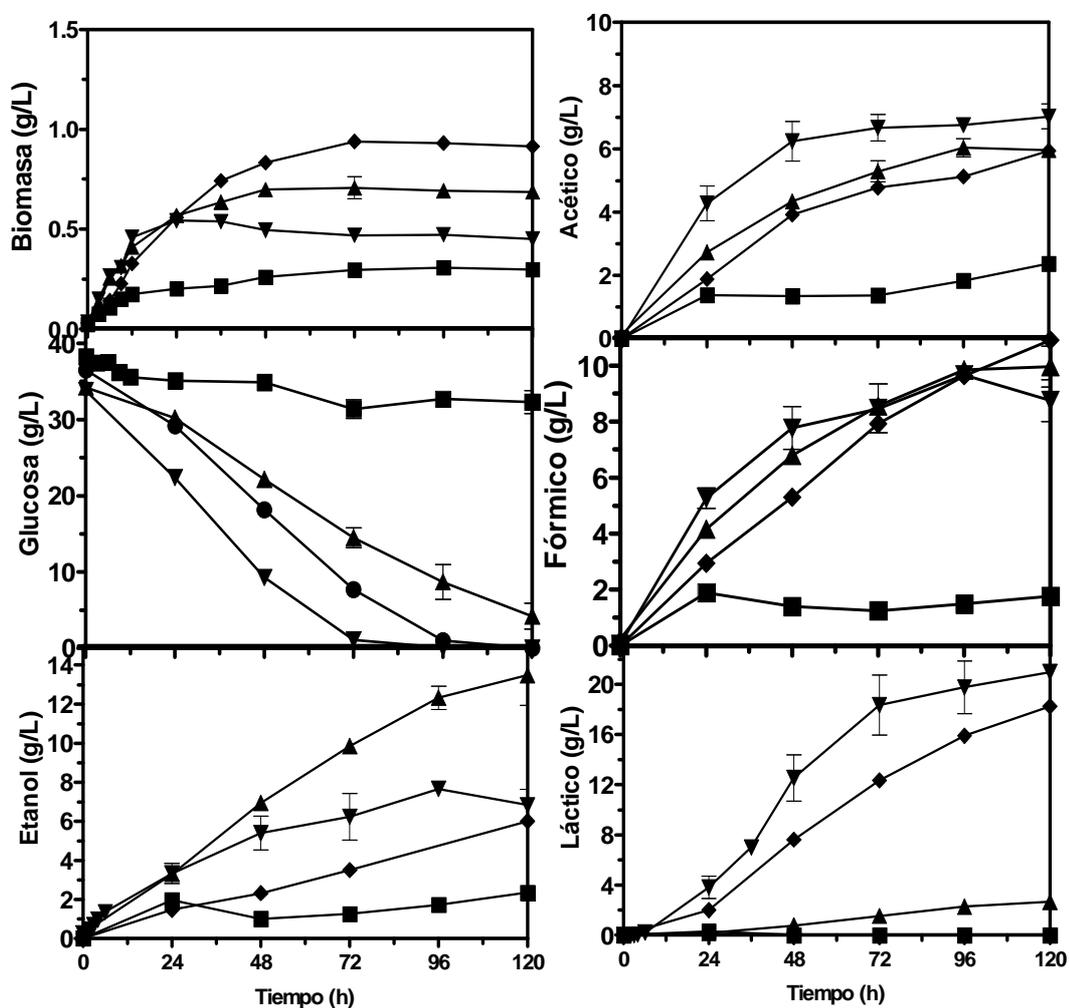


Fig. 4

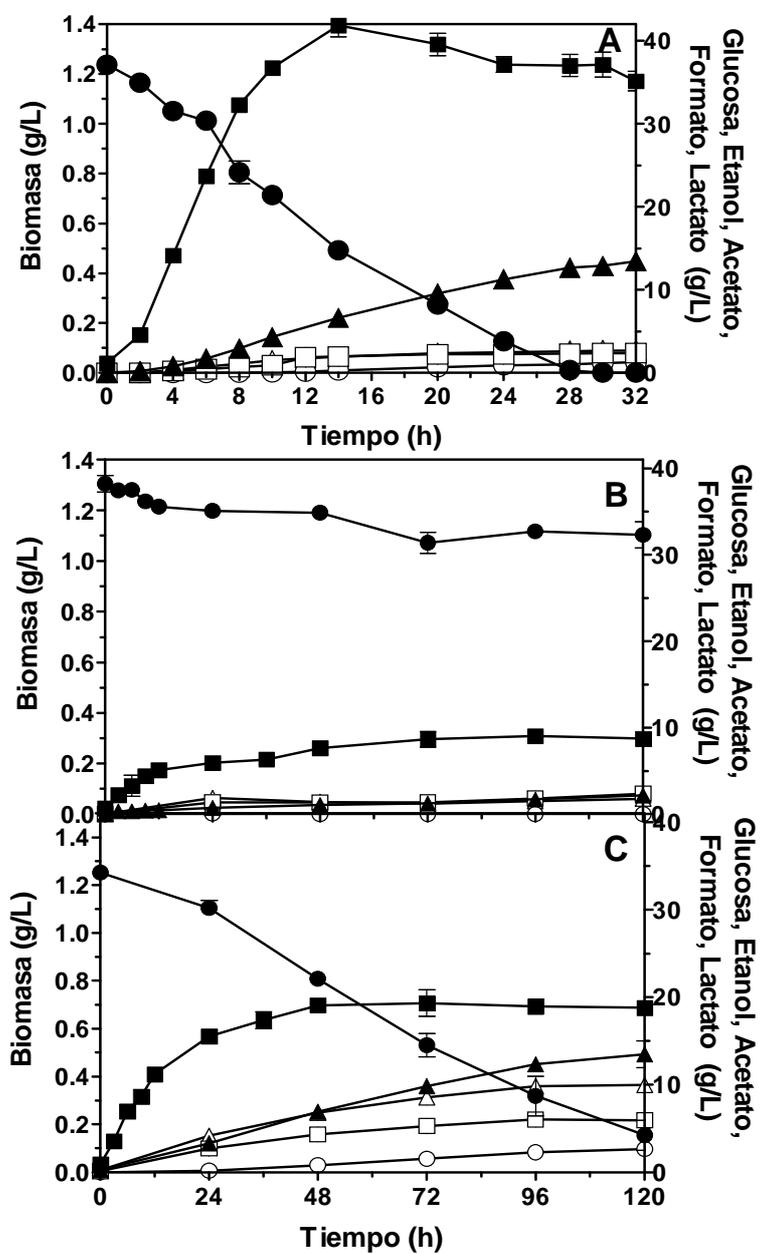


**Anexo B. Cinéticas de crecimiento, consumo de azúcar, producción de etanol y ácidos orgánicos.**

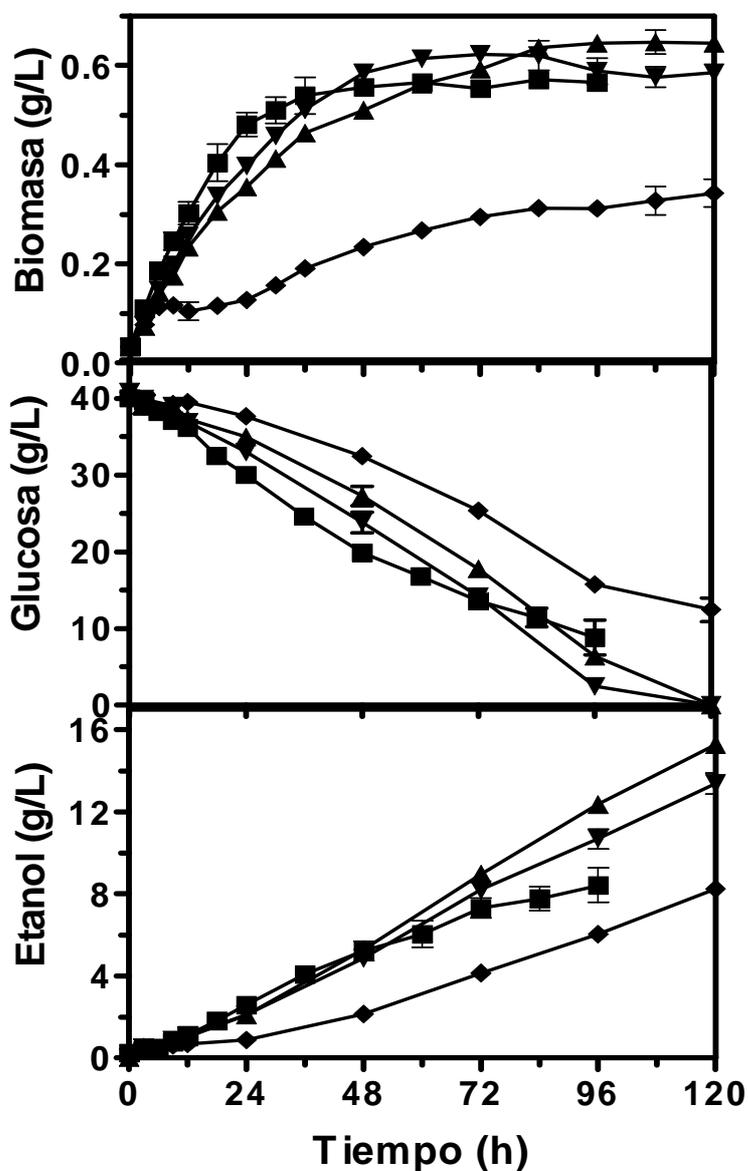
En esta sección se presentan las cinéticas de todos los experimentos reportados. Los datos incluidos son: formación de biomasa, consumo de glucosa, producción de etanol y producción de ácidos orgánicos. En todos los casos los datos que se presentan están corregidos por dilución por la base adicionada a los cultivos. En cada corrida se incluía un experimento control con KO11 y/o KO11 *pgi-*, y los experimentos con la construcción a evaluar se llevaron a cabo, en la todos los casos, por duplicado.



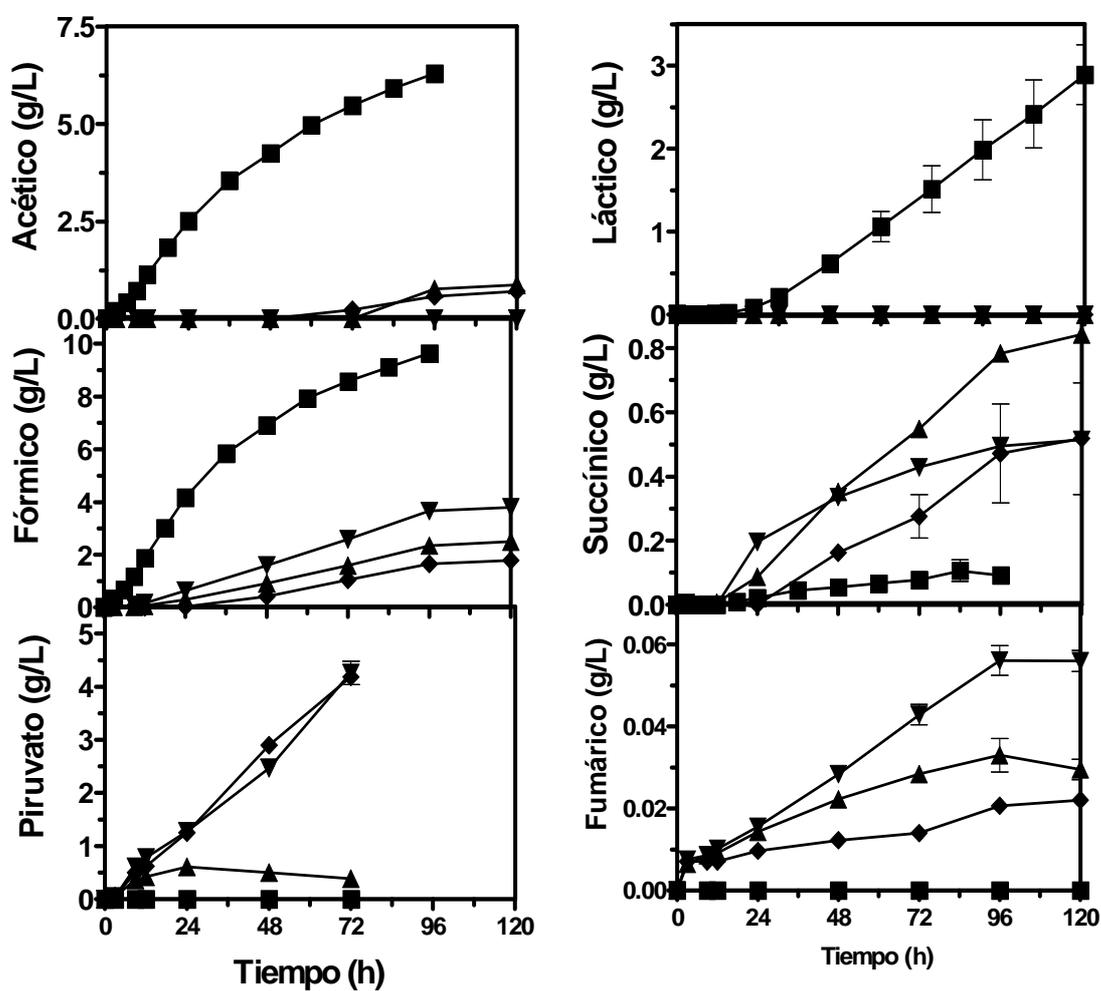
**Anexo B.1.** Cinéticas de producción de biomasa, consumo de glucosa y producción de etanol, acético, fórmico y láctico. ■, KO11 *pgi*; ▲, KO11 *pgi* E35; ▼, KO11 E35/pZWF<sub>zm</sub>-pvG1kGalP54; ◆, KO11 E35/pZEA<sub>zm</sub>-pvG1kGalP54 en las cepas transformantes la transcripción de los plásmidos fue inducida con 50  $\mu$ M de IPTG.



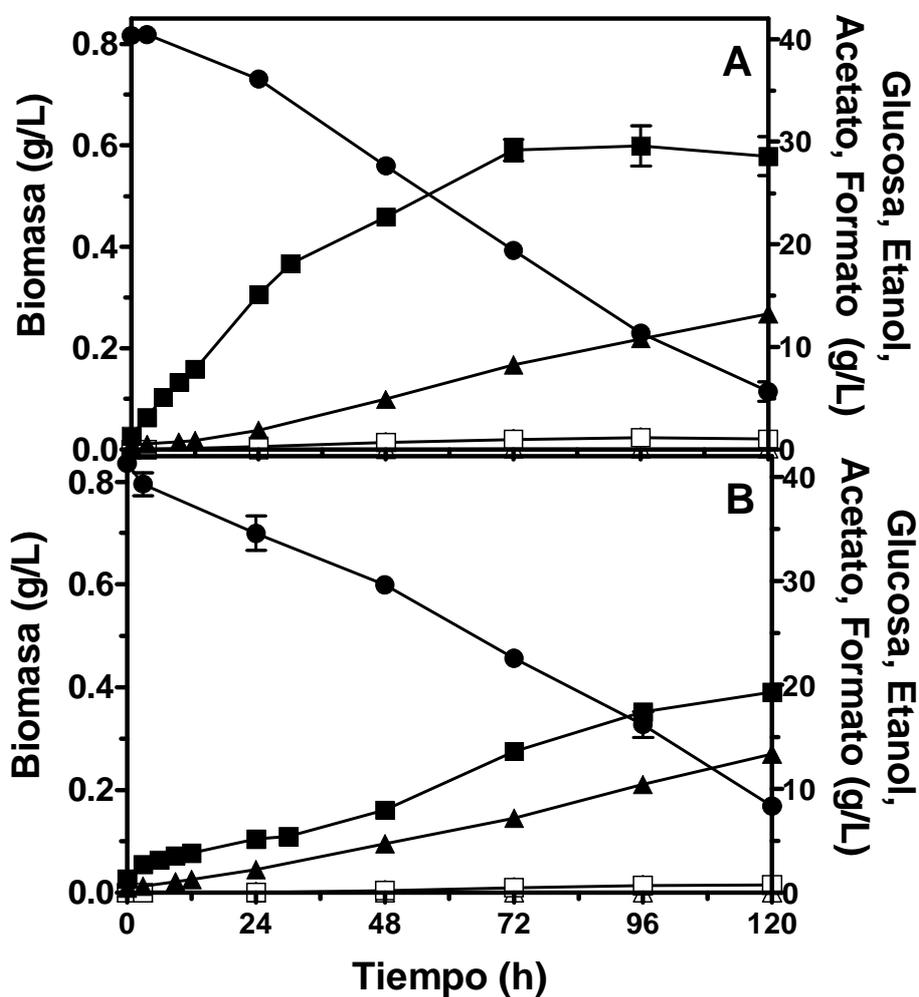
**Anexo B.2.** Cinética de consumo de glucosa, producción de biomasa, de etanol y de ácidos orgánicos (acético, láctico y fórmico) para las cepas: A) KO11, B) KO11 *pgi*, C) KO11 E35. Símbolos: ■, Biomasa; ●, Glucosa; ▲, Etanol; □, Acetato; ○, Lactato; △, Formato.



**Anexo B.3.** Cinéticas de producción de biomasa, de consumo de glucosa, de producción de etanol y de ácidos orgánicos. En las cepas transformantes, la transcripción de los plásmidos fue inducida con 50  $\mu$ M de IPTG. ■ KO11 E35; ▲ KO11 PAPL<sup>-</sup>; ▼ KO11 PAPL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54; ◆ KO11 PAPL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54.



**Anexo B.4.** Cinéticas de producción de ácidos orgánicos. En las cepas transformantes, la transcripción de los plásmidos fue inducida con 50  $\mu$ M de IPTG. ■ KO11 E35; ▲ KO11 PAPL<sup>-</sup>; ▼ KO11 PAPL<sup>-</sup>/pZWF<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54; ◆ KO11 PAPL<sup>-</sup>/pZEA<sub>Zm</sub>-pvGlkGalP54.



**Anexo B.5.** Cinética de producción de biomasa, de consumo de glucosa, de producción de etanol y de ácidos orgánicos en las cepas A) KO11 PPAL-, B) KO11 PPAL-/pLOI510. Símbolos: ■, Biomasa; ●, Glucosa; ▲, Etanol; □, Acetato; ○, Lactato; △, Formato.

**Anexo B.6.** Distribución de los flujos de carbono de *E. coli* KO11 PPAL<sup>-</sup> y KO11 PPAL<sup>-</sup>/pLOI510, en comparación con KO11, la cepa control.

<i>Cepa</i>	<i>Azúcar consumida</i>		<i>Flujo hacia productos</i>		
	<i>Azúcar consumida</i>	<i>Etanol</i>	<i>Acético</i>	<i>Láctico</i>	<i>Fórmico</i>
<b>Fase de crecimiento</b>					
<b>Velocidades específicas<sup>a</sup></b>					
<b>KO11</b>	173 ± 22	51 ± 5	25 ± 0	10.3 ± 0	18.3 ± 0
<b>KO11 PPAL</b>	51 ± 7	23.2 ± 0.7	3.8 ± 0	0	0.2 ± 0
<b>KO11 PPAL/pLOI510</b>	135 ± 29	48.4 ± 0.8	1.1 ± 0.06	0	0 ± 0
<b>Velocidades volumétricas<sup>b</sup></b>					
<b>KO11</b>	38.6 ± 0.2	27.4 ± 1.2	2.5 ± 0.0	1.4 ± 0.0	5.5 ± 0.0
<b>KO11 PPAL</b>	9.6 ± 0.4	7.2 ± 0.4	0.28 ± 0.06	0.02 ± 0.0	1.3 ± 0.1
<b>KO11 PPAL/pLOI510</b>	9.2 ± 0.0	6.7 ± 0.1	0.18 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.5 ± 0.0

<sup>a</sup> Todos los valores están en mmol<sub>C</sub>/g<sub>DCW</sub> h<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Velocidades volumétricas de consumo o de formación de productos (mmol<sub>C</sub>/L/h).

## Anexo C. Ensayos enzimáticos

### Preparación de los extractos celulares.

A partir de un cultivo en crecimiento exponencial, la cantidad de células fueron ajustadas aproximadamente a una  $DO_{600}$  entre 0.9 -1.1 y cosechadas en tubos eppendorf (de 1.5 ml). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 12,000 rpm durante 5 min, lavadas dos veces con 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) conteniendo 20 mM KCl, 5 mM  $MnSO_4$ , 2 mM DTT y 0.1 mM EDTA. Después las células se resuspendieron en el mismo amortiguador y fueron rotas por sonicación. Los restos celulares fueron separados por centrifugación, y los extratos celulares fueron usados inmediatamente para los ensayos de actividad enzimática o almacenados a  $-20^{\circ}C$ .

Todos los ensayos fueron desarrollados a  $30^{\circ}C$ , monitoreando la velocidad de reacción espectrofotométricamente a 340 nm, con una celda de 1 cm y a pH específico para cada ensayo.

#### A.- Fosfoglucosa isomerasa (EC 5.3.1.9).

##### Reacción:



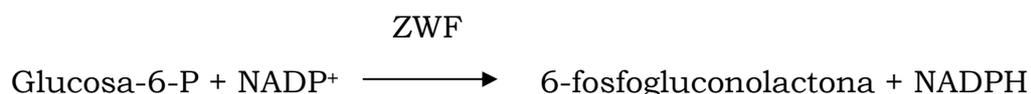
##### Mezcla de reacción:

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$  5 mM,  $NADP^+$  0.5 mM, ZWF 1 U, Fructosa-6-fosfato 2 mM.

Amortiguador para el ensayo enzimático: Tris-HCl a pH 7.8

#### B.- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49).

##### Reacción:



##### Mezcla de reacción:

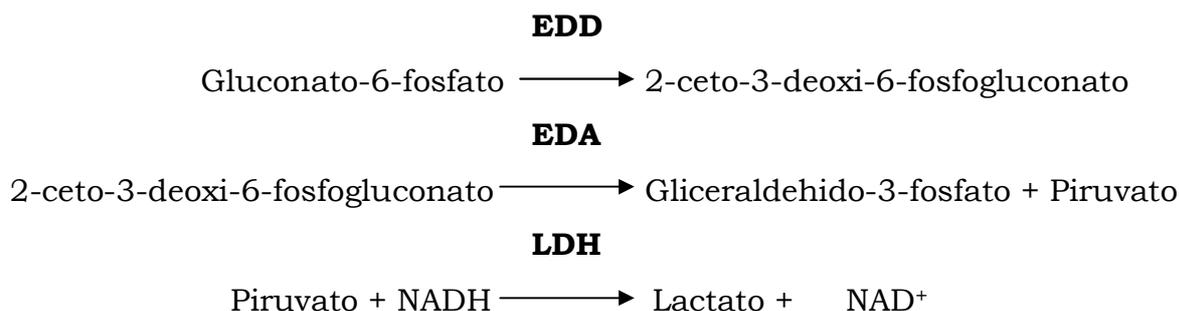
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$  6 mM,  $NADP^+$  1 mM, DTT 1 mM, Glucosa-6-fosfato 2 mM,

Amortiguador para el ensayo enzimático: Tris-HCl a pH 7.5

\*En la mezcla de reacción se coloca en último lugar el Glucosa-6-fosfato, ya que este reactivo es el que inicia la reacción (Peng y Shimizu, 2003).

### C.- Via de Entner-Doudoroff

#### Reacción:

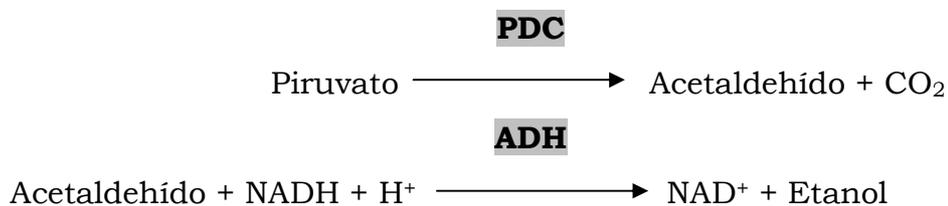


#### Mezcla de reacción:

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 10 mM, 6-Fosfogluconato 5 mM, NADH<sup>+</sup> 0.5 mM, LDH 10 U.  
Amortiguador para el ensayo enzimático: 0.1 M Tris pH 7.2.

### D.- Piruvato decarboxilasa heteróloga de *Z. mobilis* (EC 4.1.1.1)

#### Reacción:

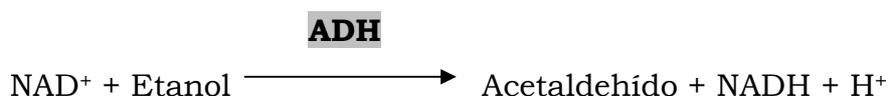


#### Mezcla de reacción:

NADH<sup>+</sup> 0.15 mM, Pirofosfato de tiamina (TPP) 0.1 mM, Piruvato 5.0 mM, ADH 10 U.  
Amortiguador para el ensayo enzimático: MES 50 mM-MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 6.5

### E).- Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1).

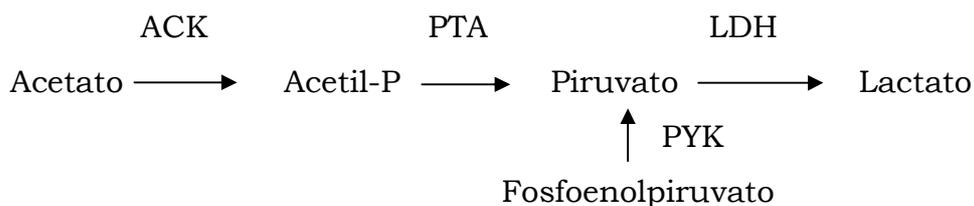
#### Reacción:



**Mezcla de reacción:**

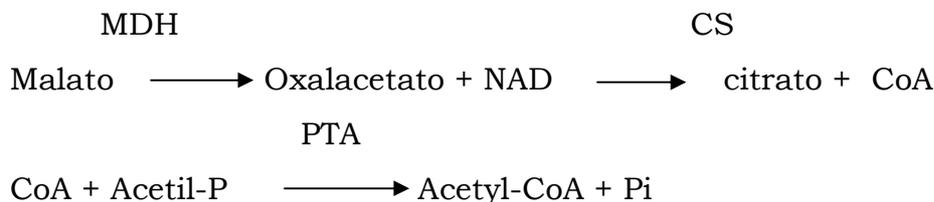
Etanol 10 mM, NAD<sup>+</sup> 1 mM

Amortiguador para el ensayo enzimático: Tris-HCl 0.03 M pH 8.5

**F).- Acetato cinasa (EC 2.7.2.1).****Reacción:****Mezcla de reacción:**

Acetato de potasio 0.8 M, KCl 0.2 M, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 4 mM, ATP 4 mM, NADH<sup>+</sup> 0.4 mM, Fosfoenolpiruvato 1.6 mM, Piruvato cinasa 4 U, LDH 55 U.

Amortiguador para el ensayo enzimático: Tris-HCl 0.1 M pH 7.4

**G).- Fosfotransacetilasa (EC 2.3.1.8).****Reacción:****Mezcla de reacción:**

CoA 0.2mM, NH<sub>4</sub>Cl 30mM, DTT 1mM, NAD<sup>+</sup> 1mM, L-Malato 5 mM, acetil-P 2 mM, Malato deshidrogenada 20 U, Citrato sintetasa 4 U.

Amortiguador para el ensayo enzimático: Tris-HCl 0.1 M pH 7.8

**H).- Piruvato formato liasa (EC 2.3.1.54).****Reacción:**

**Mezcla de reacción:**

NAD<sup>+</sup> 1 mM, CoA 0.2 mM, L-Malato 5 mM, Citrato sintasa 4 U, Malato deshidrogenasa 20 U, Piruvato de sodio 50 mM

Amortiguador para el ensayo enzimático: Tris-HCl 0.1 M pH 6.5

**I).- Lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.28).****Reacción:****Mezcla de reacción:**

NADH 0.13 mM, Piruvato 0.6 mM.

Amortiguador para el ensayo enzimático: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M pH 7.0

**DEFINICION DE UNIDAD:**

Cantidad de enzima que convierte 1 mmol de sustrato a producto en 1 min a temperatura y pH específico.

**CALCULOS:**

Actividad volumétrica:

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

6.22 cm<sup>-1</sup>·mM<sup>-1</sup> = coeficiente de extinción milimolar de NADPH a 340 nm (Peng y Shimizu, 2003).

V<sub>EC</sub> = Volumen del extracto celular empleado, (0.05 o 0.1 ml).

Actividad específica:

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

La proteína fue determinada por el método de Bradford.