



03072

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

8  
28

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

FALLA DE ORIGEN

Construcción y caracterización de  
cepas de *Escherichia coli*  
mutantes en el sistema de  
transporte de carbohidratos PTS.

TESIS

Que para obtener el título de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

Noemí Flores Mejía

Cuernavaca, Morelos

1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México

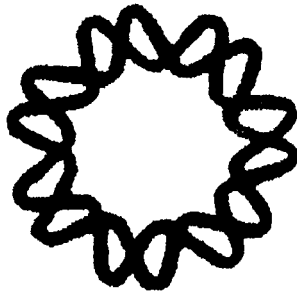


## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

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

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

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



Esta tesis se realizó en el Instituto de Biotecnología/UNAM, en el Departamento de Microbiología Molecular bajo la dirección de los Dres. Francisco Bolívar Zapata y Fernando Valle Baheza.

### ***Agradecimientos.***

*Al Dr. Francisco Bolívar por brindarme su valioso apoyo y consejo.*

*Al Dr. Fernando Valle de manera muy especial por ser un pilar en mi formación académica y por su invaluable confianza al permitirme desarrollar este proyecto.*

*A mis cotutores los Dres. Guadalupe Espín y Mario Soberón por el entusiasmo con que apoyaron este proyecto.*

*Al M. en C. Alfredo Martínez por su constante ayuda.*

*A mis compañeros.*

*A mis padres.*

*A Raúl*

## Índice

I. Introducción. . . . .	1
II. Antecedentes. . . . .	4
Sistema PTS . . . . .	4
Transporte de glucosa . . . . .	6
Genotipos y fenotipos de PTS . . . . .	6
Regulación por PTS . . . . .	7
Vías alternativas para transporte de glucosa . . . . .	8
a) Mutaciones que afectan la expresión de <i>galP</i> . . . . .	8
b) Transporte de glucosa por un componente II <sup>Glc</sup> desacoplado. . . . .	8
c) Transporte de glucosa vía gluconato. . . . .	9
II. Objetivo general . . . . .	10
III. Objetivos específicos . . . . .	10
IV. Material y métodos. . . . .	11
Cepas. . . . .	11
Métodos. . . . .	11
Transducción mediada por P1 . . . . .	11
Determinación de fenotipo <i>pts</i> . . . . .	11
Construcción de mutante <i>pts</i> (PB11). . . . .	11
Selección de mutantes PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> por cultivo continuo (quimioestado) . . . . .	11
Curvas para determinar velocidad de crecimiento. . . . .	12
Enriquecimiento de una mutante PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> . . . . .	12
Determinación de aminoácidos aromáticos . . . . .	12
Cuantificación de gluconato . . . . .	12
V. Resultados. . . . .	13
Estrategia para desviar el flujo de carbono de glucólisis en cepas que utilicen glucosa por una vía alternativa a PTS. . . . .	13
Construcción de mutante PTS <sup>-</sup> (PB11). . . . .	13
Obtención y caracterización de cepas <i>pts</i> <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> . . . . .	13
Utilización de azúcares PTS y no-PTS y marcadores. . . . .	17
Caracterización de las cepas <i>pts</i> <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> . . . . .	17
Transferencia del fenotipo Glc <sup>+</sup> a un fondo PTS <sup>-</sup> . . . . .	17
Identificación del fenotipo Glc <sup>+</sup> . . . . .	18
Identificación del fenotipo <i>galP</i> <sup>+</sup> . . . . .	20
Transferencia del fenotipo Glc <sup>+</sup> en un fondo <i>pts</i> <sup>-</sup> <i>galR</i> . . . . .	22
Reproducibilidad del método de obtención de mutantes espontáneas por cultivo continuo. . . . .	23
Porcentaje de aparición de mutantes Glc <sup>+</sup> . . . . .	27
Enriquecimiento de una sola mutante. . . . .	28

Mutantes PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> en la cepa PB103. . . . .	32
Aplicación . . . . .	32
Producción de aminoácidos aromáticos en las cepas NF8 y NF9. . . . .	32
VI. Discusión. . . . .	37
VII. Bibliografía . . . . .	42

## I. Introducción.

El objetivo central de la Ingeniería de Vías Metabólicas es el de optimizar la formación del o los productos deseados e incrementar la eficiencia en la utilización de los nutrientes durante un proceso de fermentación a través de la alteración de alguna(s) ruta(s) metabólica(s).

Uno de los principales retos en el desarrollo de un proceso comercial basado en la fermentación utilizando microorganismos, es la reducción de los costos de producción. Las metas más comunes a alcanzar para lograr este objetivo comprenden: incrementar la productividad volumétrica, el rendimiento y la concentración final del producto con lo que se disminuyen los costos de fermentación, del sustrato y su purificación.

A nivel de fermentación industrial, la glucosa es la fuente de carbono más barata y común que se utiliza para crecer microorganismos. Este compuesto se transporta al interior de la célula y se convierte, a través de varios intermediarios, en compuestos base que sirven a su vez para construir las biomoléculas que conforman a la célula. De la glucosa, así mismo, también se obtiene la energía que se utiliza en todos los procesos fisiológicos. Los aproximadamente 75-100 compuestos primarios que sirven para construir todas las moléculas que conforman a la célula, se sintetizan a partir de doce metabolitos precursores que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Metabolitos precursores para la biosíntesis de compuestos básicos.

---

Glucosa 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato
Fructosa 6-fosfato	Piruvato
Ribosa 5-fosfato	Acetil-coenzima A
Eritrosa 4-fosfato	$\alpha$ -cetoglutarato
Triosa-fosfato	Succinil-coenzima A
3-fosfoglicerato	Oxaloacetato

---

Todos estos compuestos derivan de glucosa a través de la glucólisis, la vía de las pentosas y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (figura 1).

Las bacterias que crecen en un medio mínimo que contiene solo sales minerales y glucosa, necesitan sintetizar estos doce metabolitos precursores. Pero no todos se necesitan en las mismas concentraciones. Por ejemplo, los aminoácidos aromáticos que se sintetizan a partir de algunos de estos

compuestos, son relativamente poco abundantes en la célula. Por esta razón, la célula mantiene un cierto flujo de carbono en cada vía metabólica, el cual depende en general, de la demanda de los productos que se formen a partir de ella (22).

El costo efectivo y la producción eficiente de compuestos o derivados de la ruta común de aromáticos requiere que las fuentes de carbono tales como glucosa, lactosa y galactosa se conviertan al producto deseado con un alto porcentaje de rendimiento. Así, desde el punto de vista de producción industrial, los compuestos aromáticos y otros derivados biosintéticos de esta ruta, pueden ser valiosos para aumentar el flujo de fuentes de carbono en y a través de la ruta común de compuestos aromáticos, para incrementar la producción del compuesto deseado.

El fosfoenolpiruvato (PEP) es uno de los compuestos precursores más importantes en las rutas biosintéticas (7) (Fig. 1), particularmente en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La principal fuente de este compuesto proviene de la vía de glucólisis. El mayor porcentaje de este compuesto se transforma en piruvato por dos rutas; por el sistema PTS (66%) y por la acción de las piruvato cinasas PykA y PykF (14%). La otra vía que utiliza PEP en una proporción importante, es la que lo transforma a oxaloacetato (16%), uno de los intermediarios más importantes del ciclo de Krebs. De lo anterior se deduce que una mínima parte del PEP se dirige a la formación de aminoácidos aromáticos (alrededor del 3 a 4%) (Fig. 1).

Hasta ahora, los enfoques utilizados para aumentar el flujo de las fuentes de carbono en y a través de la ruta común de los compuestos aromáticos, se sustentan en incrementar PEP por eliminación de la piruvato cinasa (mutantes *pykA* y *pykF*) (29) y/o eliminando la PEP carboxilasa (mutantes *ppc*) (30). Una tercera opción ha sido incrementar la concentración de PEP al aumentar la expresión del gene *pps*, que codifica para la enzima PEP sintasa.

Este trabajo ofrece una alternativa diferente a las hasta ahora planteadas en este aspecto de la disponibilidad de PEP. La hipótesis a demostrar es que el aumento en la disponibilidad de PEP en cepas que transportan glucosa por un sistema que no consume este compuesto durante el proceso, permitirá incrementar el flujo de carbono hacia otras vías biosintéticas. Así, el PEP puede canalizarse hacia ciertas rutas metabólicas para aumentar la concentración final de un compuesto deseado. Este efecto puede obtenerse mediante la selección de mutantes capaces de transportar eficientemente glucosa por un mecanismo distinto al sistema de transporte de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). En nuestro laboratorio nos hemos enfocado particularmente al problema de incrementar la concentración de PEP disponible para canalizarlo hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

De acuerdo con lo anterior se propone que con una mayor disponibilidad de PEP podría incrementarse la concentración de compuestos aromáticos tales como fenilalanina, tirosina y triptofano, si el flujo de carbono se desvía hacia la vía



de biosíntesis de estos compuestos. También se podrían incrementar la producción de otros compuestos de diferentes vías metabólicas, por ejemplo, se podría aumentar la biosíntesis de ácido oxaloacético (OAA) a través del TCA o de PPC y de este modo obtener compuestos como aspartato, lisina, metionina, isoleucina o treonina.

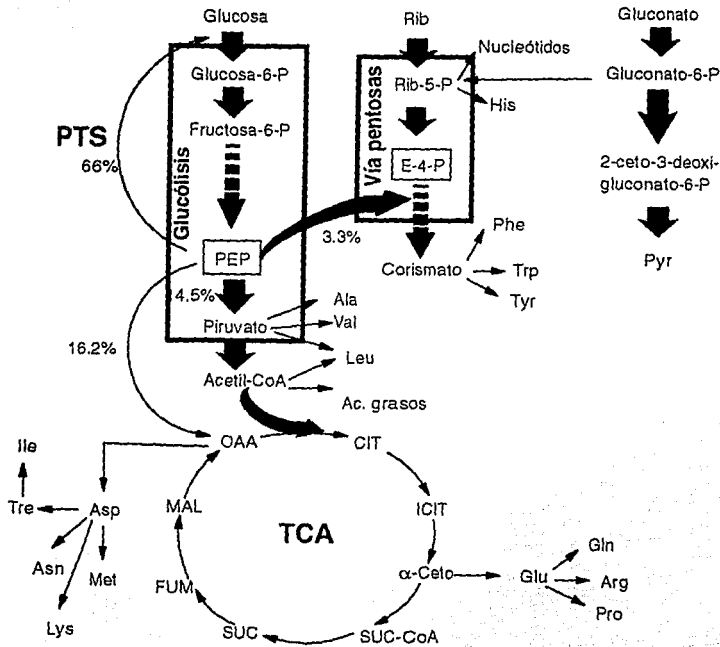


Figura 1. Vías Metabólicas.

## II. Antecedentes.

Una de las características relevantes de los microorganismos es su gran versatilidad metabólica para utilizar diferentes fuentes de carbono, en medios que cambian continuamente, para poder así competir eficazmente con otros microorganismos por nutrientes limitantes. Para esto, la bacteria, al igual que otros organismos, tiene sistemas sensores que monitorean su alrededor y gracias a ello pueden inducir o reprimir sistemas genéticos para la utilización de un gran número de fuentes de carbono, detectar gradientes de concentración de nutrientes, adaptarse a cambios de fuerza osmótica, a condiciones de estrés, a cambios de ambiente aeróbico o anaeróbico, y a limitación de nutrientes. Muchas señales del exterior celular captadas por sistemas sensores, son convertidas en una respuesta que puede involucrar un cambio en la síntesis de proteínas, la regulación de una actividad enzimática, cambios en movilidad, u otros procesos. Varios de estos sistemas sensores tienen en común la fosforilación de proteínas en un residuo de histidina, serina o ácido aspártico. A este tipo de sistemas sensores se les denomina sistemas de dos componentes en los que uno de los componentes es el sensor y el otro es el regulador de la respuesta celular.

Uno de estos sistemas sensores de dos componentes es el de la fosfotransferasa de carbohidratos dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS). Este sistema consiste en el transporte y fosforilación de carbohidratos denominados azúcares PTS. También está relacionado con el movimiento hacia estas fuentes de carbono (quimiotaxis) y con la regulación de otras rutas metabólicas.

### Sistema PTS.

El sistema PTS cataliza el transporte y concomitante fosforilación vectorial de varios carbohidratos y ciertos alcoholes en bacterias. La cascada de transfosforilación que constituye este sistema se inicia a partir de un intermediario de la vía de la glucólisis, el fosfoenolpiruvato (PEP), que actúa como donador de su grupo fosfato, el cual a su vez, se transfiere a la llamada enzima I y ésta lo cede a la enzima HPr. Estos son los dos componentes generales del sistema que se usan en los primeros pasos del transporte de cualquier carbohidrato de los denominados PTS. Una vez fosforilada, P-HPr cede su grupo fosfato a una proteína integral de membrana (carbohidrato específica) denominada componente II<sup>azúcar</sup>, ya sea directamente o mediante una enzima soluble y también carbohidrato específica llamada componente III<sup>azúcar</sup> (1, 3) (fig. 2).

El sistema PTS se encuentra distribuido universalmente entre bacterias fermentativas, pero aparentemente está limitado a aquellos organismos que fermentan glucosa por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Este sistema ofrece importantes ventajas a los organismos que realizan glucólisis anaeróbica, ya que provee un enlace cercano entre el transporte de un azúcar y su subsecuente metabolismo. Además, cuando hay limitación de energía, el sistema

permite conservar ATP, ya que el producto del transporte es un azúcar fosforilado que puede entrar a vías catabólicas o anabólicas directamente (2).

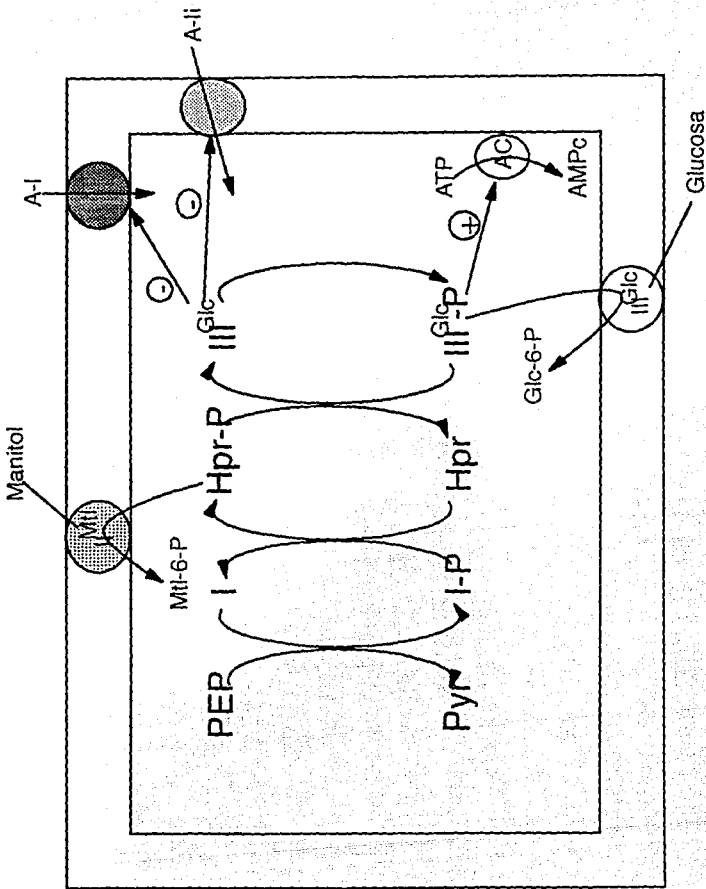


Figura 2. Modelo de transporte de azúcares PTS y no-PTS. Además de las enzimas del sistema PTS se indican: activación (+) de adenilato ciclasa (AC), e inhibición (-) por exclusión del inductor, de azúcares clase I (A-I) y clase II (A-II).

El PEP es dos veces más energético que el ATP ( $\Delta G^0$  de hidrólisis de cerca de 14 kcal/mol comparado con 7.5 kcal/mol para el ATP). El sistema PTS tiene un potencial teórico para acumular su sustrato en un exceso de  $10^6$  veces contra un gradiente de concentración, de tal modo que un azúcar transportable que se encuentre en el medio a una concentración de 0.1  $\mu$ M, se puede acumular en el citoplasma de la bacteria a una concentración de 100 mM. El azúcar queda atrapado en el interior en una forma fosforilada que no puede salir a menos que ocurra una hidrólisis del éster fosfórico. El PEP es por tanto, el más energético de los sistemas de transporte y permite la más efectiva acumulación comparado con ATP o permeasas simporte de cationes (5).

El mecanismo detallado por el cual las permeasas PTS transportan su azúcar a través de la membrana y lo fosforilan no se conoce. Se propone que funcionan por un mecanismo tipo acarreador con enzimas fosforiladoras (elementos IIA y IIB) unidas al componente transportador (IIC). Se piensa que el elemento integrado en membrana IIC es un poro controlado por potencial eléctrico que se puede abrir o cerrar dependiendo de las condiciones fisiológicas (6).

### Transporte de glucosa.

El transporte de glucosa es uno de los mas estudiados en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. En este caso, el componente II<sup>glc</sup> en conjunción con el componente III<sup>glc</sup> constituyen la principal permeasa específica para glucosa. La permeasa de glucosa cataliza simultáneamente el transporte y fosforilación de la glucosa y del análogo no metabolizable  $\alpha$ -metil glucopiranosido. Además, la glucosa puede ser transportada vía el sistema PTS de manosa (II<sup>Man</sup>). La fosforilación del carbohidrato está acoplada a su translocación a través de la membrana y la energía para este proceso la provee el intermediario glicolítico fosfoenolpiruvato (PEP) (4).

### Genotipos y fenotipos de PTS.

En *Escherichia coli*, los genes que codifican para las enzimas I (*ptsI*), HPr (*ptsH*) y III<sup>glc</sup> (*crr*) se encuentran ligados en el cromosoma formando un operón (11). El gene *ptsG* que codifica para la proteína II<sup>glc</sup> se encuentra en otro locus.

Mutantes en los genes *ptsI* y *ptsH* son incapaces de crecer en carbohidratos PTS, mientras que mutantes en los genes de las proteínas II y III no crecen en el carbohidrato para el cual son específicos. Ya que algunos azúcares PTS pueden ser sustrato de mas de una proteína II, mutaciones en el componente II de un azúcar específico no necesariamente provocan incapacidad de asimilar el sustrato. Por otro lado, se ha visto que mutantes *ptsH* pueden presentar supresión de su fenotipo si se crecen primero en presencia de fructosa o si llevan una mutación denominada *fruR*. Se piensa que *fruR* codifica para un

represor de los genes *fru* entre los que se encuentra el gene *fruF*, que codifica para la proteína FPr o pseudo-HPr. Esta proteína puede reemplazar a la proteína HPr cuando ésta se expresa constitutivamente por efecto de una mutación en el gene *fruR*.

Los azúcares PTS además de que pueden ser transportados por mas de un componente II, también pueden ser transportados por sistemas no-PTS. El ejemplo mas conocido es el de la glucosa, que puede ser transportada también por la permeasa de galactosa. La expresión constitutiva del gene que codifica para esta proteína permite que cepas mutantes, por delección de *ptsHI*, en *S. thyphimurium* puedan crecer en glucosa (12).

### Regulación por PTS.

Las mutantes *ptsHI* no pueden crecer en azúcares PTS y en algunos no-PTS. Los carbohidratos no-PTS que no permiten el crecimiento de cepas *ptsHI* mantienen sin embargo una estrecha relación con el sistema PTS, por lo que se les divide en dos clases (16). La clase I incluye a los carbohidratos no-PTS tales como lactosa, manosa, melobiosa y glicerol que requieren de un inductor, el cual generalmente es el carbohidrato a transportar, para activar los genes involucrados en este proceso. La clase II contiene a los intermediarios del ciclo de Krebs (succinato, malato y citrato), xilosa, ramnosa y galactosa cuyo transporte requiere de la activación de genes regulados por el complejo monofosfato cíclico de adenosina y la proteína reguladora CRP (AMPc-CRP). Si bien estos azúcares no son transportados vía PTS, su transporte es regulado por este sistema.

La conexión entre estos azúcares y el sistema PTS está dada por las proteínas adenilato ciclasa y  $III^{Glc}$  (figura 2). Se sabe que mutantes en PTS no pueden crecer en carbohidratos no-PTS pero que este efecto se revierte cuando se agrega AMPc al cultivo (15), lo cual sugiere que PTS está involucrado en la regulación del metabolismo del AMPc. El elemento de control es el componente  $III^{Glc}$  en base a su estado de fosforilación. Se han postulado dos procesos en la regulación del transporte de azúcares por el sistema PTS:

a) Por un lado, la entrada de inductores vía el sistema de transporte de los carbohidratos clase I, se inhibe por la forma no fosforilada de la enzima  $III^{Glc}$  (exclusión del inductor).

b) La adenilato ciclasa se activa en presencia de  $III^{Glc}$  fosforilada. Por lo tanto, en mutantes *ptsI*, *ptsH* o ambas,  $III^{Glc}$  no se puede fosforilar. Lo mismo ocurre cuando una cepa silvestre crece en presencia de un carbohidrato tipo PTS debido a que el grupo fosfato se transfiere al azúcar y  $III^{Glc}$  queda en su forma no fosforilada, dándose entonces la exclusión del inductor e inhibición de actividad de la adenilato ciclasa.

Debido a esta estrecha relación entre el transporte de carbohidratos PTS y no-PTS, es difícil la identificación del fenotipo PTS ya que la deficiencia en el transporte de un azúcar PTS puede ser compensada por otro transportador u otra

proteína que tenga una actividad similar a la faltante. O bien, un carbohidrato no-PTS, cuyo sistema de transporte mantiene su actividad normal, parece no transportarse por efecto de mutaciones en alguno(s) de los genes del transporte PTS.

Existen reportes en la literatura sobre mutaciones puntuales o deleciones de *ptsI* que confieren resistencia al antibiótico fosfomicina (27), por lo que se puede identificar el fenotipo PTS<sup>-</sup> por la adquisición de esta resistencia y por la deficiencia específica para la utilización de azúcares PTS.

### **Vías alternativas para transporte de glucosa.**

Existen varios reportes en la literatura que demuestran que la deficiencia para crecer en glucosa de las mutantes PTS<sup>-</sup> puede ser restablecida por mutaciones en otros loci. Los tres casos más documentados son:

#### **a) Mutaciones que afectan la expresión de *galP*.**

Cepas mutantes en la síntesis de la enzima I, Hpr, o ambas, pueden transportar glucosa por una vía diferente a la del sistema PTS, cuando la permeasa de galactosa (*GalP*) se expresa constitutivamente (8, 9).

Por otro lado, *Mgl*, otro transportador de galactosa, tiene también una elevada afinidad por glucosa ( $K_d$  de 0.2  $\mu$ M) (23). De igual forma, mutantes en la proteína  $II^{Glc}$  de *Salmonella typhimurium* crecidas en condiciones de limitación de glucosa en quimiostato, pueden transportar glucosa en mutantes que expresen constitutivamente *Mgl* (24). En cepas silvestres, el sistema *Mgl* sufre una fuerte represión catabólica por glucosa; por lo que siempre se pensó que su función fisiológica era importante en el transporte de galactosa y que los genes *mg/BAC* se regulaban por *mg/D* (*galS*), un represor que se une a los mismos inductores del represor *galR* (25). Ahora se sabe que en *E. coli*, bajo condiciones de limitación de glucosa, la actividad de *Mgl* puede expresarse a altos niveles, independientemente de la presencia de los inductores para este sistema, galactosa y fucosa (26).

#### **b) Transporte de glucosa por un componente $II^{Glc}$ desacoplado.**

Aunque no parece haber difusión facilitada vía la enzima  $II^{Glc}$ , se han aislado mutantes  $II^{Glc}$  que pueden transportar glucosa en ausencia de fosforilación dependiente de PTS (10). Se ha propuesto que esta enzima funciona como un poro que está cerrado en ausencia de fosforilación pero que se abre al ser fosforilado. Algunas mutaciones en  $II^{Glc}$  dan lugar a poros permanentemente

abiertos. Además, en ensayos *in vitro*, esta proteína alterada es incapaz de catalizar la fosforilación de la glucosa por una  $\text{III}^{\text{Glc}}$  fosforilada (ver Fig. 2).

### c) Transporte de glucosa vía gluconato.

Muchas enterobacterias contienen la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) que transforma a la glucosa en gluconato en el espacio periplásmico. La apoenzima apoGDH requiere pirroloquinolina quinona (PQQ) como grupo prostético, pero solo algunas especies como *Klebsiella aerogenes* tienen una holoenzima activa. Otras especies como *E. coli* y *S. typhimurium* no pueden sintetizar PQQ pero sí producen la apoGDH (13). La actividad de la enzima *in vitro*, se puede restablecer por adición de PQQ a extractos celulares o a la apoGDH purificada. En mutantes *PTS* de *E. coli*, se puede tener crecimiento en presencia de glucosa si se agrega PQQ al cultivo. Esto se debe a que se restablece la actividad de la enzima y la glucosa se transforma en gluconato el cual se cataboliza vía la ruta Entner-Doudoroff (14). Se han descrito mutantes espontáneas de cepas que no llevan los genes *ptsHI* que recuperan su capacidad para crecer en glucosa y que tienen una GDH funcional (14).

### III. Objetivo general.

En nuestro laboratorio estamos interesados en el conocimiento de los mecanismos de canalización del flujo de carbono de la vía de la glucólisis y del sistema de transporte de ciertos azúcares PTS; y como puede ser canalizado hacia otras vías biosintéticas en la bacteria *Escherichia coli*.

En este sentido, el objetivo general de la presente tesis es el obtener y caracterizar cepas mutantes en el sistema de transporte de azúcares PTS, en particular glucosa, que no requieran fosfoenolpiruvato para el transporte de este azúcar con el fin de polarizar el flujo de carbono hacia ciertas vías biosintéticas.

### IV. Objetivos particulares.

- Obtener mutantes PTS<sup>-</sup> por delección del operón *ptsHIcrr*, sustituyendo a este por un gene de resistencia a kanamicina (Km).
- Seleccionar mutantes espontáneas a partir de la cepa  $\Delta(ptsHIcrr)::Km^R$ , por crecimiento en cultivo de flujo continuo, que puedan crecer en glucosa como fuente de carbono.
- Caracterizar fisiológicamente las cepas construidas en cuanto a su biomasa y velocidad de crecimiento.
- En las cepas obtenidas, evaluar su capacidad para sobreproducir aminoácidos aromáticos.



## V. Material y Métodos.

### Cepas.

JM101 (*supE*, *thi*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI*<sup>q</sup>  $\Delta$ M15]) (17).  
TP2811 (*F*, *xyl*, *argH1*, *lacX74*, *aroB*, *ilvA*,  $\Delta$ (*ptsH*, *ptsI*, *crr*::Km<sup>R</sup>) (19).  
CGSC6902 (*F*, *ihis*, *leu*, *ilvA*,  $\Delta$ *lac*, *mgIP*, *galP*::Tn10, Tc<sup>R</sup>) (B. J. Bachmann).  
JT247 (MC4100 *galE*::*lacZ/F'* *gal*<sup>r</sup>,  $\Delta$ *galR*::Cm<sup>R</sup>) (28).  
AG701 (JT247 *galS*::Tn10) (28).

### Métodos.

#### Transducción mediada por P1

Los protocolos para titulación y transducción con P1 utilizados fueron los reportados por Silhavy (18).

#### Determinación de fenotipo *pts*<sup>-</sup>.

Se determinaron diferentes características como resistencia a fosfomicina (Fm) (19), crecimiento en diferentes azúcares PTS (glucosa, manosa y fructosa) y azúcares clase I (glicerol, lactosa y maltosa) y clase II (galactosa). Todos los carbohidratos se usaron como fuente de carbono en medio Mac Conkey (Mck) para eliminar problemas de identificación de la deficiencia debido al hecho de que PTS interviene en la regulación de diferentes procesos en la célula. En el caso de Fm se usó el medio LB (20).

#### Construcción de la mutante *pts*<sup>-</sup> (PB11).

A la cepa JM101 se le transfirió el genotipo *pts*<sup>-</sup> utilizando un lisado del bacteriófago P1 preparado de la cepa TP2811. Se seleccionó una cepa Km<sup>R</sup> y se corroboró el fenotipo Glc<sup>-</sup> por medio de cajas conteniendo medio Mac Conkey agar base, glucosa, y kanamicina (Mck-glc-Km) (38).

#### Selección de mutantes PTS<sup>-</sup> Glc<sup>-</sup> por cultivo continuo (quimioestado).

Se usó el fermentador Multigen (New Brunswick Scientific Co.) con una jarra para flujo continuo de 2 L. Se manejó con 1.3 L de M9 suplementado con glucosa (2 g/L) y Km (30 µg/ml). El inóculo se preparó con la cepa PB11 crecida en dos cajas de medio Luria-Km con tapiz confluyente. Este tapete de células se

resuspendió en 10 ml de medio M9 y se agregó al fermentador. Las condiciones de crecimiento fueron: 1 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto), 37°C, 600 rpm, el pH se mantuvo en 7.0 con hidróxido de amonio 50 %. El cultivo se dejó crecer hasta que las células alcanzaron la fase estacionaria y entonces se empezó a lavar a diferentes tasas de dilución (0.08, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.75 y 0.8). El flujo correspondiente a cada tasa de dilución se mantuvo por al menos tres tiempos de retención o hasta comprobar que la densidad óptica del cultivo no disminuía. En cada cambio de flujo, se tomó una muestra y se plateó en cajas de Mck-glc-Km para aislar colonias rojas. De estas, se seleccionaron dos colonias rojas de cada punto y se determinó su fenotipo.

### **Curvas para determinar velocidad de crecimiento.**

Todas las curvas de crecimiento se realizaron usando como inóculo el 5% de un cultivo crecido toda la noche en medio Luria y lavado con sales M9. Los cultivos se realizaron en matraces de 125 ml con 20 ml de M9 con glucosa y el antibiótico apropiado. Se incubaron a 37°C y 300 rpm. Se determinó la densidad óptica por fotocolorimetría en unidades Klett.

### **Enriquecimiento de una mutante PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup>.**

Se hizo una fermentación en las mismas condiciones que las mencionadas en la sección de selección de mutantes PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> por cultivo continuo y se tomaron muestras en tres puntos de la curva de crecimiento correspondientes al inicio de la fase logarítmica, en fase tardía y en fase estacionaria. De estas muestras se usaron como inóculos 10 µl para matraces de 125 ml con 20 ml de medio M9 con glucosa. Se hicieron curvas de crecimiento tomando como inóculo para el siguiente matrás la última lectura obtenida. Del último punto de cada curva se determinó el porcentaje de colonias rojas en medio Mck-glc haciendo las diluciones apropiadas para tener entre 100 y 200 colonias por caja.

### **Determinación de aminoácidos aromáticos.**

La cuantificación de aminoácidos aromáticos fue realizada en la Compañía Genencor Int. por la técnica de HPLC.

### **Cuantificación de gluconato.**

Esta determinación se llevó a cabo con el ensayo comercial para cuantificación de gluconato de la Compañía Boehringer Mannheim, Cat. No. 428 191.

## VI. Resultados.

### i) Estrategia para desviar el flujo de carbono de glucólisis en cepas que utilicen glucosa por una vía alternativa a PTS.

#### Construcción de la cepa mutante PTS<sup>-</sup> (PB11).

Para obtener una cepa capaz de transportar glucosa utilizando una ruta metabólica diferente a la del sistema PTS, se deletó el operón *pts* de una cepa con genotipo conocido. Para ello se transdujo a la cepa JM101 la delección  $\Delta(\textit{ptsH-I, crr})\textit{kan}$  contenida en la cepa TP2811, mediante el bacteriofago P1. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina y se contraseleccionaron colonias blancas en medio Mac Conkey suplementado con glucosa y Km (Mck-glc-Km). De este modo se obtuvo la cepa mutante PB11  $\Delta(\textit{ptsH, ptsI, crr})\textit{Km}^R$  a la que se le determinó el fenotipo PTS. Esta cepa es resistente a kanamicina y fosfomicina no puede utilizar azúcares PTS y crece en carbohidratos clase I y II. Los resultados se muestran en la tabla 2.

#### Obtención y caracterización de cepas *pts<sup>-</sup>*, *Glc<sup>+</sup>*.

En la literatura se reporta que las mutantes *pts<sup>-</sup>* tienen un tiempo de duplicación de entre 10 y 20 horas y que en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono se generan mutantes espontáneas que pueden usar este azúcar por una vía diferente a PTS (14). Estas mutantes tienen velocidades de crecimiento ( $\mu$ ) similares a las de la cepa silvestre. También se ha reportado que diferentes mutaciones producen un fenotipo *pts<sup>-</sup>*, *Glc<sup>+</sup>* (14, 21 y 22). Estos datos sugirieron que posiblemente pudiera haber diferencias en las velocidades de crecimiento de una y otra mutante dependiendo de la facilidad con que puedan transportar la glucosa.

Por tal razón, se decidió hacer un cultivo continuo en el que se varió la tasa de dilución del medio de cultivo para permitir la selección de diferentes mutantes de acuerdo a su velocidad de crecimiento.

Para fines biotecnológicos, sólo son aceptables en principio velocidades de crecimiento de por lo menos el 50% con respecto a la cepa progenitora, por lo cual se partió de una tasa de dilución correspondiente a una  $\mu = 0.4$  que era la mínima requerida y se fue aumentando hasta llegar a la velocidad correspondiente a la de la cepa silvestre, en este caso JM101 ( $\mu = 0.83$ ). La curva del cultivo continuo de la PB11 se muestra en la figura 3.

La fermentación tardó más de 200 hrs y se platearon muestras en cajas de Mck-glc-Km en cada cambio de la tasa de dilución. Aparecieron colonias rojas desde que se inició el cultivo continuo

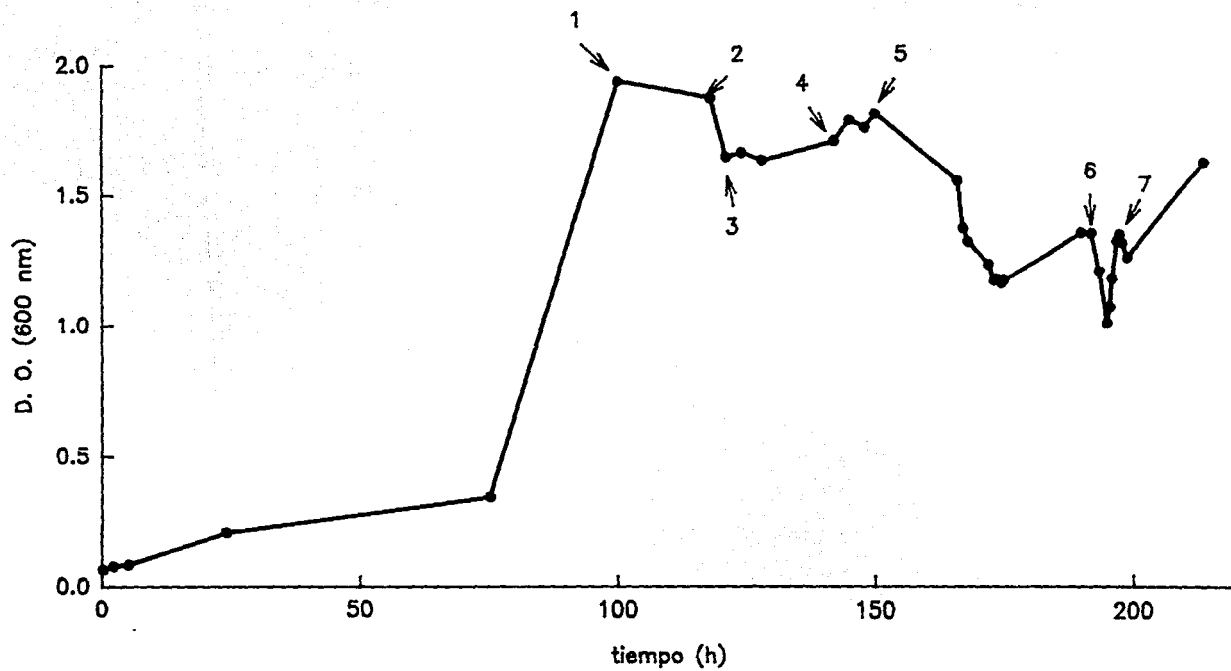


Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa PB11 en cultivo continuo con tasas de dilución de: 0.08 (1), 0.4 (2), 0.5 (3), 0.6 (4), 0.7 (5), 0.75 (6) y 0.8 (7).

Se tomaron dos colonias de cada una de las diluciones 0.4, 0.6, y 0.8 (Cols. 4, 10, 32, 40, 99 y 103 respectivamente) para determinar si había diferencias en las velocidades de crecimiento dependiendo del flujo con que fueron seleccionadas. Las curvas de crecimiento se muestran en la figura 4.

Efectivamente, existen diferentes velocidades de crecimiento entre las diferentes colonias aisladas. De todas estas, se escogieron una de menor y una de similar velocidad de crecimiento con respecto a la JM101.

De estas dos cepas que se denominaron PB12 (menor  $\mu$ ) y PB13 (mayor  $\mu$ ), se hicieron fermentaciones para determinar su fenotipo (tabla 2), velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación (tabla 3). Como se puede observar, ambas cepas difieren entre sí en su velocidad de crecimiento pero no en su fenotipo.

Tabla 2. Fenotipos de las cepas construidas; (-) no crece, (+) si crece, (R) resistente y (S) sensible.

Cepa	Km	Fm	Glc	Fru	Man	Gli	Mal	Lac	Gal
JM101	S	S	+	+	+	+	+	-	+
TP2811	R	R	-	-	-	+	+	-	+
PB11	R	R	-	-	-	+	+	-	+
4Glc <sup>+</sup> = PB12	R	R	+	-	-	+	+	-	+
10Glc <sup>+</sup>	R	R	+	-	-	+	+	-	+
32Glc <sup>+</sup>	R	R	+	-	-	+	+	-	+
40Glc <sup>+</sup>	R	R	+	-	-	+	+	-	+
99Glc <sup>+</sup>	R	R	+	-	-	+	+	-	+
103Glc <sup>+</sup> = PB13	R	R	+	-	-	+	+	-	+

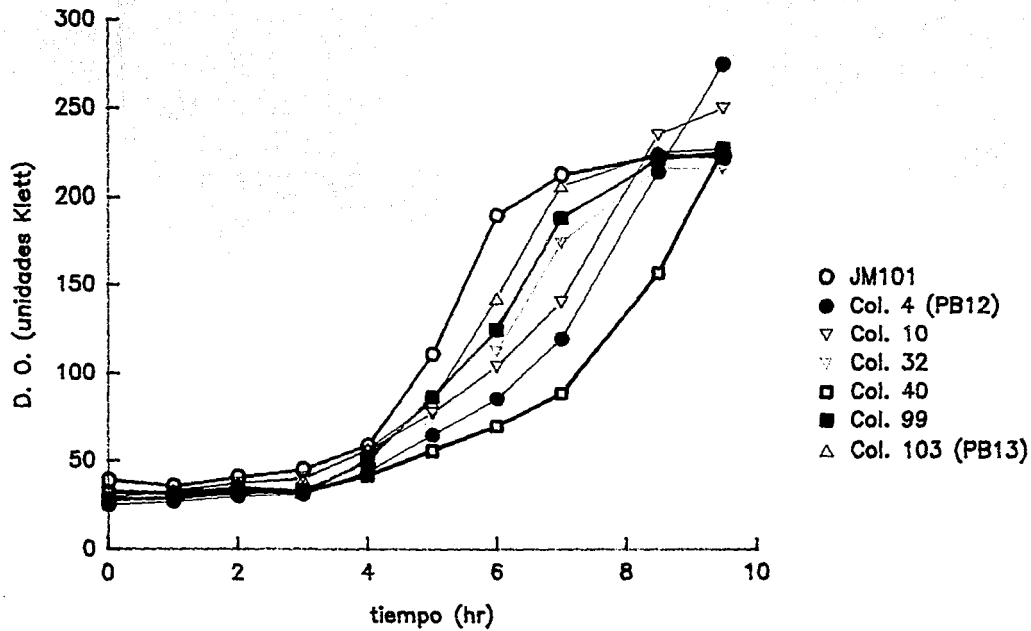


Figura 4. Curvas de crecimiento de diferentes mutantes  $PTS^- Glc^+$  obtenidas por cultivo de flujo continuo.

Tabla 3. Velocidades de crecimiento y tiempos de duplicación de las cepas *pts<sup>-</sup>* Glc<sup>+</sup> seleccionadas en cultivo continuo.

Cepa	Velocidad de crecimiento ( $\mu$ )	Tiempo de duplicación T <sub>d</sub> (h)
JM101	0.83	0.83
PB12	0.42	1.64
PB13	0.69	1.01

### Utilización de azúcares PTS y no-PTS y marcadores.

Se montaron las condiciones para poder determinar de forma sencilla los fenotipos relevantes para las mutantes construidas. Las condiciones usadas para este fin se indican en la sección de Métodos y los resultados se encuentran enlistados en la tabla 2.

Los resultados muestran que las cepas tienen los fenotipos esperados. Esto es, todas aquellas cepas que tienen una delección del operón *pts* no crecen en azúcares PTS pero si pueden metabolizar carbohidratos de las clases I y II, adquieren resistencia a fosfomicina y kanamicina. En el caso de las cepas PTS que pueden utilizar glucosa como fuente de carbono, el fenotipo es el mismo que las anteriores a excepción de la glucosa, lo cual indica que la glucosa debe ser transportada por una vía diferente a la del sistema PTS.

### ii) Caracterización de las cepas *pts<sup>-</sup>* Glc<sup>+</sup>.

#### Transferencia del fenotipo Glc<sup>+</sup> a un fondo PTS<sup>-</sup>.

Cabía la posibilidad de que las cepas PB12 y 13 tuvieran una mutación en un solo gene y este pudiera ser transferido a un fondo PTS<sup>-</sup> por transducción con el fago P1 y de este modo se tendría un fenotipo PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> sin recurrir al cultivo continuo y con la certeza de obtener precisamente la mutante deseada y no una variedad de mutantes.

Se trató de transducir con P1 a la PB11 usando como cepas donadoras a PB12 y PB13 y ver si esta podía entonces transportar glucosa, seleccionando las transductantes en medio mínimo con glucosa. Estas transducciones se hicieron por lo menos seis veces. Se usó como control la cepa JM101 determinando que se convirtiera en PTS<sup>-</sup>. En todos los casos, solo se obtuvo la JM101 PTS<sup>-</sup>, Km<sup>R</sup>.

pero nunca se encontró una derivada de la cepa PB11 que pudiera crecer en glucosa como fuente de carbono.

Los resultados mostraron que si bien no existieron problemas para la transducción, no se pudo transferir el fenotipo que determina la capacidad de las cepas PB12 y PB13 para crecer en glucosa. Esto sugirió que realmente este fenotipo es resultado de más de una mutación.

### Identificación del fenotipo Glc<sup>+</sup>.

Se intentó identificar el tipo de mutaciones sufridas por las cepas PB12 y PB13 tomando en cuenta los datos reportados en la literatura que indican que por lo menos hay tres posibilidades de transporte de glucosa en cepas PTS<sup>-</sup>:

- a) por la permeasa de galactosa,
- b) por la vía de gluconato y
- c) por un componente II<sup>glc</sup> desacoplado.

a) Para ver una eventual participación de la permeasa de galactosa (*galP*), se decidió inactivar el gene de esta permeasa en las cepas PB12 y PB13 e identificar el fenotipo resultante. Para este fin se transdujeron las cepas PB12 y PB13 con el fago P1 de la cepa CGSC6902 (*galP::Tn10, Tc<sup>R</sup>*) las cuales se denominaron PB12P y PB13P respectivamente. De estas se hicieron curvas de crecimiento para determinar si podían crecer en medio mínimo con glucosa (figura 5).

Los resultados demostraron que ambas cepas perdieron la capacidad de crecer en este medio, lo que sugirió que en ambos casos el transportador de galactosa estaba involucrado. En efecto, si esta proteína no está presente, las células no son capaces de transportar glucosa. Aún con estos datos, no se podía concluir que ambas cepas fueran la misma ya que tienen velocidades de crecimiento claramente diferentes.

b) Para determinar si alguna de estas cepas transporta gluconato se cuantificó este compuesto a partir de cultivos en fase estacionaria (tabla 4). Para este experimento se utilizó el ensayo comercial para cuantificación de gluconato (Boehringer Mannheim, cat. 428 191).



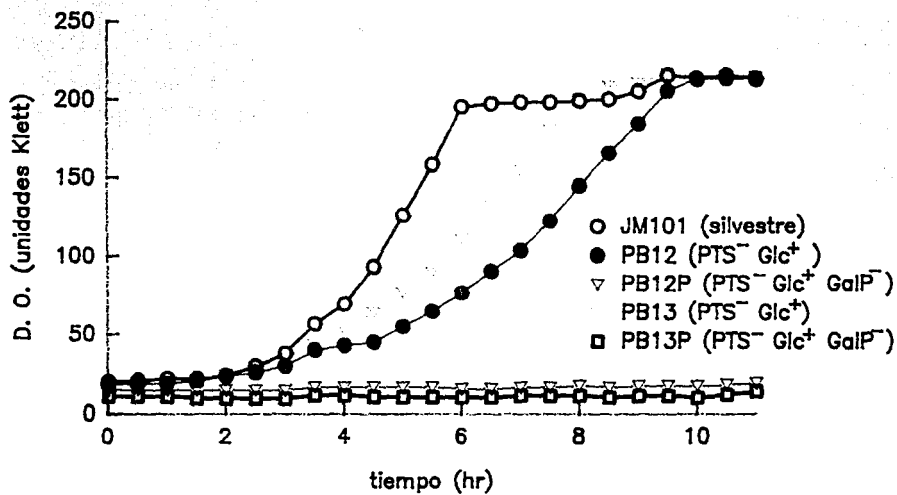


Figura 5. Curvas de crecimiento de cepas PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> y galP<sup>-</sup>

Tabla 4. Producción de gluconato en diferentes cepas.

Cepa	gluconato ( $\mu\text{g/ml}$ )
PB12	0.00
PB12P	0.00
PB13	9.17
PB13P	4.54

Los resultados muestran que la PB12 no produce gluconato y que en la PB13 si se encuentra presente este compuesto. Si bien la PB13P no creció durante el tiempo registrado, el cultivo había crecido a las 24 horas y tenían aproximadamente la mitad de concentración de gluconato con respecto a su progenitora.

c) Se descartó la posibilidad de que fueran mutantes del tipo del componente  $\text{Il}^{\text{Glc}}$  desacoplado puesto que en este caso, la inactivación del gene *galP* no debería afectar el fenotipo de utilización de glucosa.

#### Identificación del fenotipo *galP*<sup>+</sup>

Una vez determinado que la permeasa de galactosa está involucrada en la utilización de glucosa en las cepas mutantes, se intentó identificar la razón por la cual *GalP* está presente en condiciones en las que no se encuentra normalmente. Al menos dos de las posibilidades para que se diera tal efecto serían:

- a) El o los represores del regulón *gal* no son funcionales
- b) CRP es funcional aún en ausencia de AMPc

a) En una cepa silvestre creciendo en glucosa, el regulón de *gal* está reprimido y no se expresan las proteínas necesarias para transportar y metabolizar la galactosa. En el caso de las cepas PB12 y PB13 pudiera ser que el represor de *gal* (*galR*), el isorrepresor (*galS*) o ambos, estuvieran inactivos. O bien, que el operón se exprese constitutivamente. En ambos casos, la permeasa de galactosa estaría presente aún cuando la fuente de carbono fuera glucosa. Si este fuese el caso, al inactivar los represores del regulón en la PB11, probablemente se tendría un fenotipo  $\text{Glc}^+$ .

Por tal razón se transdujo la cepa PB11 con P1 de las cepas JT237

(*galR::Cm<sup>R</sup>*) y AG701 (*galS::Tn10, Tc<sup>R</sup>*). Las cepas obtenidas se denominaron NF1 (PB11 *galR*), NF4 (PB11 *galS*) y NF5 (PB11 *galR, galS*). El fenotipo de estas cepas se indica en la tabla 5. Los resultados mostraron que GalS no está involucrada en el fenotipo *Glc<sup>+</sup>* pero al parecer GalR sí permite la entrada de glucosa en menor proporción que las cepas PB12 y PB13 denotado por un tono rosa de las colonias crecidas en Mck-glc-Km. Si estas colonias se crecían durante dos días, tanto la cepa NF1 como la NF5 daban color rojo, como el que presentan las cepas PB12 y PB13. Se decidió entonces hacer curvas de crecimiento de estas cepas. Dado que tardaron más tiempo en obtener la coloración en Mck, probablemente en medio mínimo tardarían más que las progenitoras en crecer, por lo cual se tomaron lecturas por períodos más largos. Los resultados se muestran en la figura 6.

b) En el caso de las mutantes PTS, *Glc<sup>+</sup>* en donde se identificó la permeasa de galactosa en presencia de glucosa como fuente de carbono, también se determinó que este fenotipo no se debe a mutaciones en el represor o isorrepresor del sistema. Cabe entonces la posibilidad de que la alteración sea a otro nivel del regulón de galactosa.

Postma (32), reporta que la deficiencia en utilización de carbohidratos clase II producida por un fenotipo PTS, puede restablecerse por adición al medio de cultivo de AMPc o cuando se utiliza un CRP que no requiere de AMPc para activar, con lo cual se inducen aquellas regiones regulatorias controladas por represión catabólica y se permite la expresión de genes involucrados en el transporte y utilización de los azúcares clase II. Pudiera ser que si se añade AMPc al medio de las mutantes se podría determinar si este compuesto está involucrado en el fenotipo *Glc<sup>+</sup>* o es independiente de CRP.

Por tal razón se crecieron las mutantes construidas en cajas de medio Mck-glc con AMPc 500  $\mu$ M. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5. Crecimiento en glucosa y glucosa con AMPc.

Cepa	McK-glc	McK-glc-AMPc
JM101	+	+
PB11	-	-
PB12	+	+
PB12P	-	-
PB13	+	+
PB13P	-	-
NF1	+/-	+/-
NF4	-	-
NF5	+/-	+/-

Los resultados muestran que AMPc no está involucrado en este fenotipo puesto que no hubo alteraciones en el comportamiento de las cepas.

#### Transferencia del fenotipo Glc\* a un fondo *pts*, *galR*

La cepa PTS<sup>-</sup> con el gene *galR* interrumpido (NF1) puede utilizar glucosa a una velocidad muy baja, lo cual sugiere que probablemente ésta pudiera ser una de las mutaciones involucradas en el fenotipo Glc\*. Si este fenotipo estuviera determinado por solo dos mutaciones y la ausencia de GalR fuera una de ellas, al transducir la cepa NF1 con el fago P1 de la PB12 o PB13 pudiera obtenerse una cepa PTS<sup>-</sup>, Glc\*. Se llevaron a cabo estas transducciones y se determinó si las nuevas cepas presentaban un fenotipo similar al de las cepas obtenidas por cultivo continuo. Los resultados mostraron que las cepas transducidas se comportaron como la cepa NF1. De estos datos se podría inferir que o bien, la mutación *galR* no está involucrada en el fenotipo o que además de esta mutación hay más de dos mutaciones que no pueden ser transferidas en un mismo evento de transducción.

El identificar las mutaciones presentes en las cepas PB12 y PB13 sería motivo de un trabajo mas detallado y para los fines con que fue diseñado este proyecto no era indispensable realizarlo.

### Reproducibilidad del método de obtención de mutantes espontáneas por cultivo continuo.

En tanto no se conozca el genotipo de las mutantes PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> se requerirá de la elaboración de un cultivo continuo para obtener el fenotipo Glc<sup>+</sup> en la cepa de interés. Para asegurar que los resultados obtenidos en este trabajo son reproducibles en otras cepas de *E. coli* se construyeron derivadas similares a las obtenidas con la JM101.

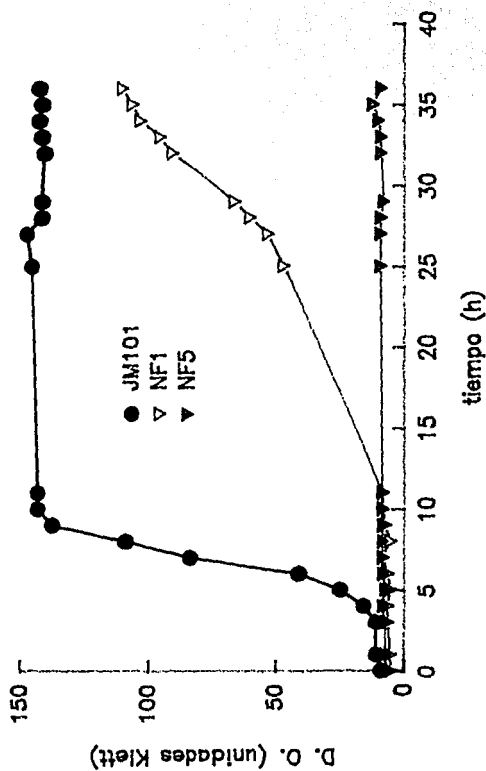


Figura 6. Curvas de crecimiento de cepas galR<sup>-</sup> y galS<sup>-</sup> (NF1 y NF5 respectivamente)

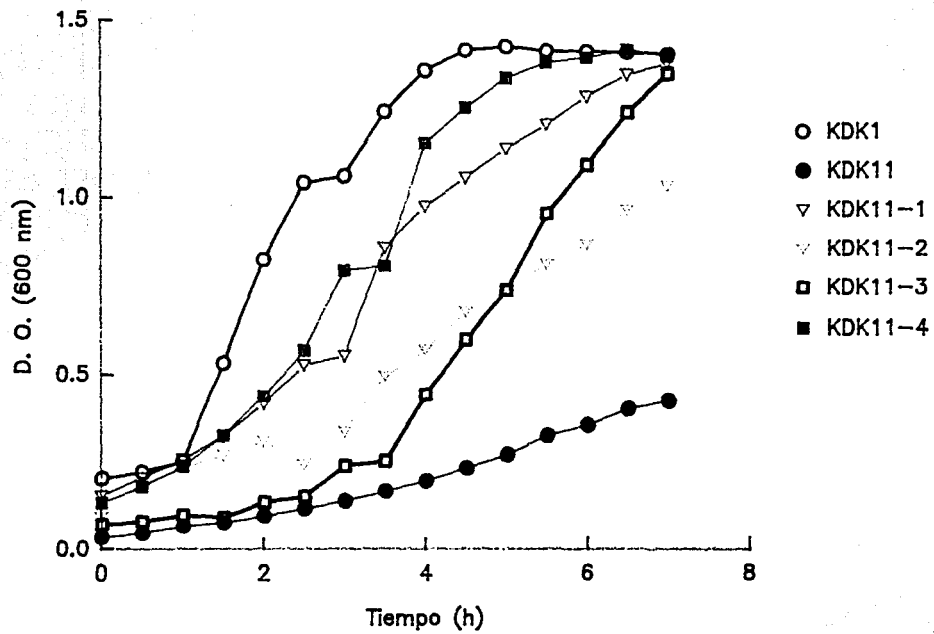


Figura 7. Curvas de crecimiento de cepas KDK11  $\text{PTS}^- \text{Glc}^+$  obtenidas por cultivo continuo.

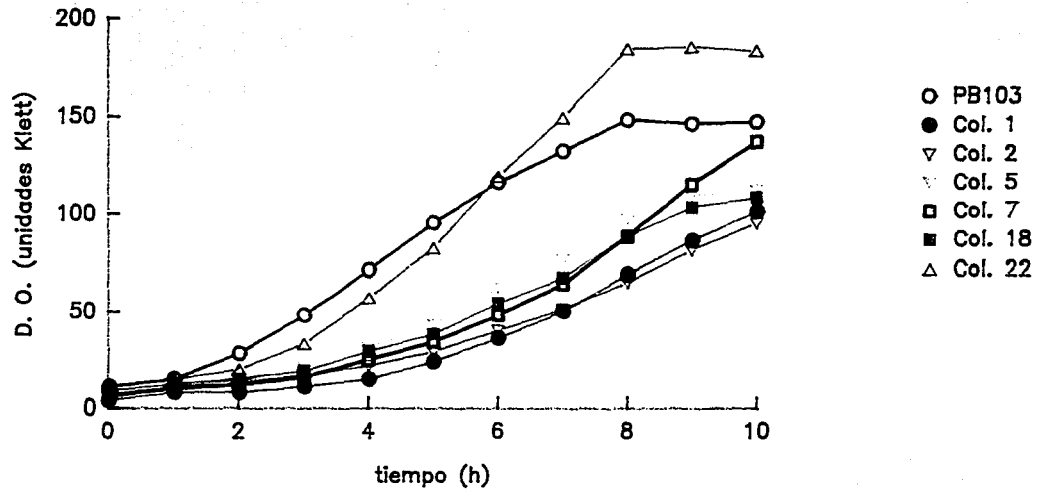


Figura 8 Curva de crecimiento de diferentes mutantes PB103 PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> obtenidas por cultivo continuo

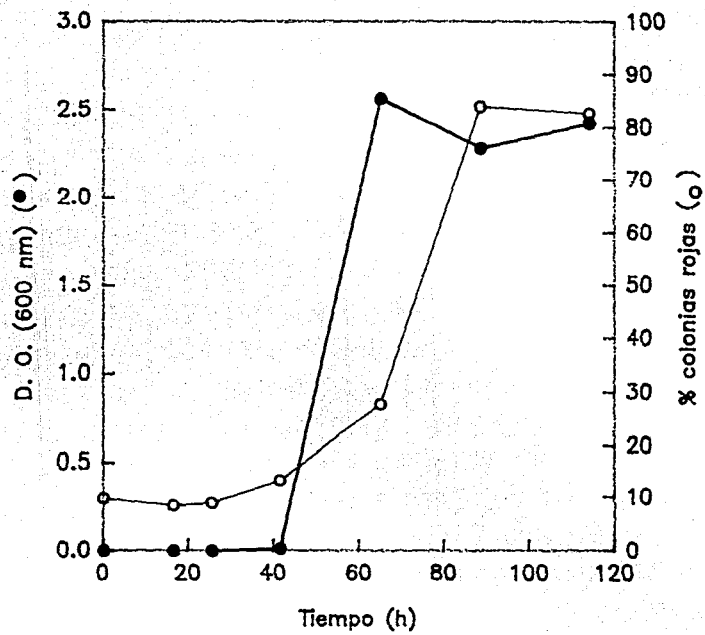


Figura 9. Porcentaje de aparición de mutantes  $PTS^- Glc^+$ .



Se usaron como cepas progenitoras la KDK1 y la PB103 (Genencor Int., USA). A partir de estas se construyeron sus derivadas PTS<sup>-</sup> por delección del operón *pts* y se obtuvieron las cepas KDK11 y NF6 respectivamente. Se seleccionaron mutantes espontáneos Glc<sup>+</sup> en cultivo continuo bajo las mismas condiciones que para la cepa PB11. En ambos casos se obtuvieron resultados similares a los de la cepa JM101 y sus derivadas como se muestra en las figuras 7 y 8. Esto es, cepas con diferentes velocidades de crecimiento.

También se repitió el cultivo continuo de la PB11 en tres ocasiones diferentes bajo las mismas condiciones que el primero y en todos los casos se obtuvieron resultados similares a los iniciales.

### Porcentaje de aparición de mutantes Glc<sup>+</sup>.

Para determinar en qué momento del crecimiento empiezan a parecer mutantes espontáneos de la cepa PB11 que puedan crecer en medio mínimo con glucosa, se hizo una fermentación en las mismas condiciones que las utilizadas para aislar mutantes PTS<sup>-</sup>, Glc<sup>+</sup> con la diferencia de que solo se crecieron hasta fase estacionaria sin llegar a hacer el cultivo continuo. Se tomaron muestras a lo largo de la curva de crecimiento y se platearon diluciones en Mck-glc. Se determinó el punto de aparición y la proporción de colonias rojas y blancas. Los resultados se muestran en la tabla 6 y figura 9.

Tabla 6. Porcentaje de aparición de mutantes PTS<sup>-</sup>, Glc<sup>+</sup> a partir de la cepa PB11.

Tiempo (h)	D. O. (600 nm)	Colonias rojas (%)
0	0.2923	0.00
16.5	0.2507	0.00
25.5	0.2656	0.00
41.5	0.4017	0.42
65.0	0.8305	85.44
88.5	2.5200	76.13
114.0	2.4800	80.90

### Enriquecimiento de una sola mutante.

La estrategia del cultivo continuo permitió obtener diversas mutantes Glc<sup>+</sup> pero no fue posible determinar si se podía seleccionar una sola mutante si el cultivo hubiese alcanzado la fase estacionaria. Para demostrar si esto sucedía se hizo una fermentación en las mismas condiciones que la anterior y se tomaron muestras en los puntos indicados en la figura 10. 10 µl de estas muestras se usaron para inocular matraces de 125 ml con 20 ml de medio M9 con glucosa. Se hicieron curvas de crecimiento y se tomaron nuevamente muestras para inocular matraces en las mismas condiciones que los primeros. Este proceso se repitió en tres ocasiones, tomando como inóculo, células del cultivo inmediato anterior. Del último punto de cada curva se determinó el porcentaje de colonias rojas en medio Mck-glc (ver tabla 7 y figura 11).

Tabla 7. Porcentaje de colonias rojas al aislar una sola mutante.

Matríz	D.O. (600 nm)	% colonias rojas
1	1.79	15.5
1a	1.88	41.9
1b	1.86	91.4
1c		99.0
2	1.97	58.7
2a	1.86	84.6
2b	1.92	95.2
2c		100
3	1.78	29.7
3a	1.92	89.0
3b	2.07	98.2
3c		98.7

En este caso, como en el caso anterior, existe un cierto porcentaje de colonias blancas que podrían ser células que dejaron de crecer o bien, que crecieron utilizando algún componente producido por aquellas que utilizaron glucosa como fuente de carbono.

Para identificar si las mutantes así seleccionadas son idénticas en cuanto a comportamiento de crecimiento y si las colonias blancas existentes al final de los cultivos no pueden crecer en medio mínimo con glucosa, se aislaron tres colonias blancas y cuatro colonias rojas del matraz 3c para hacer curvas de crecimiento de cada una (figura 12).

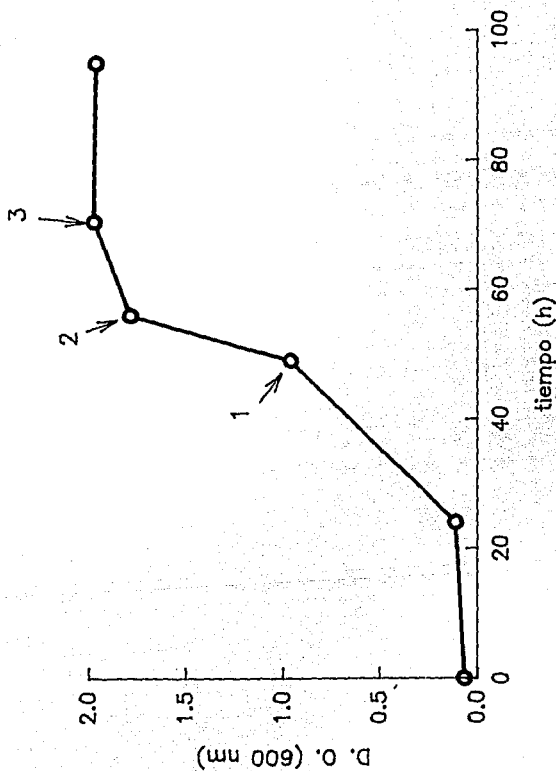


Figura 10 Curva de crecimiento de PB11 para selección de una mutante enriquecida.

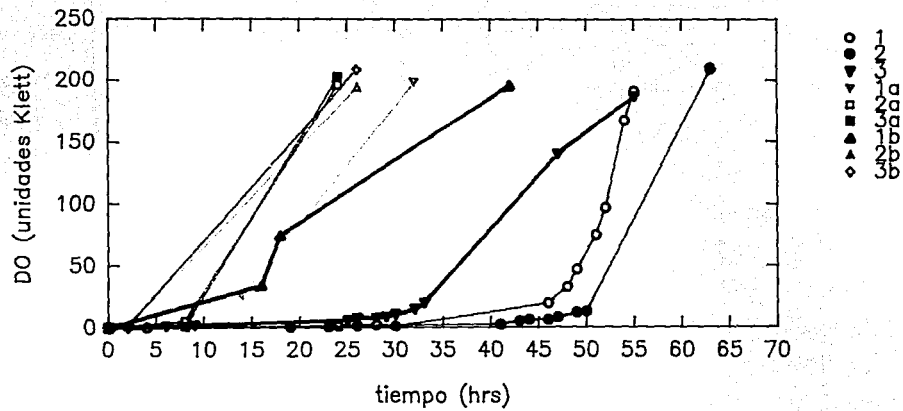


Figura 11. Crecimiento de diferentes muestras de un cultivo continuo de PB11 para seleccionar una sola mutante.

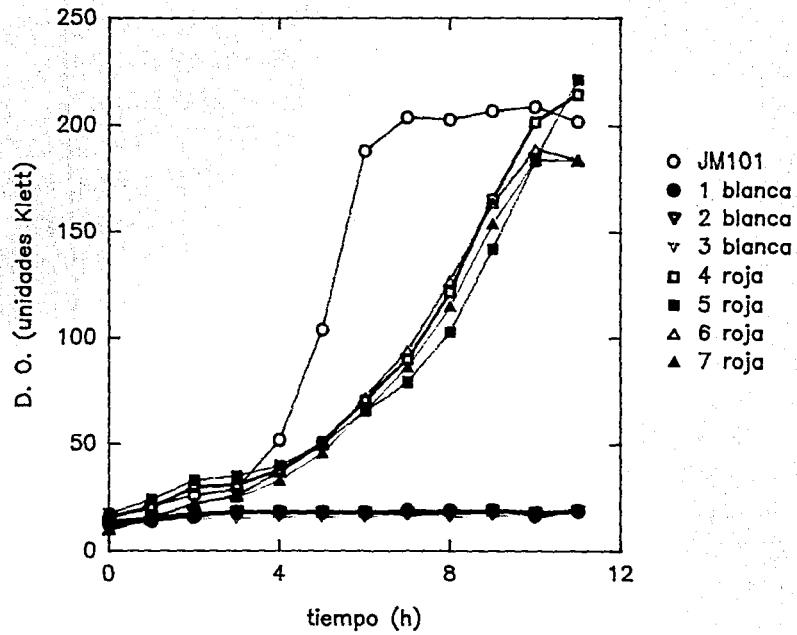


Figura 12. Selección de mutantes del cultivo continuo de PB11

De los resultados obtenidos se concluyó que las colonias blancas no crecieron en glucosa y que las mutantes PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> seleccionadas fueron de un mismo grupo que correspondió al de menor velocidad de crecimiento (0.4), como la cepa PB12.

### **Mutantes PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> en la cepa PB103.**

La cepa PB103 ha sido seleccionada en fermentador para la producción de compuestos aromáticos tales como fenilalanina y triptofano. Transformada con plásmidos multicopia que contienen los genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos, esta cepa produce altos niveles de triptofano pero no alcanza el máximo teórico calculado. Se planteó entonces la posibilidad de aumentar los rendimientos de esta cepa mediante la redirección del flujo de carbono para aumentar la disponibilidad de PEP y de eritrosa-4-fosfato (E4P). La hipótesis era que con una cepa PB103 PTS<sup>-</sup> Glc<sup>+</sup> y los plásmidos antes mencionados, el flujo de carbono se podría dirigir hacia la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Por tal razón, se construyeron cepas con este fenotipo con la estrategia indicada en la sección anterior. Los niveles de producción de aminoácidos aromáticos fueron evaluados en dichas mutantes.

### **iii) Aplicación de las cepas construidas.**

#### **Producción de aminoácidos aromáticos en las cepas NF8 y NF9.**

De las mutantes aisladas por cultivo continuo de la cepa NF6 se seleccionaron dos colonias (2 y 22) a las que se denominó NF8 y NF9 respectivamente para hacer estudios de producción de aminoácidos aromáticos. Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Alan Berry en la compañía Genencor Int. Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en las figuras 13 y 14.

En la figura 15 se muestra un esquema de las vías metabólicas involucradas en la producción de aminoácidos aromáticos. Es evidente que las concentraciones de 3-deoxiarabinoheptuloso-7-fosfato (DAHP), antranilato e indol son claves para la producción de triptofano y que la actividad de las enzimas involucradas puede ser limitante. Por tal razón es que se transformaron las cepas NF8 y NF9 con los plásmidos que contienen los genes de las enzimas clave de esta vía. El efecto de multicopia del plásmido permite obtener mayores niveles de las enzimas, de tal modo que estas no sean limitantes y que se generen y utilicen al máximo posible los compuestos necesarios para producir triptofano.

En la tabla 8 se indican los genes que contienen cada uno de los plásmidos utilizados. Los resultados demostraron que se incrementó en 2.5 veces la

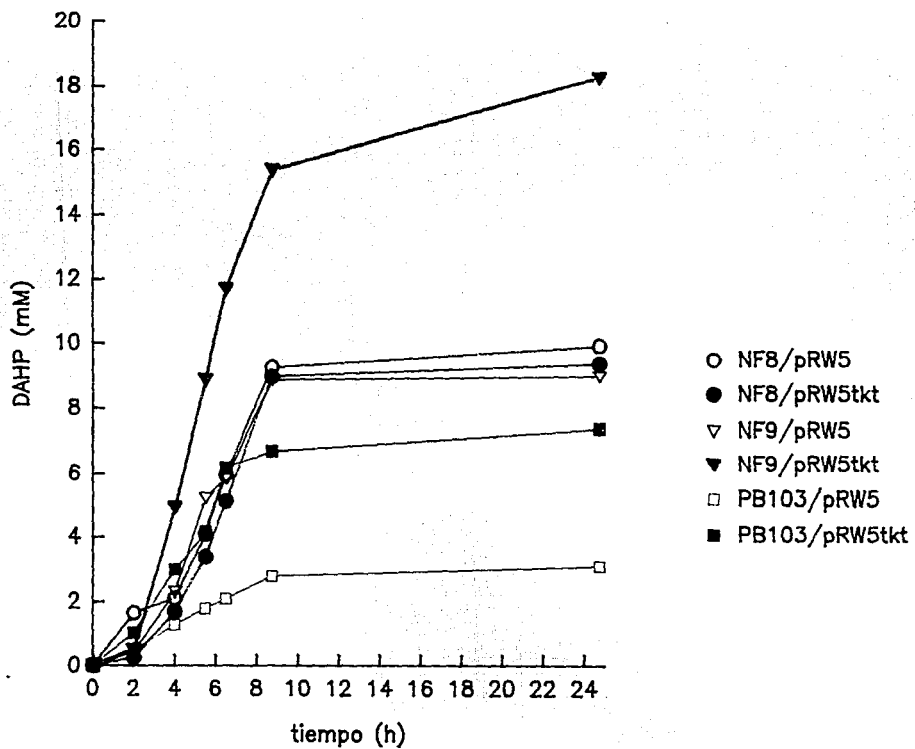


Figura 13 Producción de DAHP en diferentes fondos genéticos

producción de triptofano con respecto a la cepa progenitora.

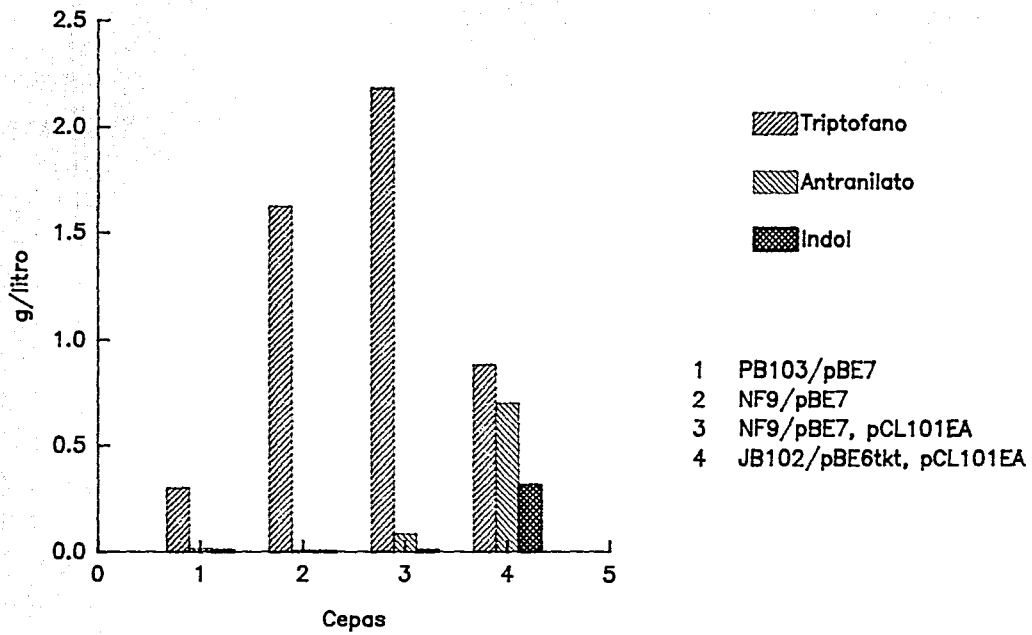


Figura 14 Producción de triptofano e intermedarios.



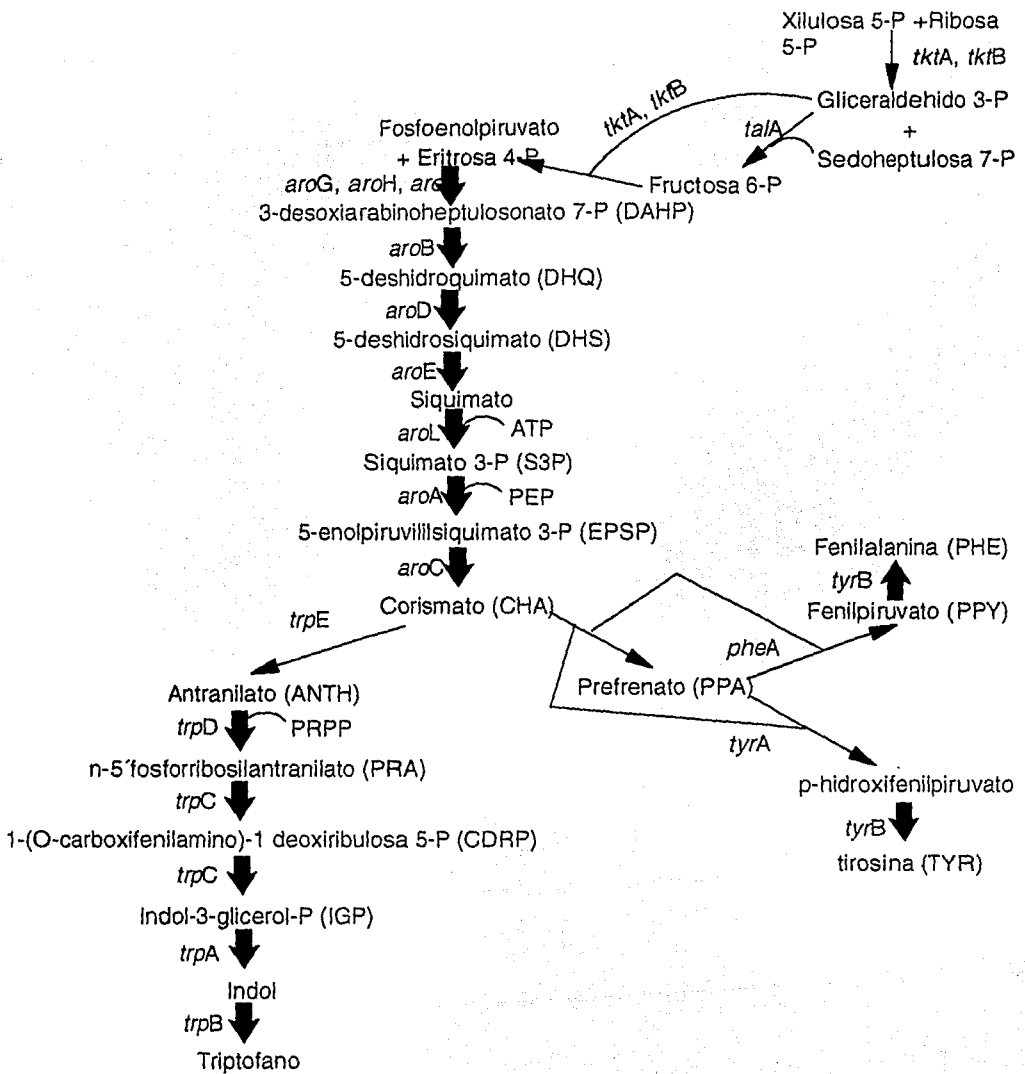


Figura 15. Vias de sintesis de aminoacidos aromaticos

Tabla 8. Genes contenidos en los plásmidos necesarios para la producción de triptofano.

Plásmido	Genes
pRW5	<i>aroG<sup>lbr</sup></i>
pRW5tkt	<i>aroG<sup>lbr</sup>, tktA</i>
pCL101EA	<i>aroE, aroA, aroC, aroB, aroL</i>
pBE6	<i>trpA, trpB, trpC, trpD, trpE</i>

## VII. Discusión.

Holms (7), ha calculado el flujo de carbono en las vías metabólicas principales de *Escherichia coli* crecida en medio mínimo. En la figura 1 se muestra cómo la célula administra el PEP que se forma en la glucólisis. De esos cálculos se desprende que el PEP formado a través de la glucólisis, se distribuye diferencialmente en 4 vías como se muestra en la figura 16.

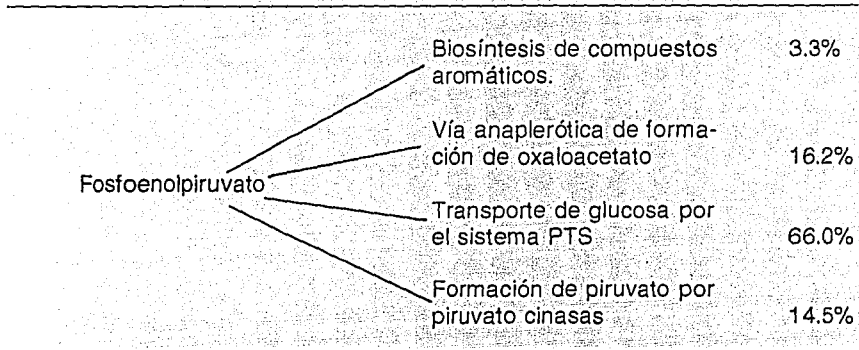


Figura 16. Distribución de PEP en *E. coli*.

El análisis de estos datos muestra que si se desea sobreproducir aminoácidos aromáticos en *E. coli*, es necesario contener con el hecho de que todas las vías metabólicas han sido diseñadas para no sobreproducir estos compuestos y un paso limitante, es la disponibilidad de PEP.

En nuestro laboratorio nos hemos enfocado al problema de incrementar la concentración de PEP disponible para canalizarlo hacia la vía de biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Para este fin se construyeron cepas diferentes de *E. coli* que transportan glucosa por una vía que no consume PEP. Estas cepas carecen del operón *ptsH/crr* y no pueden crecer en azúcares que utilizan este sistema para su transporte. A partir de estas cepas, se aislaron revertantes capaces de transportar glucosa por vías alternativas al sistema PTS con diferentes eficiencias.

La selección de mutantes PTS capaces de transportar glucosa eficientemente se llevó a cabo por medio de un cultivo continuo o quimiostato (34) diseñado para aislar mutantes que tuvieran una tasa de crecimiento de al menos un 50% con respecto a la cepa progenitora PTS\*. Aumentando la tasa de flujo de glucosa en el quimiostato, se lograron seleccionar mutantes con diferentes velocidades de crecimiento.

Resultó de particular importancia la estrategia diseñada pues con este

sistema se lograron obtener diferentes mutantes que de otro modo se hubiesen tenido que generar una por una.

Otra característica importante de esta estrategia es la reproducibilidad que muestra aún en otros fondos genéticos de *E. coli*, lo cual se demostró utilizando cepas mutantes (KDK1 y PB103) proporcionadas por la compañía Genencor, Inc.

El crecimiento de las cepas mutantes obtenidas por selección en quimiostato, se encuentra limitado por la velocidad de transporte de glucosa, lo cual no ocurre en ninguna enterobacteria de manera natural y tiene relevancia porque puede facilitar el control de los procesos de fermentación. Lo anterior se debe a que cuando *E. coli* está creciendo a una velocidad de crecimiento baja, los requerimientos anabólicos y catabólicos de las células son cubiertos por el metabolismo oxidativo; sin embargo, cuando la tasa de crecimiento es alta, *E. coli* reorganiza su metabolismo y produce acetato para generar NADH y ATP (35). Esto conlleva a un problema ya que, dependiendo de la concentración, el acetato puede inhibir el crecimiento celular. Se ha propuesto que la producción de acetato puede disminuir si se reducen los requerimientos anabólicos por una entrada lenta de glucosa. Es difícil de lograr el transporte dosificado de glucosa debido a que el sistema PTS es muy eficiente y permite la acumulación de glucosa intracelular con alta eficiencia; aún cuando la concentración en el exterior sea muy baja. Las mutantes obtenidas, que utilizan GalP para transportar glucosa están utilizando un sistema de difusión facilitada que no permite la acumulación contra un gradiente de concentración y, por tanto, su crecimiento depende de la diferencia en concentración de glucosa extracelular e intracelular.

Se desconocen hasta el momento los genotipos de las diferentes mutantes obtenidas pero se cuenta con algunas evidencias de los cambios sufridos. Los resultados obtenidos demuestran que la permeasa de galactosa, es el transportador de glucosa en todos los casos estudiados lo cual indica que GalP se expresa constitutivamente. Aunque se demostró que AMPc y CRP no están aparentemente involucrados en el fenotipo Glc.

Se sabe que el mejor sustrato de la GalP es la glucosa (36). En condiciones normales (con PTS funcional), esto no tiene importancia fisiológica, especialmente porque PTS es responsable de la exclusión del inductor y el regulón de galactosa no está inducido, aún cuando la galactosa se encuentra presente en el medio (37). Sin embargo, la delección del operón *ptsHlcr* provoca una situación nueva, el sistema preferido de transporte de glucosa está ausente y el efecto de exclusión del inductor se pierde. Bajo estas circunstancias, cualquier mutación que exprese al gene *galP*, o cualquier otro gene cuyo producto pueda transportar glucosa, debería producir células que puedan utilizar glucosa. No obstante, el grado de utilización de glucosa dependerá de la especificidad, el nivel y eficiencia del transportador.

Las mutantes descritas en este trabajo son diferentes a las reportadas por Biville, et al. (14). Esto no se esperaba ya que las cepas llevan la misma delección del operón *ptsHlcr*. Una posible explicación al respecto podría deberse a las

## ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

condiciones de selección de las mutantes, en particular al hecho de que en todos los experimentos el nivel de oxígeno disuelto siempre estuvo controlado y las células nunca estuvieron bajo condiciones limitantes de oxígeno.

Si bien en todas las mutantes estudiadas, GalP es el transportador, debe haber otras mutaciones que las hacen diferentes entre sí, como lo demuestran las distintas velocidades de crecimiento. Una de estas diferencias podría ser la forma en que se transporta la glucosa en estas cepas. Una posibilidad es que GalP por su alta afinidad por glucosa, la transporte directamente al interior celular y dentro la glucocinasa (glk) la fosforile. La otra posibilidad es que la glucosa se transforme en gluconato fuera de la célula y entonces se transporte al interior. Para que esto ocurriera, deberían generarse mutaciones PQQ como las reportadas por Biville, et al., pero con la diferencia de que estas si utilizaran GalP para transportar el azúcar. Cabe la posibilidad de que GalP también tenga afinidad por gluconato, lo cual es bastante probable, ya que se sabe que esta permeasa tiene afinidades diferentes para varios azúcares (36). Aunque este azúcar tiene su propio transportador, una permeasa codificada por *gntS* (33), en presencia de GalP la eficiencia de transporte es sensiblemente mayor que cuando esta permeasa está ausente. Probablemente la velocidad de transporte de gluconato, por su propio transportador, es muy baja y GalP permite elevarla.

Por otro lado, al igual que las cepas de Biville, las cepas *pts* construidas en este trabajo, tienen velocidades muy bajas de crecimiento en medio mínimo con glucosa, pero después de un largo periodo, surgen mutantes que tienen un crecimiento rápido. Algunas de las colonias presentaron una morfología similar a la de la cepa progenitora y color rojo en cajas de Mck-glc. Otras, sin embargo, presentaron un fenotipo inestable y otras, fueron mucoides o producían colonias pequeñas. También hubo diferencias en el grado de color rojo de las colonias. Y otras mas fueron blancas.

Las diferencias en coloración y morfología pueden deberse a diferentes mutaciones obtenidas. Se descartó la posibilidad de contaminación pues estas diferentes colonias tienen todas las características esperadas y solo se diferencian en la coloración y morfología de las colonias. Las colonias blancas que se detectaron a lo largo de toda la curva de crecimiento, pudieran ser mutantes que no asimilaron glucosa con suficiente velocidad para producir el color rojo, pero si pudieran crecer en glucosa o bien que se estuviesen manteniendo por utilizar compuestos liberados al medio por aquellas que sí utilizan este azúcar. Los resultados demostraron que la segunda opción era la más probable.

### **Sobreproducción de aminoácidos aromáticos.**

Los aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina y tirosina son moléculas interesantes desde el punto de vista industrial ya que se comercializan directamente como complementos alimenticios, o se utilizan para la síntesis de numerosos productos comerciales tales como Aspartamo, indol, melanina, ácido

indolacético, colorantes como azul indigo, etc. (ver figura 17). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, para sobreproducir estos compuestos, ha sido necesario rediseñar el metabolismo celular a través de la Ingeniería de vías metabólicas.

En la Compañía Genencor Int., se ha desarrollado un sistema para sobreproducir estos compuestos. Dicho desarrollo consta de cepas productoras como PB103 y NF9 construidas en este trabajo y plásmidos que contienen los genes que codifican para las enzimas importantes para sobreproducir aminoácidos aromáticos. Los resultados de la producción de estos compuestos en ambas cepas demuestran que la cepa NF9 alcanza el máximo nivel teórico, 2.5 veces más que lo obtenido con la cepa productora. Esto indica que efectivamente se logró redirigir el flujo de carbono por un aumento en la disponibilidad de PEP en la célula, y un incremento en la concentración de las enzimas necesarias.

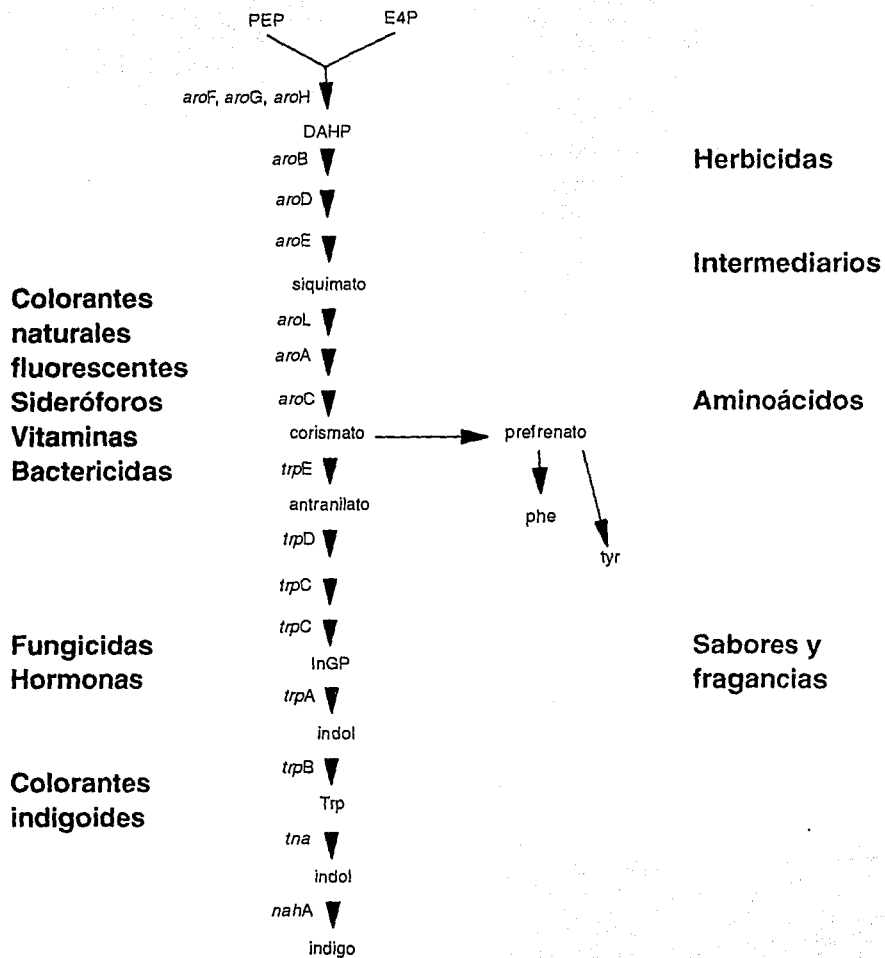


Figura 17. Productos de interés comercial que se pueden obtener por la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos.

### VIII. Bibliografía.

- 1.- Postma P. W., Lengeler, J. W. y Jacobson, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microb. Rev.* **57**:543-594
- 2.- Romano, A. H., Trifone, J. D. y Brustolon, M. 1979. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *J. Bacteriol.* **139**:93-97
- 3.- Nikaido, H. y Saier, M.H., Jr. 1992. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science.* **258**:936-942.
- 4.- Romano, A. H. y Saier, M. H., Jr. 1992. Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. I. Physiological and organismic considerations. In *The evolution of metabolic Function.* (R. P. Mortlock, ed) Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 171-204. (y referencia: Saier, M. H., Jr. 1985. Mechanisms and regulation of carbohydrate transport in bacteria. Academic Press, New York, London.)
- 5.- Saier, M. H., Jr. y Chin, A. M. 1990. Energetics of bacterial phosphotransferase system in sugar transport and the regulation of carbon metabolism. (T. A. Krulwich ed.), *The Bacteria: a treatise on structure and function.* Vol. XII. Bacterial energetics. pp. 273-299. Academic Press, New York.
- 6.- Saier, M. H., Jr. 1990. Coupling of energy to transmembrane solute translocation in bacteria. "6th Forum in Microbiology". *Res. Microbiol.*, **141**:281-395.
- 7.- Holms, W. H. 1986. The Central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current topics in cellular regulation.* (B. L. Horecker, E. R. Stadtman eds) Academic Press. pp. 69-104.
- 8.- Postma, P. W. y Stock, J. B. 1980. Enzymes II of the phosphotransferase system do not catalyze sugar transport in the absence of phosphorylation. *J. Bacteriol.* **141**: 476 -484.
- 9.- Saier, M. H., Jr., Bromberg, F. G. y Roseman, S. 1973. Characterization of constitutive galactose permease mutants in *Salmonella thyphimurium*. *J. Bacteriol.* **113**: 512-514.
- 10.- Postma, P. W. 1981. Defective enzyme II-B<sup>Glc</sup> of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system leading to uncoupling of



transport and phosphorylation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **147**:382-389.

11.- De Reuse, H., Huttner, E. y Danchín, A. 1984. Analysis of the *ptsH-ptsI-crr* region in *Escherichia coli* K-12: evidence for the existence of a single transcriptional unit. Gene **32**:31-40.

12.- Postma, P. W. 1977. Galactose transport in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **129**:630-639.

13.- Neijssel, O. M., Tempest, D. W., Postma, P. W., Duine, J. A. y Frank, J. Jr. 1983. Glucose metabolism by K<sup>-</sup>limited *Klebsiella aerogenes*: evidence for the involvement of a quinoprotein glucose dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. **20**:35-39.

14.- Biville, F., Turlin, E. y Gasser, F. 1991. Mutants of *Escherichia coli* producing pyrroloquinoline quinone. J. General Microbiol. **137**:1775-1782.

15.- Pastan, I. y Perlman, R. L. 1969. Repression of  $\beta$ -galactosidase synthesis by glucose in phosphotransferase mutants of *Escherichia coli*. Repression in the absence of glucose phosphorylation. J. Biol. Chem. **244**:5836-5842.

16.- Postma, P. W. 1982. Regulation of sugar transport in *Salmonella typhimurium*. Ann. Microbiol. (Paris). **133A**:261-267.

17.- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**:103-119.

18.- Silhavy, T. J., Berman, M. L. y Enquist, L. W. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor. U.S.A. pp. 111-112.

19.- Lévy, S., Zeng, G. y Danchín, A. 1990. Cyclic AMP synthesis in *Escherichia coli* strains bearing known deletions of the *pts* phosphotransferase operon. Gene **86**:27-33.

20.- Gottesman, S. 1990. Minimizing proteolysis in *Escherichia coli*: genetic solutions. Methods in Enzymology. **185**:119-129.

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

22.- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. y Schaechter, M. 1990. Physiology of the

bacterial cell. A molecular approach. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA. p. 133-196.

23.- Vyas, N. K., Vyas, M. N. y Quioco, F. A. 1991. Comparison of the periplasmic receptor for L-arabinose, D-glucose/D-galactose, and D-ribose. Structural and functional similarity. *J. Biol. Chem.* **266**:5226-5237.

24.- Ruijter, G. J. G., Postma, P. W. y van Dam, K. 1990. Adaptation of *Salmonella typhimurium* mutants containing uncoupled enzyme II<sup>glc</sup> to glucose limited conditions. *J. Bacteriol.* **172**:4783-4789.

25.- Weickert, M. J. y Adhya, S. 1992. Isorepressor of the *gal* regulon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **226**:69-83.

26.- A. Death y T. Ferenci. 1993. The importance of the binding-protein-dependent Mgl system to the transport of glucose in *Escherichia coli* growing on low sugar concentrations. *Res. Microbiol.* **144**: 529-537.

27.- Cordaro, J. C., Melton, T., Stratis, J. P., Atagün, M., Gladding, C., Hartman, P. e. y Roseman, S. 1976. Fosfomicin resistance: selection method for internal and extended deletions of phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **128**:785-793.

28.- Golding, A., Weickert, M. J., Tokeson, J. P. E., Garges, S. y Adhya, S. 1991. A mutation defining ultrainduction of the *Escherichia coli gal* operon. *J. Bacteriol.* **173**:6294-6296.

29.- Mori, M. y Shio, I. 1987. Pyruvate formation and metabolic in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**:129-138.

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

31.- Yansura, D. G. y Henner, D. J. 1990. Use of *Escherichia coli trp* promoter for direct expression of proteins. *Methods in Enzymol.* **185**:54-60.

32.- Postma, P. W. 1987. Phosphotransferase system for glucose and other sugars. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. (Neidhardt, F. C. ed). American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 127-141.

33.- Lin, E. C. C. 1987. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and

Molecular Biology. (Neidhardt, F. C. ed). American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 244-284.

34.- Dykhuizen, D. y Hartl, D. 1983. Selection in chemostats. *Microbiol. Rev.* **47**:150-168.

35.- Han, K., Lim, H. y Hong, J. 1992. Acetic formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotech. Bioeng.* **39**:663-671.

36.- Henderson, P. y Maiden, M. 1990. Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relatives in both prokaryotes and eukaryotes. *Phil. Trans. R.Soc. , Lond.* **326**:391-410.

37.- Weickert, M. y Adhya, S. 1993. The galactose regulon of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiol.* **10**:245-251.

38.- Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Press. USA. pp. 59, 71 y 441.