



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Modificación del metabolismo central de carbono en
Bacillus subtilis para la producción de compuestos
aromáticos**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

P R E S E N T A:

M. en C. Natividad Cabrera Valladares

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Mario Soberón Chávez

Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Instituto de Investigaciones Biomédicas - Universidad Nacional Autónoma de México



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 se realizó bajo la dirección del Dr. Guillermo Gosset Lagarda en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT No. De Registro 138521 y de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM IN214709.

Miembros del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Enrique Merino Pérez

SECRETARIO: Dr. Lorenzo Segovia Forcella

VOCAL: Dra. María Esperanza Martínez

VOCAL: Dr. Leobardo Serrano Carreón

VOCAL: Dr. Daniel Genaro Segura González

AGRADECIMIENTOS

TUTOR

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dr. Mario Soberón Chávez

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dr. Sergio Sánchez Esquivel Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Enrique Merino Pérez

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dr. Daniel Genaro Segura González

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dra. María Esperanza Martínez

Centro de Investigaciones en

Ciencias Genómicas-UNAM

COLABORADORES :

M. en C. Ramón de Anda por su asesoría académica en técnicas de *Bacillus subtilis*.

Dra. Noemí Flores por su asesoría académica en los experimentos de RT-qPCR.

Quím. Luz María Martínez por su apoyo técnico en los experimentos de RT-qPCR.

M. en C. Georgina Hernández por su apoyo técnico en HPLC.

Mercedes Enzaldo por su apoyo técnico en la preparación de los medios de cultivo.

Al Dr. Fernando Valle (por los plásmidos ploxSpec-Walt y pCRM-Ts-Phleo)

A la unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM:

Dr. Paúl Gaytan

M. en C. Jorge A. Yañez

Q.I. Santiago Becerra

M. en C. Eugenio López Bustos

A todos y cada uno de los compañeros del laboratorio Bolívar/Gosset, por su compañía e innumerables experiencias que compartimos, especialmente: Montserrat, Alejandra, Inés, Noemí, Karla, Rocío, Andrea por su apoyo y amistad.

ÍNDICE

Índice de figuras

Figura 1. Vía de síntesis de compuestos aromáticos en <i>B. subtilis</i>	20
Figura 2. Formación de oxaloacetato en <i>E. coli</i> y en <i>B. subtilis</i>	25
Figura 3. Esquema que muestra la interrupción de los genes <i>pykA</i> , <i>ptsG</i> y <i>ptsGHI</i> , respectivamente con el casete de Sp.....	44
Figura 4. Cultivos en matraces de las cepas <i>B. subtilis</i> 168, CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp en medio mineral con glucosa.....	48
Figura 5. Consumo de glucosa radioactiva en cepas de <i>B. subtilis</i> 168, CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp	50
Figura 6. Cultivos de células en reposo de las cepas 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB	52
Figura 7. a) Cultivo de células en reposo vs b) Cultivo lote de las cepas 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB.....	55
Figura 8. Perfil del gen <i>hsbU</i> como gen de referencia.....	57
Figura 9. Esquema del metabolismo central de carbono en <i>B. subtilis</i> que muestra los genes y las proteínas involucradas en su transformación.....	58
Figura 10. Cultivos lote secuenciales de la cepa CVPTSGHISp	70
Figura 11. Dinámica de la evolución adaptativa de la cepa CVPTSGHISp que incluye la caracterización en medio mineral con glucosa de 70 colonias aisladas evolucionadas.....	71

Figura 12. Cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre *B. subtilis* 168, mutante CVPTSGHISp y de 5 cepas evolucionadas en medio mineral con glucosa.....73

Figura 13. Cultivo de 10 cepas evolucionadas en medio mineral con xilosa....76

Figura 14. Cinéticas de crecimiento y utilización de fuentes de carbono de la cepa silvestre *B. subtilis* 168 y de 3 cepas evolucionadas (CV842, CV844 y CV854) en medio mineral con una mezcla de glucosa - xilosa.....77

Figura 15. Cinética de crecimiento y utilización de fuentes de carbono de la cepa evolucionada CV846 en medio mineral con una mezcla de glucosa - xilosa78

Figura 16. Cinética de crecimiento y utilización de fuentes de carbono de la cepa evolucionada CV846 en medio mineral con una mezcla de glucosa - xilosa - arabinosa.....78

Figura 17. Utilización de glucosa o xilosa de la cepa CV846 (*glcP*-) en medio mineral.81

Figura 18. Cultivos de las cepas evolucionadas CV846, CV863 y CV879 que expresa el gen *gfp* a través del plásmido pSSBm85 en medio mineral con xilosa.....85

Figura 19. Cinéticas de crecimiento de las cepas *B. subtilis* 168, CVPTSGHISp y CV846 así como el patrón de utilización de fuentes de carbono de la cepa evolucionada CV846 en medio rico LB suplementado con mezclas de glucosa - xilosa y glucosa - xilosa - arabinosa en condiciones anaeróbicas.....87

Figura 20. Cultivos lote secuenciales de la cepa CVPYKSp.....90

Figura 21. Cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre *B. subtilis* 168, mutante CVPYKSp y de 8 cepas evolucionadas en medio mineral con glucosa.....**92**

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleotidos utilizados para la inactivación de los genes <i>pykA</i> , <i>ptsG</i> , <i>ptsGHI</i> , <i>aroB</i> y <i>glcP</i> ; y para los estudios de RT-qPCR de <i>B. subtilis</i>	30
Tabla 2. Cepas y plásmidos usados y construidos en este trabajo.....	33
Tabla 3. Utilización de fuentes de carbono PTS y no PTS por las mutantes del metabolismo central de carbono de <i>B. subtilis</i>	45
Tabla 4. Comparación de los parámetros cinéticos μ y q_{Glc} obtenidos de 2 experimentos independientes por duplicado para <i>B. subtilis</i> 168 y las mutantes en medio mineral con glucosa.....	48
Tabla 5. Comparación de la velocidad inicial de transporte (σ_{Glc}) para la cepa silvestre y las mutantes.....	50
Tabla 6. Comparación de los parámetros cinéticos (q_{Glc} , q_{DAHP} y $Y_{DAHP/Glc}$) obtenidos de 3 experimentos de células en reposo para las cepas 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB.....	53
Tabla 7. Niveles de transcripción relativa determinada por RT-qPCR de varios grupos de genes de las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp... ..	59
Tabla 8. Parámetros cinéticos de la cepa silvestre <i>B. subtilis</i> 168, mutante CVPTSGHISp y de 5 cepas evolucionadas en medio mineral con glucosa.....	74
Tabla 9. Crecimiento de la cepa silvestre <i>B. subtilis</i> 168 y de 10 cepas evolucionadas que tienen interrumpido el gen <i>glcP</i> en placas con medio mineral suplementado con glucosa o xilosa como fuente de carbono.....	80

Tabla 10. Parámetros cinéticos μ y q_{Glc} de cepas evolucionadas derivadas de la mutante CVPYKSp.....	93
---	-----------

Índice.....	5
Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	8
1. Resumen.....	14
2. Summary.....	16
3. Introducción y Antecedentes.....	18
3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	18
3.2 Vía biosintética de los compuestos aromáticos en <i>B. subtilis</i>	19
3.3 Estrategias de la ingeniería de vías metabólicas para aumentar la producción de los compuestos aromáticos en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>	21
3.4 Sistema de fosfotransferasa PTS en <i>B. subtilis</i>	22
3.6 Piruvato cinasa en <i>B. subtilis</i>	24
3.6 Reacción anaplerótica de formación de oxaloacetato en <i>B. subtilis</i>	24
3.7 Mecanismo global de la represión catabólica por carbono (RCC) en <i>B. subtilis</i>	25
4. Hipótesis.....	28
5. Objetivos.....	28
6. Materiales y metodología.....	30
6.1 Oligonucleotidos utilizados y plásmidos/cepas construidos en este trabajo.....	30
6.2 Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y técnicas de ADN recombinante.....	34
6.2.1 Transformación de ADN.....	34
6.2.2 Cultivos para determinar las velocidades específicas de crecimiento (μ) y de consumo de glucosa (q_{Glc}).....	34
6.2.3 Cultivos de células en reposo para determinar la producción de DAHP, velocidades específicas de producción de DAHP (q_{DAHP}) y el rendimiento de DAHP a partir de glucosa ($Y_{DAHP/Glc}$).....	35
6.3 Construcción de mutantes en el metabolismo central de <i>B. subtilis</i> 168.....	36

6.4 Generación de cepas de <i>B. subtilis</i> que carecen de la actividad dehidroquinato sintasa.....	37
6.5 Generación de cepas de <i>B. subtilis</i> que carecen del transportador GlcP.....	38
6.6 Condiciones de experimentos de transporte.....	39
6.7 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	40
6.8 PCR de tiempo real.....	41
7. Resultados y Discusión.....	43
7.1 Construcción de mutantes en el metabolismo central de <i>B. subtilis</i> 168.....	43
7.2 Caracterización de mutantes en el metabolismo central de <i>B. subtilis</i> 168.....	44
7.2.1 Utilización de fuentes de carbono PTS y no PTS en medio mineral por las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp.....	44
7.2.2 Caracterización cinética de las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp en medio mineral con glucosa como única fuente de carbono.....	46
7.2.3 Medición de la velocidad inicial de transporte con glucosa.....	49
7.3 Efecto de las mutaciones en el metabolismo central sobre la producción de DAHP.....	51
7.3.1 Comparación entre cultivos de células en reposo y cultivos ricos sobre la producción de DAHP en las mutantes de <i>B. subtilis</i> AroB ⁻	53
7.4 Análisis del patrón transcripcional de genes representativos del metabolismo central en las mutantes de <i>B. subtilis</i>	56
7.4.1 Transporte y fosforilación de glucosa.....	61
7.4.2 Glucólisis.....	62
7.4.3 Metabolismo de piruvato y acetil-CoA.....	62
7.4.4 Utilización de acetato y xilosa.....	64

7.4.5	Vía común de síntesis de compuestos aromáticos.....	65
7.4.6	Gluconeogénesis y vía anaplerótica.....	65
7.5	Generación por evolución adaptativa y caracterización cinética de cepas derivadas de las mutantes que carecen de la actividad del sistema fosfotransferasa PTS de <i>B. subtilis</i> (CVPTSGHISp) y de la actividad de piruvato cinasa de <i>B. subtilis</i> (CVPYKSp).....	68
7.5.1	Evolución adaptativa a través de cultivos en lote secuenciales.....	68
7.5.2	Cultivos lote secuenciales con la cepa CVPTSGHISp.....	69
7.5.3	Dinámica de la evolución de la cepa CVPTSGHISp.....	70
7.5.4	Selección y caracterización cinética de 5 cepas evolucionadas en medio mineral con glucosa.....	72
7.5.5	Selección y caracterización cinética de 10 cepas evolucionadas en medio mineral con xilosa y una mezcla de glucosa-xilosa, glucosa-xilosa-arabinosa como fuentes de carbono.....	75
7.5.6	Identificación de GlcP como transportador de glucosa y xilosa en las cepas evolucionadas.....	79
7.5.7	Efecto de las mutaciones en el metabolismo central y del proceso de evolución sobre la producción de DAHP.....	82
7.5.8	Efecto de las mutaciones en el metabolismo central y del proceso de evolución sobre la expresión de proteína verde fluorescente.....	83
7.5.9	Efecto de las mutaciones en el metabolismo central y del proceso de evolución sobre la producción de láctico en condiciones de fermentación.	85
7.5.10	Cultivos lote secuenciales con la cepa CVPYKSp.....	89
7.5.11	Dinámica de la evolución de la cepa CVPYKSp.....	90
7.5.12	Caracterización cinética de 8 mutantes evolucionadas en medio mineral con glucosa.....	91
8.	Conclusiones.....	95

9. Perspectivas.....	97
10. Referencias.....	98
11. Artículos de <i>B. subtilis</i> relacionado a este trabajo.....	107
11.1 Cabrera-Valladares N, Martínez LM, Flores N, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F and Gosset G: Physiologic consequences of glucose transport and phosphoenolpyruvate node modifications in <i>Bacillus subtilis</i> 168. J mol microbiol biotechnol 2012; 22: 177-197.	
11.2 Licona-Cassani C, Lara AR, Cabrera-Valladares N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F and Gosset G: Inactivation of Pyruvate Kinase or the Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System Increases Shikimic and Dehydroshikimic Acid Yields from Glucose in <i>Bacillus subtilis</i> . J mol microbiol biotechnol 2013; 24(1): 37-45.	

1. RESUMEN

En este trabajo se construyeron tres cepas mutantes derivadas de *Bacillus subtilis* 168 (*trpC2*) con modificaciones en el metabolismo central de carbono. Estas mutantes son deficientes en la actividad piruvato cinasa (CVPYKSp), en la proteína EII_{Glc} del sistema de transporte de fosfotransferasa PTS (sugar phosphotransferase system) dependiente de PEP (CVPTSGSp) y en los componentes generales del sistema de transporte de fosfotransferasa PTS (EI y HPr así como la proteína EII_{Glc}) (CVPTSGHISp). También se evaluó el efecto de estas inactivaciones sobre las velocidades de crecimiento, de consumo de glucosa, de transporte de glucosa, la capacidad de acumular el primer intermediario aromático 3-deoxy-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) y sobre el nivel de expresión de 76 genes involucrados en el metabolismo central de carbono. Además, las mutantes CVPYKSp y CVPTSGHISp se sometieron a un cultivo lote en medio mineral con glucosa para obtener cepas derivadas con una velocidad de crecimiento mayor con respecto a las cepas parentales.

En la primera etapa, cultivos en matraces, con glucosa en medio mineral, demostraron que la inactivación de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* en las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp causó una reducción del 86.5, 63.4 y 82.7% en la velocidad de crecimiento respectivamente en comparación a la cepa silvestre. La velocidad de consumo de glucosa fue de 42.2, 65.0 y 38.1% para las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp respectivamente en comparación con la cepa silvestre; en cuanto a la velocidad inicial de transporte de glucosa se encontró que la cepa CVPYKSp, presentó una reducción del 89% con respecto a la silvestre.

Directa e indirectamente, los productos de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* utilizan al intermediario PEP como sustrato. El PEP es uno de los precursores directos de los compuestos aromáticos.

Con el fin de evaluar el efecto de la eliminación de las reacciones que utilizan al compuesto PEP como sustrato sobre la síntesis de compuestos aromáticos, se inactivó el gen *aroB* que codifica la enzima DAHP sintasa en las tres mutantes y en la cepa silvestre. Esta inactivación causa la acumulación del compuesto DAHP. Cultivos en matraces de células en reposo con glucosa mostró que las mutantes CVPTSGSp y CVPTSGHISp así como la cepa silvestre acumularon una concentración similar del compuesto DAHP. Solamente la cepa que carece de *pykA*, mostró mayor acumulación

de DAHP, una mayor productividad ($0.53 \text{ mmol}_{\text{DAHP}}\text{g}_{\text{DCW}}^{-1}\text{h}^{-1}$) y un incremento de 5.3 veces en el rendimiento ($0.37 \text{ mmol}_{\text{DAHP}}\text{mmol}_{\text{Glc}}^{-1}$) en comparación a la cepa silvestre.

En relación al análisis transcripcional, mediante RT-qPCR se encontró que los genes *glcU*, *yurM* y *yurN* que codifican para transportadores de glucosa, incrementaron su nivel de transcripción en las tres mutantes generadas, con respecto a la cepa silvestre. Otros genes que incrementaron su nivel transcripcional en las tres mutantes fueron *acsA* y los genes *xyLAB* en las mutantes CVPTSGSp y CVPTSGHISp. Estos genes codifican enzimas relacionadas con la utilización de fuentes secundarias de carbono tales como acetato y xilosa, respectivamente. Los genes gluconeogénicos *gapB*, *fbp* y *pckA* incrementaron su nivel transcripcional en las cepas CVPTSGSp y CVPTSGHISp. Este resultado nos sugiere una respuesta gluconeogénica parcial. En contraste, a estos resultados, el nivel de expresión de los genes de la glucólisis disminuyó significativamente en las mutantes generadas con respecto a la cepa silvestre, así como los genes *pta* y *ackA* que codifican enzimas relacionadas con la síntesis de ácido acético. Estos datos correlacionan con el bajo flujo glucolítico y con la disminución en la síntesis de la producción de ácido acético detectada en las tres mutantes.

Las mutantes CVPTSGHISp y CVPYKSp se sometieron a un cultivo lote secuencial en matraces con glucosa en medio mineral. Cultivos en matraces con glucosa de varias cepas evolucionadas derivadas de la mutante CVPTSGHISp demostraron que éstas incrementaron la velocidad de crecimiento aproximadamente en 3.7 veces con respecto a la cepa mutante CVPTSGHISp. La velocidad de crecimiento obtenida para las cepas evolucionadas corresponde al 65% al compararse con la cepa silvestre *B. subtilis* 168. Una de las cepas evolucionadas (CV846) adquirió la capacidad de utilizar xilosa como única fuente de carbono. Esta cepa presentó un consumo simultáneo de glucosa-xilosa y de glucosa-xilosa-arabinosa en cultivos tanto aerobios como anaerobios. Las propiedades adquiridas por las cepas evolucionadas, plantea la posibilidad de utilizarlas en medios de cultivo que contengan xilosa, glucosa y arabinosa, por ejemplo, hidrolizados de residuos agroindustriales como materia prima.

Por otro lado, se observaron dos poblaciones de las cepas evolucionadas derivadas de la mutante CVPYKSp, la velocidad de crecimiento para estos dos grupos incrementó en 2 y 5 veces con respecto a la mutante CVPYKSp.

2. SUMMARY

In this study, three mutant strains derived of *Bacillus subtilis* 168 (*trp C2*) were built, with changes in the central carbon metabolism. These mutants are deficient in pyruvate kinase activity (CVPYKSp) in the protein EII_{Glc}, of the phosphotransferase system (PTS) (CVPTSGSp) and the general components of PTS (EI and HPr as well as EII_{Glc}) (CVPTSGHISp). Also, the effect of these inactivations was assessed about the growth rates, the glucose consumption, the glucose transporter, the ability to accumulate the first aromatic intermediate 3-deoxy-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP) and the level of expression of 76 genes involved in central carbon metabolism. Mutants CVPYKSp and CVPTSGHISp were also subjected to cultivation in mineral medium with glucose to obtain derivated strains with a higher growth rate about the parental strains.

In the first stage, flask cultures, in mineral medium with glucose, demonstrated that the inactivation of *pykA*, *ptsG* and *ptsGHI* genes, in the mutants CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp caused a decrease of 86.5, 63.4 and 82.7% in the growth speed respectively, compared to the wild strain. The glucose consumption speed was 42.2, 65.0 and 38.1% for the strains CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp respectively, compared to the wild strain, and about the initial glucose transport speed was found that the strain CVPYKSp, presented 89% of reduction compared to the wild strain.

In order to evaluate the effect of eliminating of reactions using the compound PEP as a substrate of the synthesis of aromatic compounds, the gene *aroB* encoding the enzyme DAHP synthase in the three mutants and in the wild strain was inactivated. This deactivation causes accumulation of the compound DAHP. Flask cultures of resting cells with glucose showed that the mutants CVPTSGSp and CVPTSGHISp as well as the wild strain, accumulated a similar concentration of the compound DAHP. Only the strain lacking *pykA* gene, showed higher accumulation of DAHP, a higher productivity ($0.53 \text{ mmol}_{\text{DAHP}} \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{h}^{-1}$) and an increased of 5.3 times yield ($0.37 \text{ mmol}_{\text{DAHP}} \text{mmol}_{\text{Glc}}^{-1}$) compared to the wild strain.

In relation to the transcriptional analysis, by RT-qPCR was found that the *glcU*, *yurM* and *yur N* genes encoding glucose transporters, increased the transcription level in the three mutants that were generated, with respect to the wild strain. Other genes which increased their transcriptional levels in the three mutants were *acsA* and the *xylAB* genes

in the CVPTSGSp y CVPTSGHISp mutants. These genes encode enzymes involved with the utilization of secondary sources of carbon such as acetate and xylose, respectively. The gluconeogenic genes *gapB*, *fbp* and *pckA* increased their transcriptional level in the CVPTSGSp and CVPTSGHISp strains. This result suggests a partial gluconeogenic answer. In contrast with the two results, the expression level of the genes of the glycolysis had a meaningful decrease, in the generated mutants relating to the wild strain, such as the *pta* and *ackA* encoding related enzymes with acetic acid synthesis. These data correlate with the low glycolytic flux and with the decrease in the synthesis of production of acetic acid detected in the three mutants.

The CVPTSGHISp and CVPYKSp mutants were subjected to sequential batch flask cultures with mineral medium and glucose. Flask cultures with glucose of several evolved strains derivated of the CVPTSGHISp mutant, shown that they increased the growth rate approximately in 3.7 times with respect to the mutant strain CVPTSGHISp. Growth rate obtained for the evolved strains corresponds 65% compared with the wild strain *B. subtilis* 168. One of the evolved strains (CV846) acquired the ability of utilize xylose as a sole carbon source. This strain presented a simultaneous consumption of glucose-xylose and glucose-xylose-arabinose in aerobic and anaerobic cultures. Properties acquired by the evolved strains, raises the possibility for using in culture mediums that contains xylose, glucose and arabinose, to hydrolysate agro-industrial wastes as raw material, for example.

On the other hand, two populations of the evolved strains derivated of the mutant CVPYKSp were observed, the growth rate for these two groups, increased in 2 and 5 times with respect of the mutant CVPYKSp.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

3.1 *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria Gram positiva que se encuentra comúnmente en la parte superior del suelo y la rizosfera, la temperatura óptima de crecimiento - hostiles de estrés y limitación de nutrientes son comunes en su hábitat. Razón por la cual, *Bacillus* ha desarrollado un grupo de estrategias que le permiten sobrevivir bajo estas condiciones severas. Un ejemplo de estas estrategias es la formación de endoesporas resistentes a diferentes condiciones de estrés. Así como la síntesis de enzimas extracelulares como glucanasas, proteasas y nucleasas capaces de convertir polisacáridos presentes en las plantas en oligo, di, y monosacáridos. Desde el punto de vista industrial, la producción de endoesporas y enzimas extracelulares podrían representar una desventaja; por ejemplo, para la producción de proteínas recombinantes y heterólogas. Sin embargo, actualmente existen cepas modificadas que tienen eliminados y/o interrumpidos los genes que codifican para las siete proteasas mayoritarias de este microorganismo, disminuyendo en forma significativa su actividad proteolítica con respecto a su cepa progenitora (Ye et al., 1996).

B. subtilis se ha clasificado históricamente como un microorganismo aerobio estricto. Sin embargo, crece en condiciones anaeróbicas utilizando nitratos, nitritos o NH_4 como último aceptor de electrones (Cruz-Ramos et al., 2000; Espinosa de los Monteros et al., 2001) o por fermentación (Nakano et al., 1997; Ye et al., 2000; Cruz-Ramos et al., 2000; Romero-García et al., 2007).

Este microorganismo merece destacarse porque ha sido usado extensivamente en la industria alimentaria por ser considerado un microorganismo GRAS (por sus siglas en inglés GRAS: generally recognized as safe by the FDA) y a su alta capacidad de

secreción de enzimas nativas, las cuales tienen uso industrial (Westers et al., 2004, Schallmey et al.; 2004).

El genoma de *B. subtilis* se secuenció en 1997, teniendo una composición de GC del 43% lo cual ha facilitado el desarrollo y uso de herramientas moleculares (Kunts et al., 1997). Recientemente, *B. subtilis* ha sido modificado mediante la IVM para la síntesis de riboflavina, ribosa, PHAs, L-lactato y etanol (Bacher et al., 2001; Wulf and Vandamme et al., 1997, Romero-García et al., 2007; 2009; Singh et al., 2009).

3.2 Vía biosintética de los compuestos aromáticos en *B. subtilis*.

Los productos aromáticos tienen un uso extenso en la industria química, entre los cuales se incluyen compuestos farmacéuticos, solventes, pigmentos y suplementos alimenticios (L-fenilalanina, L-triptófano, L-tirosina, vainilla, ácido adípico, catecol, etc.¹). La mayoría de los compuestos aromáticos son sintetizados a partir del benceno (derivado del petróleo), identificado como causa de varios tipos de cáncer. Con la finalidad de encontrar alternativas sustentables para la producción de compuestos aromáticos, se han realizado trabajos encaminados a modificar racionalmente a microorganismos que poseen la vía común de síntesis de compuestos aromáticos o vía del shiquimato (SHIK).

La vía del SHIK (Figura 1), inicia con la reacción de condensación del fosfoenolpiruvato (PEP) con eritrosa-4-fosfato (E4P), para generar el intermediario aromático DAHP, en una reacción catalizada por la enzima DAHP sintasa (Figura 1). Después de una serie de reacciones enzimáticas, se forma el corismato, a partir del cual se inician las vías terminales de síntesis de cada uno de los aminoácidos aromáticos; el

¹ Catecol: materia prima para la producción de ácido adípico. Ácido adípico: materia prima del nylon 6,6. L-fenilalanina: materia prima del edulcorante *Aspartame*. L-triptófano: materia prima de aditivos de alimentos de animales, pastillas antidepresivas. L-tirosina: se usa como materia para la síntesis de L-DOPA, medicamento contra el Parkinson.

aminoácido L-triptofano (L-Trp) se deriva de una serie de 5 reacciones que tienen como sustrato inicial el corismato, mientras que los aminoácidos L- fenilalanina (L-Phe) y L-tirosina (L-Tyr) se derivan a partir del intermediario prefenato (PPA), sintetizado por la enzima corismato mutasa (AroH) a partir de corismato (Figura 1).

En *B. subtilis* existe una enzima DAHP sintasa codificada por el gen *aroA*. Ésta es inhibida por prefenato (PPA) (Figura 1). Otras enzimas que son inhibidas por prefenato son la corismato mutasa (Aro H), que cataliza la conversión de corismato a prefenato y la siquimato cinasa (Aro I). En cepas de *B. subtilis* se pueden encontrar dos actividades de la corismato mutasa, una como corismato mutasa monofuncional (AroH) y la otra como bifuncional, formando un complejo con la DAHP sintasa (*aroA* (G)). De esta forma, el prefenato regula la entrada de metabolitos en la vía común de síntesis de compuestos aromáticos (Henner D and Yanofsky C., 1993).

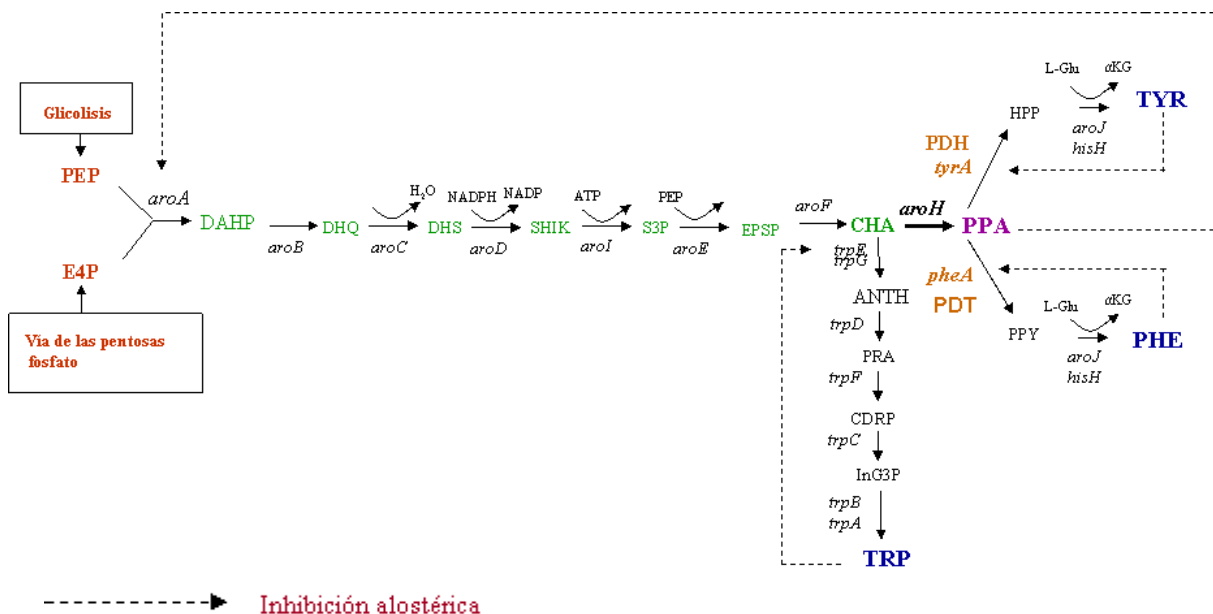


Figura 1. Vía de síntesis de compuestos aromáticos en *B. subtilis*. PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritosa-4-fosfato; DAHP, 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosa-7-fosfato; DHQ, 3-dehidrosiquimato; DHS, 3-dehidrosiquimato; SHIK, siquimato; S3P, siquimato-3-fosfato; EPSP, enolpiruvilsiquimato-3-fosfato; CHA, corismato; PPA, prefenato; PPY, fenilpiruvato; HPP, 4-hidroxifenilpiruvato; PHE, fenilalanina; TYR, tirosina; ANTH, antranilato; PRA, 5-fosforibosil-antranilato; CDRP, 1-o-carboxifenilamino-1-deoxyribulosa-5-fosfato; InG3P, indol-3-glicerol fosfato; INDOLE, indol; TRP, triptofano.

3.3 Estrategias de la ingeniería de vías metabólicas para aumentar la producción de los compuestos aromáticos en *E. coli* y *B. subtilis*.

Existen numerosos trabajos sobre el estudio del metabolismo central del carbono en *E. coli* enfocados a la producción de compuestos aromáticos. En este contexto, mediante la manipulación del metabolismo central y usando herramientas de la ingeniería de vías metabólicas (IVM) sobre reacciones alrededor del nodo de PEP y de la vía de las pentosas fosfato se ha logrado aumentar la disponibilidad de los precursores PEP y E4P que alimentan la vía de síntesis de compuestos aromáticos (Figura 1). Se ha identificado que la disponibilidad de PEP ejerce un papel importante sobre el rendimiento de compuestos aromáticos a partir de glucosa como fuente de carbono (Patnaik and Liao, 1994). Estudios realizados por Flores y colaboradores en el año 2002, muestran que la distribución del flujo de carbono en el nodo de PEP para *E. coli* depende principalmente del sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS), el cual consume un 50% del PEP disponible. Considerando éste y otros estudios, se han reportado varias estrategias en *E. coli* para aumentar la disponibilidad de PEP, que incluyen la inactivación de enzimas que utilizan al PEP como sustrato por ejemplo: la inactivación del sistema de fosfotransferasa PTS, de las piruvato cinasas codificadas por los genes *pykA*, *pykF* y de la enzima PEP carboxilasa codificada por el gen *ppc* (Ponce et al., 1995; Flores et al., 1996; Gosset et al., 1996; Baez-Viveros et al., 2001; Miller et al., 1987). La sobreexpresión del gen *pps*, que codifica la enzima PEP sintasa, también ha dado como resultado un incremento en la producción de compuestos aromáticos (Patnaik and Liao, 1994).

La disponibilidad de E4P se ha incrementado sobreexpresando los genes *tktA* y *talB*, que codifican para las enzimas transcetolasa y transaldolasa respectivamente, estas

enzimas participan en la vía de las pentosas fosfato (Draths et al., 1992; Lu y Liao., 1997).

Nuestro grupo de investigación dirigido por los Dres. Francisco Bolívar y Guillermo Gosset por varios años se ha enfocado en el estudio de la fisiología microbiana de *E. coli* y la aplicación del conocimiento generado al desarrollo de nuevas y mejores tecnologías biológicas. Sin embargo, pensamos que existe la necesidad de estudios similares en otros microorganismos que son importantes por su uso industrial y por interés académico. Por esta razón, en este trabajo, proponemos que la bacteria *B. subtilis* podría resultar de gran interés. Sin embargo, su potencial como productor de compuestos aromáticos se encuentra poco explorado, existe relativamente poca información acerca de los efectos en el metabolismo central de modificaciones al nodo de PEP.

Zhu y colaboradores (2005) incrementaron el rendimiento del ácido fólico (vitamina B1) en *B. subtilis* mediante la inducción controlada con IPTG de la enzima piruvato cinasa (PykA), la sobre expresión del operón de folato y la sobreexpresión del gen *aroH* de *E. coli*, la cual codifica la DAHP sintasa. Sin embargo, actualmente no se ha estudiado el efecto de la inactivación el sistema PTS sobre la producción de compuestos aromáticos en esta bacteria.

3.4 Sistema de fosfotransferasa PTS en *B. subtilis*.

Entre los sistemas de transporte y fosforilación de carbohidratos que han sido descritos en numerososo géneros bacterianos, el mejor estudiado es el sistema de transporte de fosfotransferasa PTS (sugar phosphotransferase system) dependiente de PEP. Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica transcripcional en diversas bacterias Gram

positivas y Gram negativas, entre las que destacan la activación de proteínas inductoras de operones catabólicos, el metabolismo del nitrógeno, la quimiotaxis, la respuesta a estrés y la patogenicidad (Stülke and Hillen, 1998; Nothaft et al., 2003).

El sistema PTS está formado por dos componentes generales: (a) enzima (EI) y la proteína estable al calor HPr y (b) varios tipos de enzimas II específicos para diferentes azúcares (EII). Los genes que codifican las enzimas EI y HPr son *ptsI* y *ptsH*, respectivamente; en *B. subtilis*, estos genes están organizados como el operón *ptsHI* (Gonzy-Tréboul et al., 1989). La expresión de este operón es constitutiva, esta condición refleja dos circunstancias: la necesidad de este sistema multi-enzimático para la utilización de una amplia variedad de azúcares, y la intervención de las enzimas en varios procesos de regulación (Gonzy-Tréboul et al., 1989; Stülke et al., 1997; Stülke & Hillen, 1998). Las enzimas EII, están formadas por 3 o 4 dominios (IIA-IIB-IIC-IID), los cuales pueden estar separados en péptidos o formar una sola proteína (Potsma et al., 1993). El transporte de azúcar, se lleva a cabo por el componente IIC o IID si está presente, éste actúa como permeasa de membrana. El grupo fosfato es transferido de PEP hacia el azúcar entrantes vía EI, HPr, EIIA y EIIB. Aproximadamente 15 carbohidratos diferentes son transportados por este sistema en *B. subtilis* (Reizer et al., 1999). El gen que codifica para la permeasa específica de glucosa es *ptsG* (EII^{Glc}). La proteína EII^{Glc} está formada por tres dominios y forma un solo polipéptido (EIIABC) (Sutrina et al., 1990; Gonzy-Tréboul et al., 1991). Mutantes de *E. coli* y *B. subtilis* que carecen del sistema PTS, tienen un crecimiento muy deficiente en glucosa debido a una capacidad muy limitada para transportarla (fenotipo PTS⁻ glucosa⁻) (Flores et al., 1996; Reizer et al., 1999).

3.5 Piruvato cinasa en *B. subtilis*.

A diferencia de *E. coli*, *B. subtilis* posee solo una enzima con actividad de piruvato cinasa (PykA) codificada por el gen *pykA* (Figura 2, Figura 9). Se ha reportado la generación y caracterización de una cepa que carece de esta actividad (PykA⁻) (Fry et al., 2000). Esta cepa mostró una reducción en la tasa de crecimiento y de producción de acetato al compararse con su cepa silvestre. Este efecto también se ha observado en una cepa de *E. coli* que carece de las dos isoenzimas de piruvato cinasa (PykAF⁻) (Ponce et al., 1995). Por otro lado, en la cepa PykA⁻ de *B. subtilis* se detectó un nivel intracelular de PEP correspondiente a 1.30 mM, en tanto que en una cepa PykAF⁻ de *E. coli*, el nivel de PEP intracelular es menor a 0.02 mM [Zhu et al., 2001]. Este resultado es relevante desde el contexto biotecnológico, ya que el PEP es un precursor para la síntesis de varios metabolitos, incluyendo los compuestos aromáticos.

3.6 Reacción anaplerótica de formación de oxaloacetato en *B. subtilis*.

Una diferencia a nivel del nodo PEP entre *E. coli* y *B. subtilis* se encuentra en la reacción anaplerótica que da lugar a la formación de oxaloacetato (Figura 2). En *E. coli*, la enzima PEP carboxilasa (PPC) cataliza la condensación de PEP y CO₂ para formar oxaloacetato. En cambio, en *B. subtilis*, la enzima piruvato carboxilasa (PYC) condensa piruvato y CO₂ en oxaloacetato, en una reacción que requiere ATP (Figura 2). Debido a estas diferencias en el metabolismo central entre *E. coli* y *B. subtilis*, es posible esperar distintas respuestas en la distribución de flujos de carbono al modificar reacciones del nodo PEP.

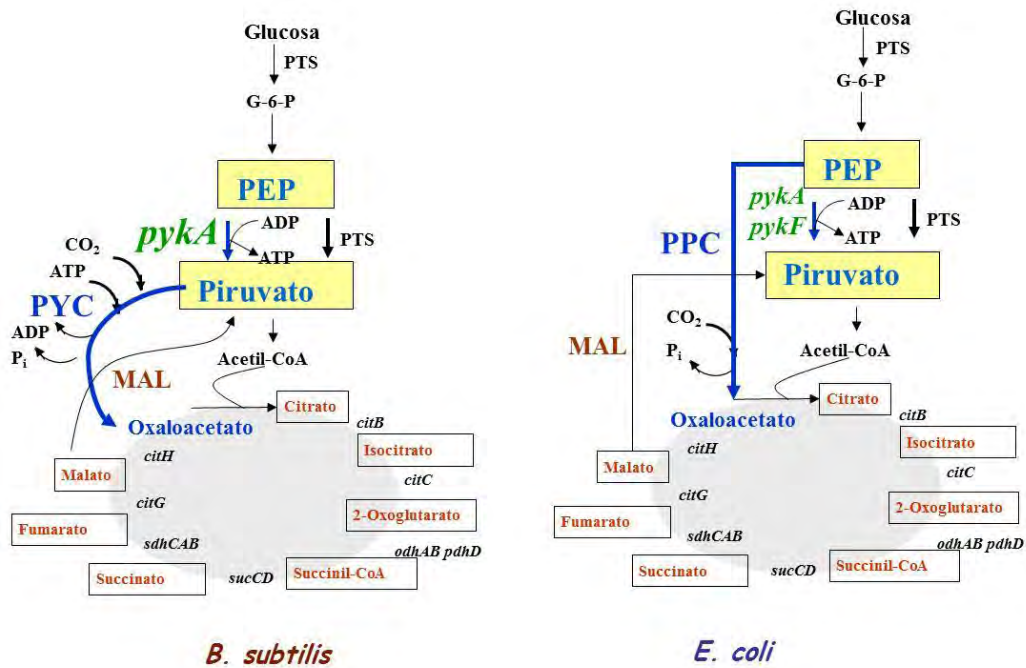


Figura 2. Formación de oxaloacetato en *E. coli* y en *B. subtilis*.

3.7 Mecanismo global de la represión catabólica por carbono (RCC) en *B. subtilis*.

En las bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC en su genoma, el mecanismo de RCC está íntimamente ligada a proteínas del sistema PTS. Específicamente en *B. subtilis* y *B. megaterium*, la mayoría de las señales de la RCC son dependientes de la proteína HPr, la enzimas HPr cinasa/fosfatasa (HPr-K/P) y de la enzima de control catabólico (CcpA). Ellas son las encargadas de detectar el estado fisiológico de la célula y regular el consumo de carbono (Stülke and Hillen, 1999).

La proteína HPr de bacterias Gram positivas tiene dos sitios de fosforilación: un sitio amino-acídico His-15 de HPr es fosforilado por la enzima EI dependiente de PEP, mientras que el sitio amino-acídico Ser-46 de HPr es fosforilada por la enzima reguladora HPr cinasa dependiente de ATP (Galnier et al., 1998; Reizer et al., 1998). Mientras que, la fosforilación en His-15 está involucrada en el transporte y regulación de los azúcares, la fosforilación en Ser-46 participa exclusivamente en procesos reguladores. La fosforilación de HPr en Ser-46 inhibe la fosforilación dependiente de EI

aproximadamente 600 veces, por lo tanto reduce la actividad de PTS (Deutscher et al., 1984). La enzima HPr cinasa, es codificada por el gen *hprK*. Esta enzima es bifuncional, ya que muestra actividades de cinasa y fosfata (Kravanja et al., 1999). Algunos intermediarios glucolíticos como fructosa-1,6-bifosfato (FBF) y glicerato-2-fosfato estimulan la actividad cinasa. Mientras que, el fosfato inorgánico, inhibe la actividad cinasa y estimula la actividad fosfatasa (Galinier et al., 1998; Kravanja et al., 1999; Reizer et al., 1998).

Se ha reportado la presencia de una proteína homóloga a HPr, denominada Crh. Esta proteína muestra un 45% de homología en su secuencia con HPr y ambas son fosforiladas de manera eficiente por la HPr-K/P. Sin embargo, las contribuciones de Crh a la RCC difiere a la de HPr (Schumacher et al., 2006).

CcpA (carbon catabolite control protein A; Henkin et al 1991; Hueck et al., 1995) es el principal componente en la RCC en *B. subtilis* y otras bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC (Henkin, 1996; Stülke and Hillen, 1999, Warner and Lolkema 2003). CcpA pertenece a la familia de proteínas reguladoras transcripcionales LacI/GalR (Weickert and Adhya, 1992).

La interacción de HPr(Ser-P) con CcpA permite que este complejo se una a regiones del DNA denominadas sitios *cre* (elementos de respuesta de catabolito; estos sitios se caracterizan por ser secuencias de 14 pb con simetría de díada y la mayoría de ellos están flanqueados por regiones ricas en secuencias AT) (Weickert and Chambliss, 1990; Kim and Chamblis, 1997). Los sitios *cre* están presentes en una o varias copias en los operones catabólicos y en diferentes posiciones con respecto al promotor. Generalmente CcpA reprime genes cuando en éstos el sitio *cre* está localizado río abajo o sobrelapa la región del promotor de los genes estructurales (Miwa et al., 1997). Se ha reportado que aproximadamente 400 genes están sujetos a una regulación dependiente de CcpA. Éste

número de genes corresponde aproximadamente al 10% del número total de genes de *B. subtilis*; siendo la mayoría de estos genes reprimidos por CcpA, y que corresponden a genes que codifican proteínas relacionadas con la utilización de fuentes de carbono secundarias (Blencke et al., 2003; Moreno et al., 2001; Yoshida et al., 2001).

En ciertos casos, los sitios *cre* se localizan río arriba con respecto a la región promotora. En tales casos las unidades de transcripción están sujetas a una activación por parte de CcpA. En la presencia de glucosa, los genes *pta*, *ackA* y *alsSD* involucrados en el sobreflujo del metabolismo son inducidos de manera dependiente por CcpA a través del sitio *cre* (Lorca et al., 2005). Interesantemente algunos genes que carecen del sitio *cre* son regulados de manera indirecta por CcpA. Por ejemplo, la expresión del operon *gapA*. El operon *gapA* incluye los genes glucolíticos *gapA*, *pgk*, *tpi*, *pgm* y *eno*.

4. HIPÓTESIS

El compuesto PEP es un precursor para la síntesis de compuestos aromáticos.

Se espera que en *B. subtilis*, la eliminación de las reacciones relacionadas con la utilización del PEP como sustrato tales como las actividades de la enzima piruvato cinasa y del sistema de fosfotransferasa PTS, promoverá una mayor disponibilidad del PEP, el cual podrá ser canalizado hacia la síntesis de compuestos aromáticos. Además, mediante un cultivo lote con glucosa, a partir de cepas de *B. subtilis* que carecen de piruvato cinasa y del sistema de fosfotransferasa PTS será posible obtener mutantes que muestren una mayor velocidad de crecimiento como resultado de un proceso de evolución adaptativa.

5. OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES

Objetivo general

Estudiar el efecto de la inactivación de la enzima piruvato cinasa y del sistema PTS sobre la fisiología de *B. subtilis*, la capacidad de síntesis de compuestos aromáticos y el patrón transcripcional de genes del metabolismo central. Además la caracterización fisiológica de cepas evolucionadas de *B. subtilis* que presenten una velocidad de crecimiento mayor que las cepas parentales PykA⁻ y PTS⁻.

Objetivos particulares

1. Generar mutantes de *B. subtilis* con alteraciones en las actividades relacionadas al nodo de PEP (*pykA⁻*, *ptsG⁻* y *ptsGHT*).

2. Caracterizar las mutantes de *B. subtilis* en medio mineral con glucosa como fuente de carbono, mediante el cálculo de las velocidades específicas de crecimiento (μ) y de consumo de glucosa (q_{Glc}); producción de ácidos orgánicos, así como la velocidad inicial de transporte de glucosa- ^{14}C (σ_{Glc}).

3. Determinar el efecto de las modificaciones en el nodo de PEP sobre la capacidad de síntesis de compuestos aromáticos. Establecer en las mutantes AroB⁻ de *B. subtilis* en medio mineral, los siguientes parámetros cinéticos: q_{Glc} , rendimiento del compuesto aromático DAHP a partir de glucosa ($Y_{DAHP/Glc}$) y productividad específica de DAHP (q_{DAHP}).

4. Analizar por RT-qPCR el patrón de expresión de 76 genes del metabolismo central de carbono en las mutantes bajo las condiciones ya descritas.

5. Generar mediante un cultivo lote con glucosa, a partir de cepas de *B. subtilis* que carecen de piruvato cinasa y del sistema de fosfotransferasa PTS, cepas derivadas que muestren una mayor velocidad de crecimiento con respecto a las cepas parentales como resultado de un proceso de evolución adaptativa.

6. MATERIALES Y METODOLOGÍA

6.1 Oligonucleotidos utilizados y plásmidos/cepas construidos en este trabajo.

Tabla 1. Oligonucleotidos utilizados para la inactivación de los genes *pykA*, *ptsG*, *ptsGHI*, *aroB* y *glcP*; y para los estudios de RT-qPCR de *B. subtilis*. Las letras subrayadas y marcadas en negro intenso indican sitios de restricción.

Nombre	Secuencia (5'-3') y sitio de restricción	Uso
ON1	GGCAAGAACGTTG GAA TTTC	Generación de la mutante PykA ⁻
ON2	CGAGGGCA AAGCTT TCTGG	Generación de la mutante PykA ⁻
ON3	CACTATATCCTGAG GAGCTC CAAATTGCC	Generación de la mutante PtsG ⁻
ON4	GATTTTTTCGAGCTCTTCTTTTG	Generación de la mutante PtsG ⁻
ON5	CAGCCGGA AGGATCC CAACTGGAAG	Generación de la mutante PtsGHI ⁻
ON6	GGCAAGAACAC GGATCC GCAAATTGTC	Generación de la mutante PtsGHI ⁻
ON7	CAATGCCCCATG AAAGCTT GTTGCAAACG	Generación de la mutante PtsGHI ⁻
ON8	CGCAGTCGTTGAACAATTC	Generación de la mutante AroB ⁻
ON9	AGCAACTACAGTTGAACGGG	Generación de la mutante AroB ⁻
ON10	CCGGGTACCTCATATAGGGGTGTAATG	Generación de la mutante GlcP ⁻
ON11	GAAGAAATTGAAGGGAAGCTTCTCTAGC	Generación de la mutante GlcP ⁻
	<i>1. Transporte y fosforilación de glucosa</i>	
glcTBsa	AAAAAGCGGGACTCTGCCTT	Experimento de RT- qPCR
glcTBsb	GTGCTGATTGACCTCGGACA	Experimento de RT- qPCR
ptsGBsa	CTGGAAGTCGGCAACAACATT	Experimento de RT- qPCR
ptsGBsb	TCAGGTCTAGGCTTGCGTCC	Experimento de RT- qPCR
ptsHBsa	AGCAAATACGACGCTGACGTTA	Experimento de RT- qPCR
ptsHBsb	TCAGCGCCTTTAGCGATACC	Experimento de RT- qPCR
ptsIBsa	GGAAATGGGTTGGCATGTG	Experimento de RT- qPCR
ptsIBsb	GACGTTGCGCTCATTGAGAAC	Experimento de RT- qPCR
glcPBsa	CAGGCACATTAGAAACGACAGTTG	Experimento de RT- qPCR
glcPBsb	AGCGCCTAATCCAAAGAGAACTT	Experimento de RT- qPCR
glcUBsa	TCACTTGGACAGGCCAAC	Experimento de RT- qPCR
glcUBsb	AACAGCGAGGTGGAAACGAG	Experimento de RT- qPCR
yurMBsa	GGTCAGTCTTGTGCCGCTTT	Experimento de RT- qPCR
yurMBsb	TGAATGGGATCCGATAAGCC	Experimento de RT- qPCR
yurNBsa	TCTTTTGGCCGTTGTCTATCT	Experimento de RT- qPCR
yurNBsb	GATGGCCTGAAGCAGCTGAT	Experimento de RT- qPCR
	<i>2. Glucolisis</i>	
glcKBsa	AATTGTCAGCGCGAGATGTG	Experimento de RT- qPCR
glcKBsb	TCCGAGCACCAAACCAAGAT	Experimento de RT- qPCR
pgiBsa	GCGGATAACGATCTTGACGG	Experimento de RT- qPCR
pgiBsb	CCGTCTGTATGGGCAAGCAT	Experimento de RT- qPCR
pfkABsa	TATCGGTGGAGACGGTTCCT	Experimento de RT- qPCR
pfkABsb	TGCCCGGAATGTCATTATCA	Experimento de RT- qPCR
fbaABsa	TGCGATTCACTTAGACCACGG	Experimento de RT- qPCR
fbaABsb	CAAATGGATGGTGAGAAGCGT	Experimento de RT- qPCR
gapABsa	CCTTGGCTACAGCGAAGAGC	Experimento de RT- qPCR
gapABsb	TGCTGCCTTCCATAACCATTG	Experimento de RT- qPCR
tpiABsa	CTACTGCGTCATCGGCCACT	Experimento de RT- qPCR
tpiABsb	GCACAATGCCGTGTTTAAAA	Experimento de RT- qPCR
pgkBsa	CAAAGTTGTATTCTGCCGCG	Experimento de RT- qPCR
pgkBsb	GGTGTGTTGATTGTTGGAAGCG	Experimento de RT- qPCR
pgmBsa	TCCGGAATGGTTGAACCAAC	Experimento de RT- qPCR
pgmBsb	ATGATAGCGTGTCCGCCTTT	Experimento de RT- qPCR
enoBsa	TGGCGTATCTATGGCTTGTGC	Experimento de RT- qPCR
enoBsb	TCGGTACAGGAAGCGTTTTTG	Experimento de RT- qPCR
cgRBsa	ATCCGGAGACAGCGATCAAT	Experimento de RT- qPCR
cggRBsb	CAGCGACGATATTTTTGCCCTG	Experimento de RT- qPCR
pykABsa	CGTTCTACG GATGTGCTCGA	Experimento de RT- qPCR
pykABsb	TTGTCAACGCCCTCTTGTT	Experimento de RT- qPCR

	<i>3. Gluconeogenesis and vías anapleróticas</i>	
pckABsa	AATGTCGGTGAAAAAGGCGC	Experimento de RT- qPCR
pckABsb	TCGTCACCGATCAGCTTGC	Experimento de RT- qPCR
gapBBsa	CAACGGGTTTGGAGAATCG	Experimento de RT- qPCR
gapBBsb	GCGTTTCTGCGGAATAGCTG	Experimento de RT- qPCR
fbpBsa	AGGATAAACCGTATGCGGGC	Experimento de RT- qPCR
fbpBsb	ATCTGTCGCCAGGTCATCG	Experimento de RT- qPCR
pycABsa	ATTTCGAACTCAACGGGCAG	Experimento de RT- qPCR
pycABsb	GCTTGGATTTGTCCGGTCTG	Experimento de RT- qPCR
ywkABsa	CTGGGAAGACCTTGCAACA	Experimento de RT- qPCR
ywkABsb	TAATCGCGCCAGTACCTTGA	Experimento de RT- qPCR
malSBsa	GTATCATATCGGGCAGGCAAA	Experimento de RT- qPCR
malSBsb	CTTCAAACATGCCGTCGGTA	Experimento de RT- qPCR
ytsJBsa	TGAAGAGCGCCTCAAAAAGA	Experimento de RT- qPCR
ytsJBsb	GTTTCAGCGCGTTCACAAGA	Experimento de RT- qPCR
mleABsa	GAAGTGATCGCGGCTGTACA	Experimento de RT- qPCR
mleABsb	TTCATTTGGATTTTCCGCC	Experimento de RT- qPCR
ppsBsa	GACGTGCGAGATGTGATTG	Experimento de RT- qPCR
ppsBsb	CCGCCATCAAACCTAGCCAG	Experimento de RT- qPCR
	<i>4. Genes de fermentación, producción de acetato y acetoina. Utilización de acetato.</i>	Experimento de RT- qPCR
ldhABsa	AAAACCTGGTGAGACACGCC	Experimento de RT- qPCR
ldhABsb	AGAAAATGCCAAATCCG	Experimento de RT- qPCR
ackABsa	CCGGCAAATATCGTTGGAAT	Experimento de RT- qPCR
ackABsb	TGCTCAGGCATTGTTGGTG	Experimento de RT- qPCR
ptaBsa	AAGCGGAGCTGCTCACTCAA	Experimento de RT- qPCR
ptaBsb	CCATGATGAACACGCCTGAA	Experimento de RT- qPCR
alsSBsa	TGGAGCAAGGTGTCACACATG	Experimento de RT- qPCR
alsSBsb	CCGGGCAACGATAATTTCAG	Experimento de RT- qPCR
alsDBsa	CAATTCAGGCGGACAGTTC	Experimento de RT- qPCR
alsDBsb	AATCCGCTGTGTTCCGGAAGT	Experimento de RT- qPCR
acsABsa	GAGCCGCTAAATCCGGAAGT	Experimento de RT- qPCR
acsABsb	CAGATGAGCTGACTGCCCGT	Experimento de RT- qPCR
	<i>5. Ciclo de TCA</i>	Experimento de RT- qPCR
pdhABsa	CTAATGCGCCGCATGGTATT	Experimento de RT- qPCR
pdhABsb	TCTTGACCCGAGTAGGAGC	Experimento de RT- qPCR
pdhBBa	ATGCGTTACGCACAGAACTGA	Experimento de RT- qPCR
pdhBBb	TTGCAATCCTTCTGTGCGAC	Experimento de RT- qPCR
pdhCBa	AGGCTTGCTTGTACCGGTTG	Experimento de RT- qPCR
pdhCBb	GCTTGCCTTACGAGCTTTT	Experimento de RT- qPCR
pdhDBsa	GTAGGACGCCGTCCAAACAC	Experimento de RT- qPCR
pdhDBsb	TTTGTGCGGCACTGTTTGTC	Experimento de RT- qPCR
citABsa	AGCAGAAGCGATTTCGTTTGC	Experimento de RT- qPCR
citABsb	CAAAATCGATGGCCCTCATC	Experimento de RT- qPCR
citZBsa	GGTCTGCGTCGCAACACTTT	Experimento de RT- qPCR
citZBsb	TCATAACGCCTTCATTCGCTC	Experimento de RT- qPCR
citBBsa	CATCAAACCCATACGTGCTGA	Experimento de RT- qPCR
citBBsb	CGGTGCAAGTGACGTTTTCA	Experimento de RT- qPCR
citCBsa	GGCGGTATCCGTTCTTTGAA	Experimento de RT- qPCR
citCBsb	TTTACCGGTGACGGCACTC	Experimento de RT- qPCR
odhABsa	AGCCCGCATTACCGTTAGC	Experimento de RT- qPCR
odhABsb	GCTTTGTGTTGCGGTTTCCT	Experimento de RT- qPCR
odhBBsa	AAAGTTCTGCCCTGCTCCT	Experimento de RT- qPCR
odhBBsb	TGCTTCCTCGCTCACCTCTT	Experimento de RT- qPCR
sucCBsa	GACTGCTCAATCGCCGAAAT	Experimento de RT- qPCR
sucCBsb	CGGTACAACGCATTGCTGTC	Experimento de RT- qPCR
sucDBsa	AGTTCAAACAACCGGCGCTA	Experimento de RT- qPCR
sucDBsb	TCACGAGATCAAGCTCCGC	Experimento de RT- qPCR
sdhABsa	CCTGAAGGCCTGCTTGATTT	Experimento de RT- qPCR
sdhABsb	TCCAGTGCGTAAAGCAGCTG	Experimento de RT- qPCR
sdhBBsa	AAAACCCCGCCAGTCTTGTA	Experimento de RT- qPCR
sdhBBsb	CAACCTGCAAATCACGAACG	Experimento de RT- qPCR
sdhCBsa	TCCGGCTATGCTTGGTTTTT	Experimento de RT- qPCR

sdhCBb	TTACCGTGATGCCCCATGTA	Experimento de RT- qPCR
citGBsa	ATGCGTGTTGTGAAGGCGT	Experimento de RT- qPCR
citGBsb	GCTGCAATCGCTTCTGCTTT	Experimento de RT- qPCR
citHBsa	TAATCGGCCAGTCAGGTGTG	Experimento de RT- qPCR
citHBsb	GCCGAGTACGAAACCAGTCAC	Experimento de RT- qPCR
	<i>6. Vía de pentosas fosfato.</i>	
zwfBsa	AAATCCGCGAAGCATTACG	Experimento de RT- qPCR
zwfBsb	CGCATTGGCAAATCGAATC	Experimento de RT- qPCR
tkfBsa	CAATGGCATAACGCTGTGG	Experimento de RT- qPCR
tkfBsb	TGACCCGTGTCCAGCAGATA	Experimento de RT- qPCR
yqiBsa	AAACAGCAAACCGCTTGTT	Experimento de RT- qPCR
yqiBsb	AAGCGGAACGCCTAAGTCAA	Experimento de RT- qPCR
ywjHBsa	TTGACATTCACGGCCTTGAC	Experimento de RT- qPCR
ywjHBsb	CATTGTGCCGATA TGAGCCC	Experimento de RT- qPCR
rpeBsa	CTGATTTTGCCGCTTTAGGC	Experimento de RT- qPCR
rpeBsb	GATATTCGGGCAAAAATGGCC	Experimento de RT- qPCR
ywlFBsa	CACAAACATCCTTGCATGG	Experimento de RT- qPCR
ywlFBsb	GGTGTCTTCCCCGGTAAAC	Experimento de RT- qPCR
tkfBsa	CAATGGCATAACGCTGTGG	Experimento de RT- qPCR
tkfBsb	TGACCCGTGTCCAGCAGATA	Experimento de RT- qPCR
	<i>7. Vía de síntesis de compuestos aromáticos</i>	
aroABsa	GGTGGAGCCTTTAAGCCTCG	Experimento de RT- qPCR
aroABsb	GCCAGATCAAATTCATCCGC	Experimento de RT- qPCR
	<i>8. Utilización de Xilosa</i>	
xylABsa	TTGAAGCCAATCATGCCACA	Experimento de RT- qPCR
xylABsb	ACCCTGGTTTGCCTCAACCG	Experimento de RT- qPCR
xylBBsa	TTTATACGATGGGCGTCAG	Experimento de RT- qPCR
xylBBsb	CACCCCTGCAATAATTGCT	Experimento de RT- qPCR
xylRBsa	GGCAGGATACTCCGTTGAA	Experimento de RT- qPCR
xylRBsb	CCAAATGGCGGTATTGATCAA	Experimento de RT- qPCR
	<i>9. Metabolismo de Nitrogeno</i>	
gltABsa	AAAGGACATGTTACACAGGCA	Experimento de RT- qPCR
gltABsb	GCGGAATTGGTGTCAAGTCGT	Experimento de RT- qPCR
gltBBsa	AAGAAGCATCGAAACGGCAA	Experimento de RT- qPCR
gltBBsb	AATCGGACAGCCGGATGTAA	Experimento de RT- qPCR
tnrABsa	CGAAAGCTCATTTACCCGCA	Experimento de RT- qPCR
tnrABsb	CCGTCTTACGCTTATTGGC	Experimento de RT- qPCR
	<i>10. Reguladores</i>	
ccpABsa	CGTTCTCCAGTGCCGATTGT	Experimento de RT- qPCR
ccpABsb	TTCACGGCATCATAAATCGC	Experimento de RT- qPCR
ccpCBsa	GCCGGTGAGAAAATCATTACAG	Experimento de RT- qPCR
ccpCBsb	AATGTGCCGTGAATTTACCT	Experimento de RT- qPCR
hprkBsa	AATACGACCGGCTCGGACTT	Experimento de RT- qPCR
hprKBsb	GACTGCAAGATTTTCGGCCTG	Experimento de RT- qPCR
crhBsa	TAAACGCCAAAAGCATCATGG	Experimento de RT- qPCR
crhBsb	CTCCAGCGCCTCTTGTTTCAT	Experimento de RT- qPCR
clpPBsa	TTGCGAACTCCATCGTGTCA	Experimento de RT- qPCR
clpPBsb	GGCTGTAATAGAGCCGCC	Experimento de RT- qPCR
codYBsa	GCGCAACAGTTGTCGGAAT	Experimento de RT- qPCR
codYBsb	AAGCGAGCTGATAGCCATTTG	Experimento de RT- qPCR
resDBsa	GTTCAGCCCGAGAGAAGTCG	Experimento de RT- qPCR
resDBsb	CGAGCACATTTTTTCGTCGGT	Experimento de RT- qPCR
resEBsa	CGCCTGAAGCAAAAAGAGCTG	Experimento de RT- qPCR
resEBsb	CGACATCAAAAAGCACCCATG	Experimento de RT- qPCR
sigBBsa	AGTCGATCGGCTCATAAGCG	Experimento de RT- qPCR
sigBBsb	TTTTCGCAAGCATGTCAACC	Experimento de RT- qPCR
rpoABsa	TGGAAGCACTGGACCGAAAG	Experimento de RT- qPCR
rpoABsb	CAGCATGTTGAGCTTCGTACG	Experimento de RT- qPCR
atpABsa	TGACCTCGACCAAGCGACTC	Experimento de RT- qPCR
atpABsb	CTTGCTTTTCAACCGGAAGC	Experimento de RT- qPCR
comKBsa	GGTATACCGAACAGCGTGCC	Experimento de RT- qPCR
comKBsb	TCCGCTCTTCTTTCGGGTAC	Experimento de RT- qPCR
	<i>Gene de Referencia</i>	

hbsUBsa	ATCGGTTTTGGTAACTTCGAGG	Experimento de RT- qPCR
hbsUBsb	GCAGGTACTTTGCTTGCTGGA	Experimento de RT- qPCR

Tabla 2. Cepas y plásmidos usados y construidos en este trabajo.

Cepa o plásmido	Genotipo	Fuente o Referencia ^a
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Stock del laboratorio
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F'::Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacIq</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1endA1</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi hsdR17</i> (r _k - m _k ⁺) <i>glnV44relA1lac</i>	Stock del laboratorio
CVPYKSp	<i>trpC2pykA::loxPaadAloxP</i>	pU <i>pykA1</i> xPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPTSGSp	<i>trpC2ptsG::loxPaadAloxP</i>	pUCptsG1 xPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPTSGHISp	<i>trpC2ptsGHI::loxPaadAloxP</i>	pU p GHI1 xPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPYK ^b	Igual que la cepa CVPYKSp, pero libre de Sp y un sitio <i>loxP</i>	pCRM-Ts-Phleo → CVPYKSp
CVPTSG ^b	Igual que la cepa CVPTGSp, pero libre de Sp y un sitio <i>loxP</i>	pCRM-Ts-Phleo → CVPTSGSp
CVPTSGHI ^b	Igual que la cepa CVPTSGHISp, pero libre de Sp y un sitio <i>loxP</i>	pCRM-Ts-Phleo → CVPTSGHISp
168B	<i>B. subtilis</i> 168 con <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pU Bl xPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPYKB	CVPYK con <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pU Bl xPsp → CVPYK
CVPTSGB	CVPTSG con <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pUCaroBl xPsp → CVPTSG
CVPTSGHIB	CVPTSGHI con <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pUCaroBloxPsp → CVPTSGHI
Plásmido	Gene clonado	
pUC19	Plásmido de alto número de copias; 2686 pb; Ap ^r , <i>lacZ</i> ; ColE1.	Yanisch-Perron et al., 1985
ploxSpec-Walt	Plásmido con origen de replicación en <i>E. coli</i> ; 4428pb; Ap ^r ; el gen <i>aadA</i> esta flanqueado por los sitios <i>loxP</i> .	Fernando Valle (comunicación personal)
pCRM-Ts-Phleo	Plásmido con origen de replicación en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> ; 8142pb; Ap ^r ; Phleo ^r ; tienen el gen <i>cre</i> .	Fernando Valle (personal communication)
PUCpykloxPsp	pUC19 que tiene clonado el gen <i>pykA::loxPaadAloxP</i>	Este estudio
PUCptsGloxPsp	pUC19 que tiene clonado el gen <i>ptsG::loxPaadAloxP</i>	Este estudio
pUCptsGHIlloxPsp	pUC19 que tiene clonado el gen <i>ptsGHI::loxPaadAloxP</i>	Este estudio
pUCaroBloxPsp	pUC19 que tiene clonado el gen <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	Este estudio
pUCglcPloxPsp	pUC19 que tiene clonado el gen <i>glcP::loxPaadAloxP</i>	Este estudio

^a Las flechas indican, construcción por transformación. La construcción de estas cepas se desarrolló en este trabajo.

^b Las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp se transformaron con el pCRM-Ts-Phleo que tiene al gen que codifica para la enzima recombinasa CRE (Tabla 2). Esta enzima reconoce los sitios *loxP* y escinde un sitio *loxP* junto con el gen *aadA*.

6.2 Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y técnicas de ADN recombinante.

Las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* se crecieron en medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido o sólido con agar al 1.5%. (Sambrook, *et al.*, 1989) a 37° C y 300 rpm. Cuando fue necesario utilizar antibióticos para seleccionar las construcciones deseadas o asegurar la presencia de un plásmido en *E. coli* y *B. subtilis*, se utilizaron en las siguientes concentraciones: ampicilina (Ap), 200 µg/ml; espectinomicina (Sp), 100 µg/ml y fleomicina (Phleo), 10 µg/ml. La concentración de Sp fue la misma para mantener el plásmido o en la integración a cromosoma.

6.2.1 Transformación de DNA. Los procedimientos para la preparación de células competentes y transformación de *B. subtilis* se realizaron según lo descrito en Bron *et al.*, 1999. Para preparar células competentes de las cepas CVPTSGHISp se utilizó arabinosa en lugar de glucosa como fuente de carbono, ya que estas cepas no pueden utilizar eficientemente glucosa.

La Purificación de DNA cromosomal de *B. subtilis* y las mutantes se llevó a cabo con QIAGEN Mini-isolation kit (Qiagen, CA, USA) como lo describen los fabricantes.

6.2.2 Cultivos para determinar las velocidades específicas de crecimiento (μ) y de consumo de glucosa (q_{Glc}). Para determinar las μ 's y q_{Glc} , así como la concentración de ácido acético y acetoína de *B. subtilis* 168, CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp en medio mineral (MM) con glucosa como única fuente de carbono, se realizaron cultivos en matraces bafleados de 250 ml.

Para estos cultivos se siguió un protocolo de adaptación de las cepas en MM que consistió en la preparación de un cultivo denominado “preinoculo”, éste se preparó a

partir de una muestra de glicerol guardados a -7°C de *B. subtilis* y las mutantes. La muestra se sembró en 5 ml de LB para la cepa silvestre y 5 ml de LB con Sp para las mutantes. Se cultivó a 30°C y 300 rpm hasta alcanzar entre 1.0-1.5 unidades de densidad óptica a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$). Se inició un segundo cultivo en matraces de 250 ml con 50 ml de MM con glucosa 8 g/L y pánf 4 $\mu\text{g/ml}$ pánf m l pám é μ y q_{Glc} . Se realizaron los cálculos necesarios para iniciar con 0.01 unidades de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ estos cultivos a partir del inóculo. El crecimiento se evaluó en función del tiempo para determinar concentración celular (utilizando la relación de $1.0 \text{ DO}_{600\text{nm}} = 0.35 \text{ g/l}$ de células en peso seco) hasta consumir toda la fuente de carbono, se almacenó 1 ml de sobrenadante a -20°C en cada lectura de crecimiento, para cuantificar consumo de glucosa y concentración de ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante por análisis de HPLC. Estos cultivos se hicieron por duplicado de dos experimentos independientes.

6.2.3 Cultivos de células en reposo para determinar la producción de DAHP, velocidades específicas de producción de DAHP (q_{DAHP}) y el rendimiento de DAHP a partir de glucosa ($Y_{\text{DAHP/Glc}}$). Los cultivos con células en reposo consistieron en crecer a las derivadas AroB⁻ en un medio rico hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 4.0. Las células se cosecharon, se lavaron y se resuspendieron en 50 ml de medio mínimo con 8 g/L de glucosa.

6.3 Construcción de mutantes en el metabolismo central de *B. subtilis* 168.

Las mutantes se construyeron mediante la inactivación de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* de *B. subtilis* 168, respectivamente.

La estrategia para la construcción de cada mutante se basó principalmente en la sustitución alélica de los genes ya mencionados, por doble recombinación homóloga. La estrategia se dividió en 3 etapas. **Etapas 1:** Diseño y construcción de los plásmidos PUCpykloxPSp, pUCptsGloxPSp y pUCptsGHIlloxPSp (Tabla 2). Se amplificaron por PCR dos fragmentos de ADN de los genes *pykA* y *ptsG* denominados **a** y **b**, cada fragmento de aproximadamente 500-700 pb. En el caso del operón *ptsGHI*; el fragmento **a** corresponde al extremo 5' de *ptsG* y la región **b** corresponde al extremo 3' de *ptsI*. Se utilizó ADN cromosomal de *B. subtilis* 168 como templado, oligonucleotidos cuya secuencia se encuentra reportada en la Tabla 1 y la enzima elongasa. Los fragmentos amplificadas **a** y **b** se cortaron con sus respectivas enzimas de restricción y clonaron de manera correcta en el vector de expresión pUC19 cortado con las mismas enzimas de restricción (Sambrook et al., 1989). Se obtuvieron los plásmidos PUCpyk, pUCptsG y pUCptsGHI, respectivamente (datos no mostrados). Del plásmido pLoxSpec-Walt (tabla 2) se obtuvo un inserto con el gen *aadA* que codifica el casete de resistencia a espectinomicina (Sp) flanqueado por los sitios *loxP* (*loxP aadA loxP*). Este fragmento, se clonó entre las secuencias **a** y **b** de cada plásmido pUCpyk, pUCptsG y pUCptsGHI, obteniéndose los plásmidos PUCpykloxPSp, pUCptsGloxPSp y pUCptsGHIlloxPSp, respectivamente (Tabla 2). **Etapas 2:** Estos plásmidos se transformaron a células competentes naturales de *B. subtilis* 168 (Bron et al., 1999), como la base de estos plásmidos es el vector pUC19 y éste no se replica en *B. subtilis* se lleva a cabo la doble recombinación entre la secuencias **a** y **b** clonadas y el cromosoma de *B. subtilis*. Las transformantes se seleccionaron en medio de cultivo LB

suplementado con Sp 100 µg/ml. **Etapa 3:** Comprobación de la interrupción en los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* por PCR. En cada caso, se analizaron varias transformantes resistentes a Sp y se amplificó por PCR la región de interés para las mutantes utilizando, los respectivos oligonucleótidos (Tabla 1). Las mutantes obtenidas se denominaron CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp, respectivamente (Tabla 2).

6.4 Generación de cepas de *B. subtilis* que carecen de la actividad dehidroquinato sintasa.

En las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp se utilizó el sistema de recombinación sitio-específica *loxP*/Cre del fago P1 con el casete de Sp, para inactivar los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI*, respectivamente. Este sistema permite la escisión del marcador de resistencia a Sp y un sitio *loxP*, en presencia de la proteína Cre (Tabla 2). Por lo tanto, para liberar a las mutantes del casete de Sp en este trabajo, se transformó el plásmido pCRM-Ts-Phleo que tiene el gen *cre* (tabla 2) a las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp. Para expresar la proteína Cre se creció a 37 °C en LB con Pleo 10 µg/ml. Posteriormente, se eliminó el plásmido pCRM-Ts-Phleo de las mutantes incrementando la temperatura a 42 °C en LB líquido por 12 h y 48 °C en placas de LB por 24 h. Las nuevas versiones de las mutantes se denominaron CVPYK, CVPTSG y CVPTSGHI, las cuales son sensibles a Sp, mientras que, los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* están interrumpidos con un sitio *loxP*.

Para interrumpir el gen *aroB* en las mutantes CVPYK, CVPTSG y CVPTSGHI así como en la cepa silvestre *B. subtilis* 168 se utilizó nuevamente el sistema *loxP*/Cre ya que proporciona la ventaja de incorporar nuevas interrupciones con el casete de Sp utilizando el mismo sistema.

Se siguió una estrategia similar a la descrita en la sección 6.3. En este contexto, se construyó el plásmido pUCaroBSploxP que tiene secuencias homologas del gen *aroB* interrumpido por el casete de Sp y flanqueado por los sitios *loxP*. Este plásmido se transformó a células competentes de *B. subtilis* 168, CVPYK, CVPTSG y CVPTSGHI. La selección de probables mutantes fue en medio de cultivo LB con Sp. La confirmación de la interrupción en el gen *aroB* fue por PCR y por fenotipo ya que las derivadas *aroB*⁻ son auxótrofas a los compuestos aromáticos. Es decir, en MM con glucosa como fuente de carbono, las mutantes *aroB*⁻ no crecen. Sin embargo, éstas recuperan su crecimiento si el MM con glucosa se suplementa con compuestos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) así como con vitaminas aromáticas (ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido 2-3 dihidroxibenzoico). Las mutantes que se obtuvieron se denominaron 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB (Tabla 2).

6.5 Generación de cepas de *B. subtilis* que carecen del transportador GlcP.

Como primer paso para la construcción de mutantes *glcP*⁻, se escindió el casete de Sp en las cepas derivadas a través de la estrategia descrita en la sección 6.4. (Se transformó a las cepas evolucionadas con el plásmido pCRM-Ts-Phleo que tiene el gen *cre* (Tabla 2), la proteína Cre se expresó a 37°C en LB con Pleo 10 ug/ml y posteriormente se eliminó el plásmido pCRM-Ts-Phleo de las mutantes incrementando la temperatura. Las nuevas versiones de las mutantes evolucionadas son sensibles a Sp. Sin embargo, los genes *ptsGHI* continúan interrumpidos con un sitio *loxP*.

Como segundo paso se contruyó el plásmido pUCglcPloxPSp que tiene clonado el gen *glcP* interrumpido por el casete de Sp, el cual está flanqueado por los sitios *loxP* (Tabla 2). Este plásmido se transformó a células competentes evolucionadas. Las

candidatas a mutantes *glcP* se seleccionaron en placas de LB con Sp. La interrupción fue comprobada amplificando por PCR la región de interés (datos no mostrados). Las derivadas evolucionadas que tienen interrumpido el gen *glcP* se denominaron, CV842P, CV844P, CV846P, CV849P, CV854P, CV857P, CV859P, CV861P, CV863P, CV879P y 168P, respectivamente.

6.6 Condiciones de experimentos de transporte.

Se prepararon tres cultivos independientes de las cepas *B. subtilis* 168, CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp bajo las condiciones descritas en la sección 6.4. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600nm} de 1.5, las células se cosecharon y centrifugaron a $C/4000$ rpm por 15 min. Las células se lavaron dos veces con MM con triptófano 40 mg/ml y sin glucosa. Las células se resuspendieron en el mismo medio, la cepa silvestre quedó a una concentración final de 0.5 DO_{600nm} y las mutantes a 1.0 OD_{600nm} . Los ensayos de transporte con [^{14}C]-glucosa, requirieron de 540 μ l de la suspensión celular, la cual se incubó C por 3 minutos. La reacción dio inicio con la adición de 60 μ l de una mezcla de [^{14}C]-glucosa marcada (5 mCi $mmol^{-1}$) y glucosa no marcada (concentración final 0.05 mM). La reacción se mantuvo en un baño con agua

C por 10 minutos, muestras de 50 μ l se tomaron en el tiempo 0, 1, 2, 3, 5 y 10 min, cada una se filtró inmediatamente a través de filtros con membranas de nylon de 25 mm de diámetro y 0.2 mm de espesor (PGC scientific). Los filtros se lavaron 5 veces consecutivas con 1 ml de MM frío. Los filtros se secaron aproximadamente por 12 horas y se colocaron adentro de viales con 5 ml de líquido de centelleo (Ecolite). La reactividad se determinó en un contador de centelleo.

La velocidad de consumo de ^{14}C -glucosa se determinó a través de grafica lineal de ^{14}C -glucosa vs tiempo. La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976).

6.7 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el método de fenol caliente equilibrado con agua (Flores et al., 2005). Se prepararon al menos tres cultivos independientes de las cepas *B. subtilis* 168, CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp bajo las condiciones descritas en la sección 6.4, excepto que el medio de cultivo fue MM sin ácido cítrico. Cuando los cultivos alcanzaron una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1.0, se cosecharon 10 ml y se mezclaron con 500 μl de solución RNA later (Ambion Inc., Tex., USA), las células se centrifugaron a $4\text{C}/4000\text{ rpm}$ por 15 min, se resuspendieron en 1 ml de buffer I (0.3 M sacarosa, 0.1 M de acetato de sodio y 15 mg/ml de lisozima), y se incubaron a temperatura ambiente por 16 min. La mezcla se trató con 2 ml de buffer II (0.01 M de acetato de sodio, 2% de SDS) por 3 minutos. La extracción de RNA total se realizó con 2 ml de fenol caliente por 3 min y se mantuvo en hielo por 5 min. Se realizó una segunda extracción con fenol caliente y dos extracciones más con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y cloroformo, respectivamente. Después de las extracciones, el RNA se precipitó con una mezcla de acetato de sodio 3M y 1 y se centrifugó $4\text{C}/4000\text{ rpm}$ por 15 min. Se desechó el sobrenadante y el RNA se resuspendió en 300 μl de agua libre de DNAsa y RNAsa (Ambion Inc., Tex., USA) y 0.5 μl de inhibidor de RNAsa (Fermentas Life Sciences, USA). La concentración se determinó por absorbancia a 260/280 y 260/230 usando un nanodrop (Thermo Scientific). Su integridad se verificó en geles de agarosa al 1.2%. El RNA se gó - C. Muestras de RNA se trataron con DNAsa (Ambion Inc, Tex., USA). Siguiendo las instrucciones del fabricante. EL cDNA se sintetizó por el método de

síntesis de primera cadena de DNA a partir de 1 a 5 μg de RNA total, una mezcla de 10 pmol/ μl de primeros específicos de cada gen analizado descritos en la tabla 1. Usando un kit para síntesis de cDNA RevertAid TM H minus First Strand (Fermentas, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este cDNA se usó como templado para los ensayos de RT-qPCR.

6.8 PCR de tiempo real.

Los experimentos de RT-qPCR se realizaron siguiendo las sugerencias de MIQE (Minimal Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin et al., 2009). Se utilizó el 7300 Real Time PCR System con el kit SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación se realizaron como está reportado en Flores et al., 2005. El tamaño de los primeros específicos (tabla 1) fue entre 18 y 24 nucleótidos, el contenido de GC fue de 42.9 a 63.2% y el valor de la T_m fue entre 8 y 8 $^{\circ}\text{C}$. La concentración final de los primeros, en un volumen de 12 μl , fue de 0.83 μM . Se agregaron 5 ng de cDNA a cada reacción. Todos los experimentos de RT-qPCR se realizaron al menos por triplicado para cada gene de cada cepa (con diferencias menores a 0.3 SD). Se incluyó siempre un control sin templado y con la mezcla de reacción para cada gene. La técnica de cuantificación utilizada para analizar los datos fue el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por Livak and Schmittgen (2001).

En una primera normalización de los datos, se usó el gen *hbsU* (Wolfgang and Marahiel 2002) como control interno (gen de referencia) con el fin de ajustar la concentración de cDNA de las muestras. Esto debido a que se detectó un nivel de expresión similar y reproducible de este gen en todas las cepas bajo las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo (Figura 8). Los valores del nivel de expresión para

cada uno de los genes analizados de *B. subtilis* 168 fueron iguales a 1.0 y fueron usados como el control para una segunda normalización de todos los datos. Por lo tanto, los datos de RT-qPCR son reportados como niveles de expresión relativos al valor obtenido para la cepa silvestre *B. subtilis* 168 (Tabla 7).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló dentro del grupo de investigación de los Dres. Guillermo Gosset y Francisco Bolívar, quienes por varios años han estudiado y generado conocimientos sobre el metabolismo en la bacteria de *E. coli*. Con este proyecto, pretendemos ampliar el campo de conocimiento del metabolismo central de carbono, utilizando la bacteria *B. subtilis* como modelo de estudio. Nuestro objetivo principal fue comparar el efecto de la inactivación de la enzima piruvato cinasa y del sistema PTS sobre la capacidad de síntesis de compuestos aromáticos; y el patrón transcripcional de 76 genes en las mutantes generadas en este trabajo con glucosa como única fuente de carbono.

7.1 Construcción de mutantes en el metabolismo central de *B. subtilis* 168.

Se generaron mutantes relacionadas al metabolismo central de *B. subtilis* 168 (*trpC2*) (Tabla 2). Estas mutantes son deficientes en la actividad piruvato cinasa (CVPYKSp), en la proteína EII^{Glc} del sistema PTS (CVPTSGSp) y en los componentes generales del sistema PTS (EI y HPr así como EII^{Glc}) (CVPTSGHISp). Las mutantes se construyeron mediante la inactivación de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* de *B. subtilis* 168, respectivamente. Se espera que la cepa que presenta la inactivación de PykA tenga un impacto negativo sobre la generación de piruvato, mientras que la falta de uno o los tres componentes de PTS origine una disminución en la capacidad del transporte de glucosa.

La estrategia para la construcción de cada mutante se describe en la sección 6.3 y la figura 3 muestra un esquema de como quedaron interrumpidos los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* de *B. subtilis* 168 en cromosoma.

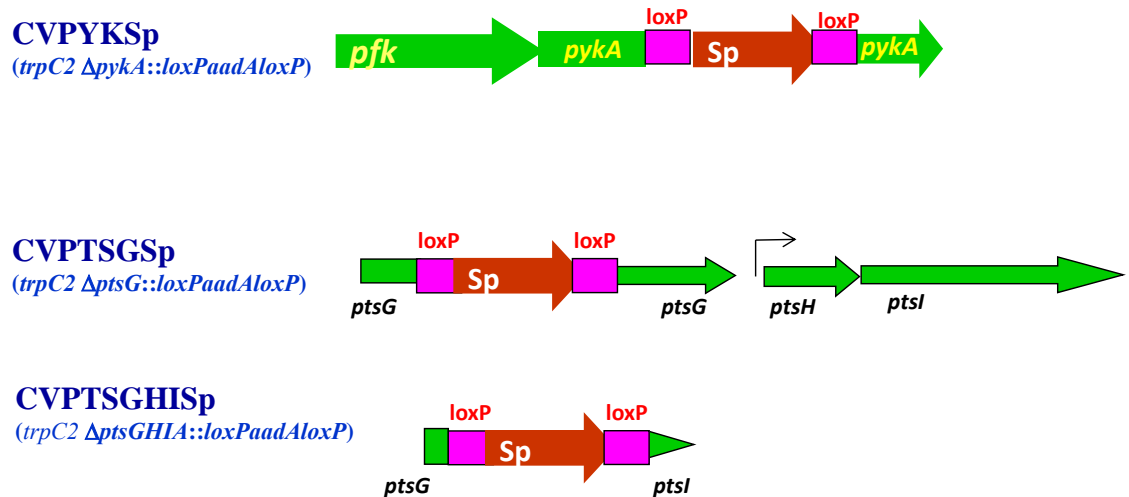


Figura 3. Esquema que muestra la interrupción de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI*, respectivamente con el casete de *Sp*, éste flanqueado por los sitios *loxP*.

7.2 Caracterización de mutantes en el metabolismo central de *B. subtilis* 168.

Se caracterizaron las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp para determinar el efecto de las mutaciones sobre: **1)** la utilización de fuentes de carbono PTS y no PTS en medio mineral (MM), **2)** la caracterización cinética en MM con glucosa como única fuente de carbono y **3)** la medición de la velocidad inicial de transporte con $^{14}\text{[C]}$ -glucosa.

7.2.1 Utilización de fuentes de carbono PTS y no PTS en medio mineral por las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp.

Para determinar la capacidad de utilización de azúcares PTS (glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) y fuentes de carbono no PTS (glicerol y arabinosa) por las mutantes CVPTSGSp, CVPTSGHISp y CVPYKSp (Tabla 3); se efectuaron experimentos en MM suplementado con 8 g/L de cada fuente de carbono. El estudio reveló que la cepa silvestre creció con todos los azúcares analizados. No obstante, con maltosa y las

fuentes de carbono no PTS presentó una menor concentración celular que con los azúcares PTS. La cepa CVPTSGSp creció con fructosa, sacarosa y arabinosa, mientras que exhibió un crecimiento defectuoso con glucosa, maltosa y glicerol. La cepa CVPTSGHISp, presentó un crecimiento limitado en glucosa y no creció en otros azúcares PTS, pero sí creció en arabinosa. Estos resultados, son consistentes con la inactivación del sistema PTS en la cepa CVPTSGHISp.

Tabla 3. Utilización de fuentes de carbono PTS y no PTS por las mutantes del metabolismo central de carbono de *B. subtilis*. PTS (sistema de fosfotransferasa PTS). NG (No growth). OD_{600nm} a las 24 h.

Fuentes de carbono	Transportador	<i>B. subtilis</i> 168 (OD _{600nm})	CVPYKSp (OD _{600nm})	CVPTSGSp (OD _{600nm})	CVPTSGHISp (OD _{600nm})
Glucosa	PtsG (PTS)	4.80	0.40	0.83	0.43
Fructosa	FruA (PTS)	2.80	0.72	3.10	NG
Sacarosa	SacP (PTS)	2.00	0.50	2.70	NG
Maltosa	MalP (PTS)	1.00	0.50	0.60	NG
Glicerol	GlpF (facilitador)	0.90	NG	0.52	NG
Arabinosa	AraE (simporter)	1.00	NG	1.61	1.62

Inesperadamente, la cepa CVPYKSp mostró un crecimiento deficiente en todas las fuentes de carbono PTS utilizadas. Este fenotipo es muy interesante, debido a que esta mutante no tiene modificado el sistema PTS y sin embargo, estos resultados sugieren una deficiencia relacionada con la utilización de los azúcares PTS. Una probable explicación es que esta cepa acumula algún metabolito glucolítico que causa un transporte deficiente de las fuentes de carbono PTS y en consecuencia un crecimiento deficiente. Se ha reportado la construcción y caracterización de una mutante PykA⁻ similar a la cepa CVPYKSp en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Esta mutante también mostró una disminución significativa en la tasa de crecimiento con respecto a la cepa silvestre (Fry et al., 2000).

La cepa CVPYKSp no creció en arabinosa como única fuente de carbono, este resultado es el esperado, ya que esta cepa carece de la enzima PykA, así que la síntesis de piruvato depende de la funcionalidad del sistema PTS. Sin embargo, la arabinosa es una fuente de carbono no dependiente de PTS.

7.2.2 Caracterización cinética de las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp en MM con glucosa como única fuente de carbono.

Se realizaron cultivos en matraces de 250 ml con 50 ml de MM suplementado con 8 g/L de glucosa con las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp, CVPTSGHISp y *B. subtilis* 168; para determinar la velocidad de crecimiento, consumo de glucosa, producción de ácido acético y acetoína (Figura 4).

En estas condiciones, la cepa silvestre alcanzó una DO_{600nm} máxima de 6.2 en 11h de cultivo y no presentó una fase lag de crecimiento. En este tiempo la cepa consumió el 55.11% de la glucosa adicionada. En contraste, las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp mostraron una menor concentración celular final y una fase lag de crecimiento de aproximadamente 6 horas para la cepa CVPTSGSp y al menos de 12 horas para las mutantes CVPYKSp y CVPTSGHISp. Sin embargo, las mutantes consumieron más glucosa que la cepa silvestre, aunque en un periodo de tiempo más largo (Figura 4).

Bajo estas condiciones se determinaron las velocidades específicas de crecimiento (μ), y de consumo de glucosa (q_{Glc}). Los resultados se muestran en la tabla 4. La cepa silvestre presentó una μ de 0.52 h^{-1} mientras que las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp exhibieron una μ correspondiente de 13.46, 36.54 y 17.31%, respectivamente al compararse con la cepa *B. subtilis* 168 (Tabla 4). Los valores de q_{Glc} fueron de $0.97 \text{ g}_{Glc}\text{g}_{DCW}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la cepa silvestre y del 42.27, 64.95 y

38.14% para las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp, respectivamente (Tabla 4).

Los resultados obtenidos para la cepa CVPYKSp concuerdan con los publicados por Fry y colaboradores (2000) quienes reportaron que la inactivación de PykA en *B. subtilis* afectó de manera negativa su crecimiento y consumo de glucosa, así como la tasa de producción de ácido acético. La disminución de μ y q_{Glc} en la cepa CVPTSGHISp es esperada, ya que el sistema PTS es el principal sistema de transporte de glucosa en *B. subtilis*. La delección del operón *ptsGHI* en esta cepa eliminó completamente la actividad del sistema PTS. Sin embargo, se ha reportado que cepas de *B. subtilis* que carecen del sistema PTS presentan transporte de glucosa residual independiente de PTS realizado probablemente por las permeasas GlcP y GlcU (Paulsen et al., 1998; Fiegler et al., 1999).

La cepa CVPTSGSp presentó una μ mayor con respecto a la cepa CVPTSGHISp. Este resultado sugiere que hay una o más permeasas EII-PTS que pueden transportar glucosa. Una respuesta similar se observó en *E. coli*, donde la inactivación del componente específico para el transporte de glucosa IIBC^{Glc} originó la reducción del 20% en la μ en glucosa (Curtis and Epstein, 1975). En este caso particular, el transporte remanente de glucosa es dependiente del componente PTS de manosa (Curtis and Epstein, 1975). Se desconoce que componente (s) de PTS en *B. subtilis* reemplaza la función del transportador PTSG.

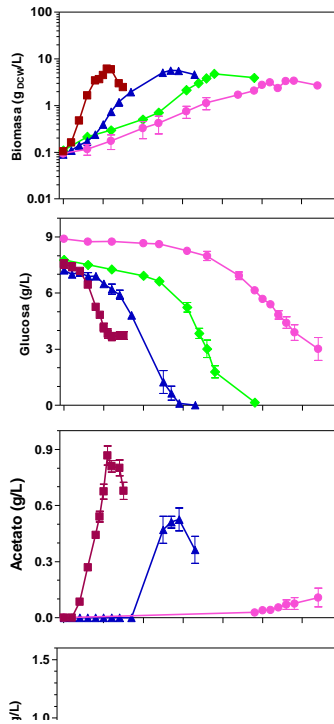


Figura 4. Cultivos en matraces de las cepas *B. subtilis* 168 (■), CVPYKSp (●), CVPTSGSp (▲) y CVPTSGHISp (◆) en MM suplementado con 8 g/L de glucosa. Las gráficas muestran el promedio de 2 experimentos independientes por duplicado.

Tabla 4. Comparación de los parámetros cinéticos μ y q_{Glc} obtenidos de 2 experimentos independientes por duplicado para *B. subtilis* 168 y las mutantes en MM con 8 g/L de glucosa.

Cepas	Genotipo	μ (h^{-1})	q_{Glc} ($g_{Glc}g_{DCW}^{-1}h^{-1}$)
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	0.52 ± 0.02	0.97 ± 0.05
CVPYKSp	<i>trpC2</i> Δ (<i>pykA</i>):: <i>loxPaadAloxP</i>	0.07 ± 0.002	0.41 ± 0.04
CVPTSGSp	<i>trpC2</i> Δ (<i>ptsG</i>):: <i>loxPaadAloxP</i>	0.19 ± 0.01	0.63 ± 0.06
CVPTSGHISp	<i>trpC2</i> Δ (<i>ptsGHI</i>):: <i>loxPaadAloxP</i>	0.09 ± 0.01	0.37 ± 0.05

Bajo las condiciones de exceso de glucosa usadas en este trabajo, la cepa silvestre produjo 0.87 g/L de ácido acético y 0.51 g/L de acetoina como subproductos (Figura 4). Los valores de ácido acético fueron del 12.40 y 67.58% para las cepas CVPYKSp y CVPTSGSp con respecto a la cepa silvestre, mientras que la mutante

CVPTSGHISp no produjo este compuesto (Figura 4). La disminución en la concentración del ácido acético en las mutantes podría ser explicada como una consecuencia de la disminución del flujo glucolítico. Referente a la producción de acetoína, las mutantes incrementaron ligeramente su producción con respecto a la cepa silvestre, aunque su tasa de producción disminuyó con respecto a la cepa silvestre (Figura 4).

7.2.3 Medición de la velocidad inicial de transporte con glucosa ^{14}C .

Para determinar cuantitativamente la capacidad de transporte de glucosa en las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp, CVPTSGHISp y *B. subtilis* 168, se calculó la velocidad inicial de transporte de glucosa ^{14}C (σ_{Glc}).

La σ_{Glc} se determinó a través de una gráfica lineal de concentración de ^{14}C -glucosa vs tiempo. La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976). La cinética de transporte se muestra en la figura 5 y los σ_{Glc} se muestran en la Tabla 5.

El σ_{Glc} está disminuida significativamente en todas las mutantes con respecto a la cepa silvestre. Se comprobó que la inactivación de los componentes del sistema PTS, afectaron de manera negativa el transporte de glucosa con una reducción de 97.17% al inactivar *ptsG* y del 99.50% al inactivar *ptsGHI*. Para la cepa CVPYKSp el σ_{Glc} corresponde a un 11% de la obtenida para la cepa silvestre (Tabla 5).

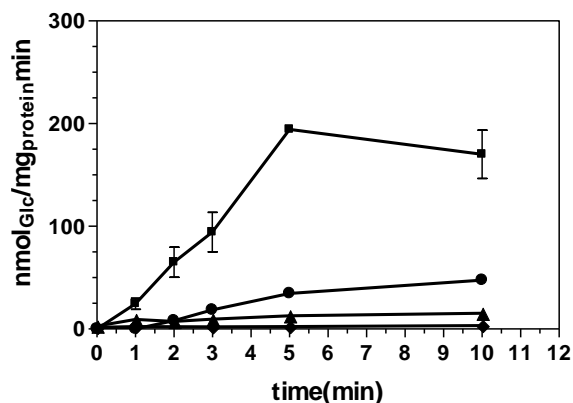


Figura 5. Consumo de glucosa radioactiva en cepas de *B. subtilis* 8 (■) VPYKSp (●) VPTSGSp (▲) VPTSGHISp (◆) y p f l z [¹⁴C]-glucosa (0.05 mM, 5mCi/mmol).

Tabla 5. Comparación de la velocidad inicial de transporte (σ_{Glc}) para la cepa silvestre y las mutantes.

Cepas	Genótipo	σ_{Glc} ($\text{nmol}_{Glc} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$)
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	42.22 ± 4.73 (100%)
CVPYKSp	<i>trpC2</i> Δ (<i>pykA</i>):: <i>loxPaadAloxP</i>	4.64 ± 0.45 (11.0%)
CVPTSGSp	<i>trpC2</i> Δ (<i>ptsG</i>):: <i>loxPaadAloxP</i>	1.19 ± 0.30 (2.83%)
CVPTSGHISp	<i>trpC2</i> Δ (<i>ptsGHI</i>):: <i>loxPaadAloxP</i>	0.21 ± 0.10 (0.50%)

La caracterización en medio mineral con glucosa de una mutante PykA⁻ de *B. subtilis* similar a la cepa CVPYKSp mostró la acumulación de PEP y G-6-P (Fry et al., 2000). El PEP es un inhibidor de la enzima Pfk de bacterias (Blangy et al., 1968; Evans and Hudson, 1979; Doelle et al., 1982), así que una concentración alta de este metabolito podría reducir la actividad de Pfk, lo cual causaría la acumulación de G-6-P y consecuentemente disminuir la capacidad de transporte de glucosa por PTS, probablemente por inhibición de producto.

Este es el primer trabajo donde se muestra que la inactivación de una enzima glucolítica (PykA) afecta la capacidad de transportar glucosa en *B. subtilis*. En este contexto, se sabe que en *E. coli*, una mutación en *pgi* o *pfkA*, que codifican para la fosfoglucosa isomerasa o fosfofructocinasa A, respectivamente causa la degradación de

mRNA del transportador *ptsG* por la acumulación de G-6-P o fructosa-6-P (Morita T *et al.*, 2003). Sin embargo, un fenómeno similar es desconocido en *B. subtilis*.

7.3 Efecto de las mutaciones en el metabolismo central sobre la producción de DAHP.

Para estudiar el efecto de la eliminación de las reacciones PykA y PTS que consumen PEP sobre la magnitud del flujo de carbono hacia la vía común de síntesis de los compuestos aromáticos, se inactivó el gene *aroB* que codifica para la enzima dehidroquinato sintasa (DHQS) en las mutantes CVPYK, CVPTSG, CVPTSGHI así como en la cepa silvestre *B. subtilis* 168 (ver sección 6.4). Las mutantes se denominaron CVPYKB, CVPTSGB, CVPTSGHIB y 168B, respectivamente (Tabla 2), estas derivadas AroB⁻ no metabolizan el primer intermediario aromático DAHP, por lo tanto este compuesto se acumula y es secretado al medio de cultivo. Para determinar la producción y rendimiento de DAHP en estas cepas, se realizaron cultivos de células en reposo utilizando glucosa como única fuente de carbono (Báez-Viveros *et al.*, 2001).

En la figura 6, se muestran los resultados donde puede observarse que las derivadas AroB⁻ no presentaron crecimiento y solamente la cepa 168B consumió toda la glucosa después de las 12 de cultivo. Las cepas CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB exhibieron una q_{Glc} correspondiente al 60, 63 y 64%, respectivamente, al compararse con la cepa *B. subtilis* 168B (Tabla 6). El análisis del sobrenadante por el método del ácido tiobárbiturico (Srinivasan and Sprinson; 1959), reportó que todas las cepas acumularon DAHP. La cepa CVPYKB excretó la mayor concentración de DAHP al compararse con las cepas 168B, CVPTSGB y CVPTSGHIB (Figura 6).

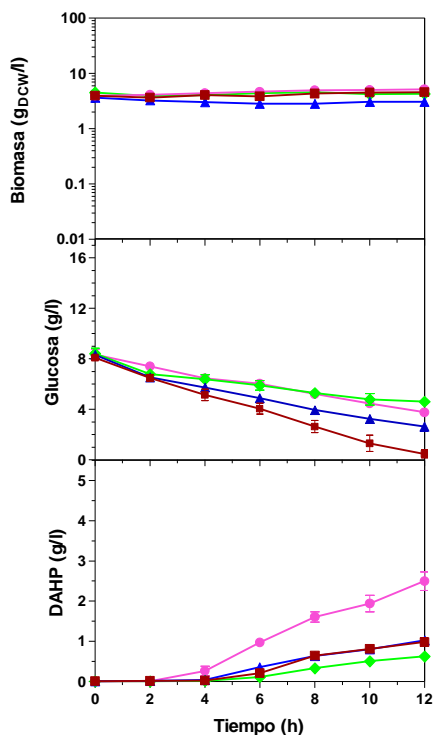


Figura 6. Cultivos de células en reposo de las cepas (■) 168B, (●) CVPYKB, (▲) CVPTSGB y (◆) CVPTSGHIB. Los experimentos se llevaron a cabo en matraces bafleados de 250ml con 50ml de MM con 8 g/l de glucosa a 37° C y 300 rpm. Se realizaron 3 experimentos independientes.

El análisis de los parámetros cinéticos mostró que la cepa CVPYKB que carece de la enzima PykA presentó el rendimiento más alto de DAHP a partir de glucosa, con respecto a las otras mutantes (Tabla 6). Éste incrementó 5.30 veces, con respecto a la cepa progenitora 168B, y corresponde al 43% del rendimiento máximo teórico (0.86 mol/mol; Patnaik and Liao., 1994). El valor de q_{DAHP} en la cepa CVPYKSp se duplicó con respecto a la cepa 168B. Los valores de $Y_{DAHP/Glc}$ y q_{DAHP} correspondientes a las cepas 168B, CVPTSGB y CVPTSGHIB fueron similares.

Tabla 6. Comparación de los parámetros cinéticos (q_{Glc} , q_{DAHP} y $Y_{DAHP/Glc}$) obtenidos de 3 experimentos de células en reposo para las cepas 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB. Los parámetros fueron calculados a las 12 horas de cultivo.

Cepas	q_{Glc} $mmol_{Glc}g_{DCW}^{-1}h^{-1}$	q_{DAHP} $mmol_{DAHP}g_{DCW}^{-1}h^{-1}$	$Y_{DAHP/Glc}$ $mmol_{DAHP}mmol_{Glc}^{-1}$
168B	2.60 ± 0.11	0.19 ± 0.02	0.07 ± 0.01
CVPYKB	1.55 ± 0.37	0.53 ± 0.04	0.37 ± 0.04
CVPTSGB	1.65 ± 0.16	0.19 ± 0.02	0.10 ± 0.01
CVPTSGHIB	1.67 ± 0.27	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01

Los parámetros cinéticos fueron calculados de tres experimentos independientes. Rendimiento máximo teórico (0.86 mol/mol)(Patnaik R. and Liao J., 1994).

Este resultado sugiere que en las condiciones evaluadas, la cepa CVPYKB redirigió un mayor flujo de carbono en forma del precursor PEP hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos, a pesar de que la inactivación del sistema PTS sugería una mayor disponibilidad de PEP. Un estudio basado en análisis de flujos metabólicos en las mutantes nos ayudaría a entender y explicar el resultado obtenido en esta parte del trabajo.

Las derivadas AroB⁻ de *B. subtilis* no están transformadas con algún plásmido que sobreexpresen los genes *aroA* o *tktA* para redirigir un mayor flujo de carbono hacia la vía común de síntesis de compuestos aromáticos. Por lo tanto, la acumulación de DAHP en las mutantes AroB⁻ de *B. subtilis* es un efecto de las modificaciones en el metabolismo central. Sin embargo, una estrategia de ingeniería de vías metabólicas (IVM) para aumentar la disponibilidad del precursor E4P o la concentración de enzima DAHP sintasa mediante sobreexpresión de los genes *tktA* y/o *aroA*, probablemente ayudaría a aumentar el rendimiento de DAHP en estas mutantes de *B. subtilis*.

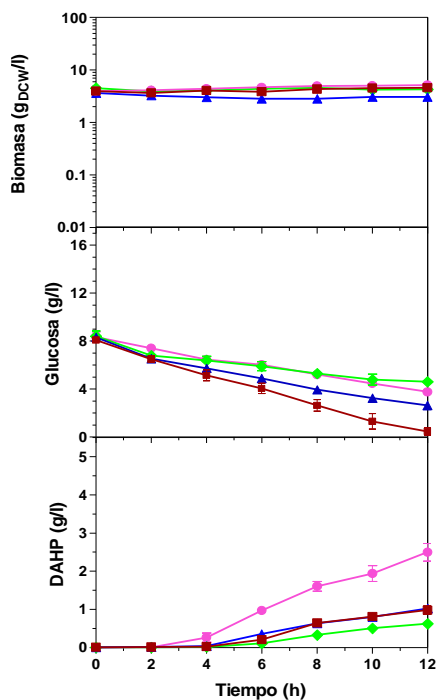
7.3.1 Comparación entre cultivos de células en reposo y cultivos en medio rico sobre la producción de DAHP en las mutantes de *B. subtilis* AroB⁻.

Para determinar producción de DAHP en medio rico, se realizaron cultivos en matraces de 250 ml con 50 ml de MM suplementado con 16 g/L de glucosa y 5 g/L de extracto de levadura. En la figura 7b se muestra el crecimiento, consumo de glucosa y

producción de DAHP obtenida bajo estas condiciones de cultivo para las cepas 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB. El crecimiento observado en las mutantes CVPTSGB y CVPTSGHIB es similar con respecto a la cepa parental 168B. En contraste, la cepa CVPYKB mostró un crecimiento disminuido con respecto las otras cepas. Las cepas 168B y CVPTSGB no consumieron toda la glucosa adicionada mientras que, las cepas CVPTSGHIB y CVPYKB si lo hicieron, aunque en un tiempo mayor. Con respecto a la producción del intermediario DAHP, se observó que a las 50 horas de cultivo, las cepas *B. subtilis* 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB acumularon 0.56, 4.0, 1.0 y 1.0 g/L de DAHP, respectivamente (Figura 7b). Estos resultados muestran que la cepa CVPYKB que carece de la actividad de la enzima PykA, exhibió los mejores parámetros de producción de DAHP tanto en las células en reposo como en los cultivos en medio rico (Figura 7a, b).

Se ha reportado que una cepa de *B. subtilis* con la actividad de PykA modulada y transformada con plásmidos que sobreexpresan el operón de síntesis de folato y el gen *aroH* de *E. coli* incrementó el rendimiento del ácido fólico, un compuesto que requiere de los precursores de la vía común de compuestos aromáticos (Zhu et al., 2005). Sin embargo, este reporte no comparó el efecto de la inactivación del sistema de fosfotransferasa PTS. Nuestros resultados muestran que en *B. subtilis* la eliminación de la actividad PykA es la mejor estrategia para incrementar el flujo de carbono hacia la vía común de síntesis de compuestos aromáticos con respecto a la eliminación de los componente (s) del sistema de fosfotransferasa PTS (Figura 7a, b).

a)



b)

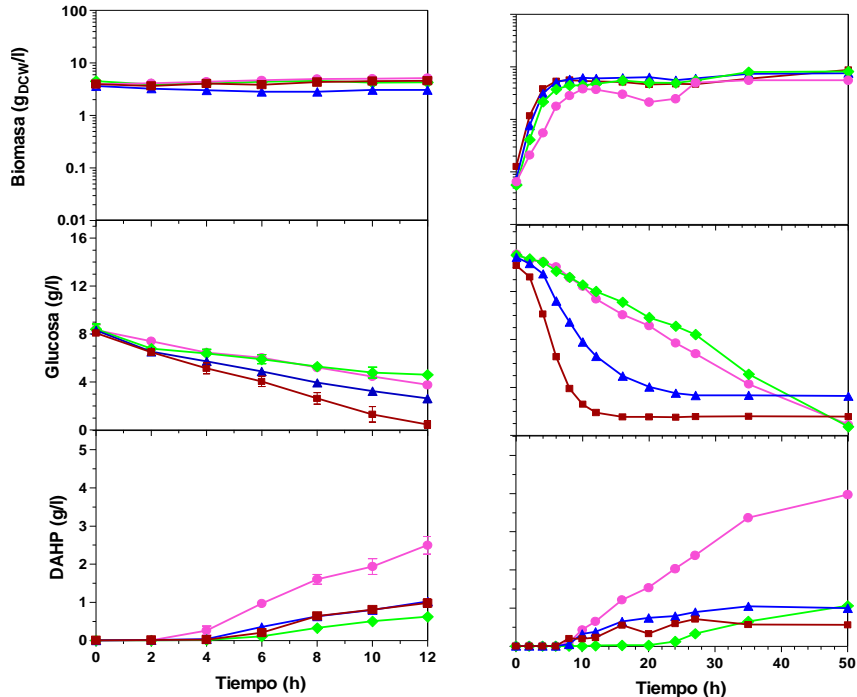


Figura 7. a) Cultivos de células en reposo vs b) Cultivo lote de las cepas (■) 168B, (●) CVPYKB, (▲) CVPTSGB y (◆) CVPTSGBHIB. Los experimentos se llevaron a cabo en matraces bafleados de 250ml con 50ml de MM con 8 g/l de glucosa para las células en reposo y 16 g/l para los cultivos lote, éstos últimos se suplementaron con 5 g/L de extracto de levadura. Los matraces se incubaron a 37° C y 300 rpm.

Una hipótesis que podría explicar porqué al inactivar el sistema PTS en *B. subtilis* no tuvo un efecto positivo sobre la producción del intermediario aromático DAHP, es que en estas mutantes, el flujo de carbono en forma de PEP se redirige hacia la síntesis de piruvato a través de la enzima piruvato cinasa y finalmente, hacia la vía de los ácidos tricarbónicos, en lugar de ser utilizado como sustrato por la enzima DAHP sintasa. Esta hipótesis está basada en el hecho de que la enzima PykA de *B. subtilis* es inducida por su propio sustrato PEP (Diesterhaft M and Freese E., 1972).

7.4 Análisis del patrón transcripcional de genes del metabolismo central en las mutantes de *B. subtilis*.

La caracterización fisiológica de las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp reveló que las inactivaciones de *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* alteraron el crecimiento, flujo glucolítico, la capacidad para transportar glucosa, así como el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos. Para determinar los efectos de estas mutaciones a nivel transcripcional, se estudió por medio de la técnica de RT-qPCR la respuesta de expresión de 76 genes que codifican proteínas involucradas en funciones de transporte, metabolismo central y regulación. Una parte necesaria para la realización de los ensayos de RT-qPCR fue encontrar un gen de referencia.

Se comparó el patrón de transcripción de 11 genes (*rpoA*, *atpA*, *ldh*, *gapA*, *ynfF*, *zwf*, *thrS*, *comK*, *ccpA*, *xylR* y *hbsU*). De éstos, encontramos que el gen *hbsU* mantuvo un nivel de expresión constante en las cepas *B. subtilis* 168, CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp en las condiciones descritas (Figura 8). Este gen codifica una proteína de unión al ADN, cuya función es esencial para el crecimiento celular. Está involucrada en la reparación del ADN, recombinación homóloga y translocación de proteínas (Wolfgang and Marahiel., 2002).



Figura 8. Perfil del gen *hsbU* como gen de referencia.

Todos los datos de RT-qPCR son reportados como niveles de expresión relativos al valor obtenido para la cepa silvestre *B. subtilis* 168 y son mostrados en la tabla 7. La variación del nivel de transcrito para cada gen analizado no fue mayor de 30%.

Arbitrariamente, consideramos que un gen está sobre exp

$$1 \geq \frac{q}{p}$$
y q

$$1 \leq \frac{q}{p}$$
observaron 32, 24 y 36 genes con cambios significativos en sus niveles de expresión para las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp, respectivamente (Figura 9).

A continuación se discutirá brevemente los resultados de expresión de algunos genes relacionados al transporte de glucosa, glucolisis, producción de ácidos orgánicos y aminoácidos aromáticos. Para genes correspondientes a otras vías, tomar como referencia el artículo Cabrera-Valladares et al., 2012.

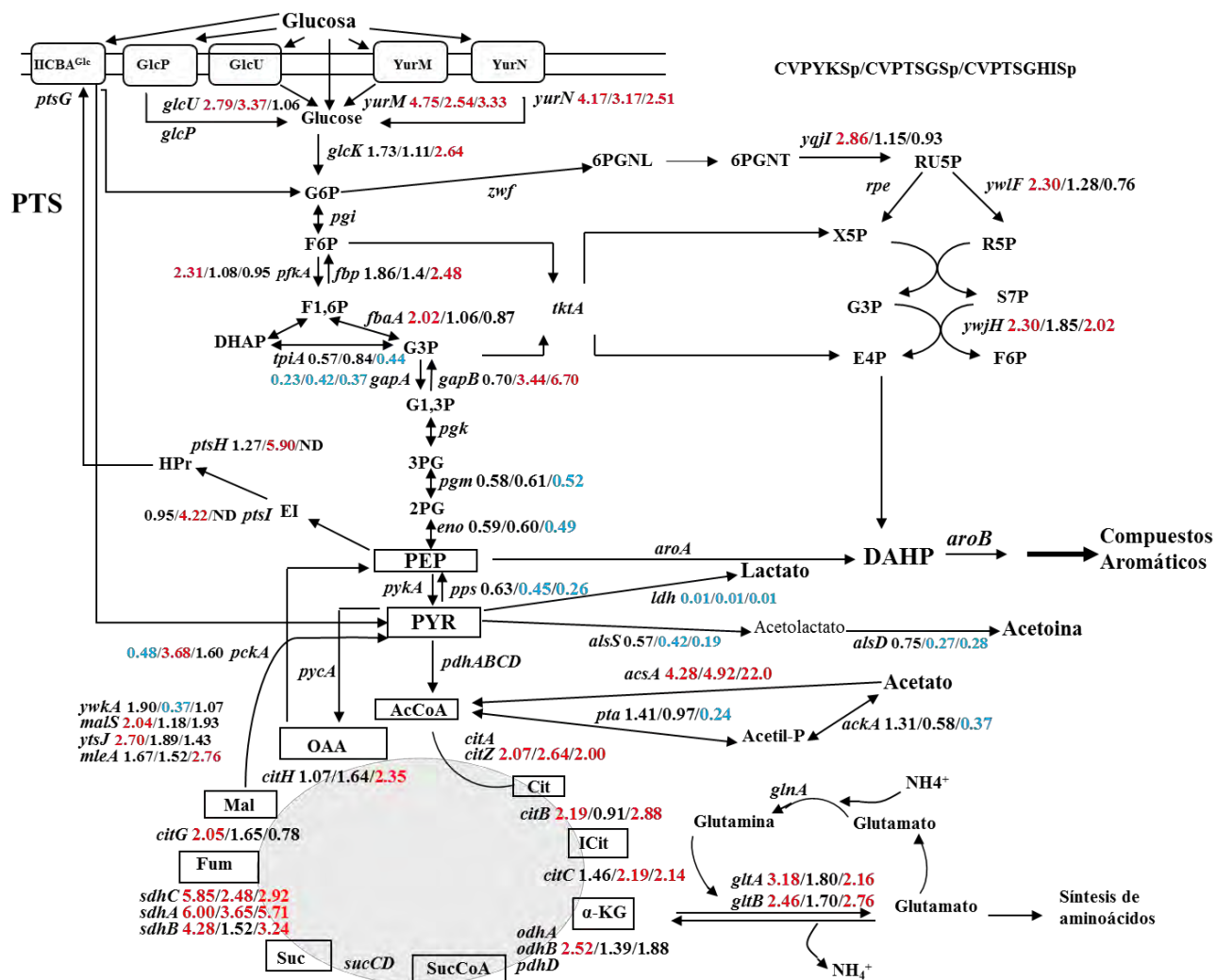


Figura 9. Esquema del metabolismo central de carbono en *B. subtilis* que muestra los genes y las proteínas involucradas en su transformación. Los valores de RT-qPCR de genes sobreexpresados 2.0 veces o más (color rojo), de genes subexpresados 0.5 veces o menos (color azul) y de genes que no sufrieron cambios (color negro) se muestran junto a cada gen entre paréntesis para las cepa CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp, respectivamente, cuando crecen en MM con glucosa como fuente de carbono. Los valores de RT-qPCR para todos los genes de *B. subtilis* 168 son igual a 1.0, por esta razón se omiten del esquema. Las abreviaturas son las siguientes: PYR=piruvato; IICBA^{Glc}=componente PTS específico para glucosa IICBA; HPr=Proteína estable al calor HP; EI=Enzima I; G6P=glucosa-6-fosfato; F6P=fructosa-6-fosfato; F1,6P=fructosa 1,6-bifosfato; DHAP=dihidroxiacetona fosfato; G3P=gliceraldehído-3-fosfato; G1,3P= glicerato 1,3-bifosfato; 3PG= glicerato-3-fosfato; 2PG=glicerato-2-fosfato; AroA=3-desoxi-D- arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa; 6PGNL=gluconolactona-6-fosfato; 6PGNT=gluconato-6-fosfato; RU5P=ribulosa-5-fosfato; X5P=xylulosa-5-fosfato; S7P=sedoheptulosa-7-fosfato; PykA=piruvato cinasa A; AlsS=acetolactato sintasa; AlsD=acetolactato decarboxilasa; LDH=L-lactato dehidrogenasa; PdhABCD=complejo de piruvato deshidrogenasa; AcCoA=acetil-CoA; Pta=fosfotransacetilasa; AckA=acetocin asa; AcsA=acetil-CoA sintetasa; Cit=citrato; I = ; α-KG=α-cetoglutarato; SucCoa=succinil CoA; Suc=succinato; Fum=fumarato; Mal=L-malato; YwkA= similar a malato dehidrogenasa; YtsJ=similar a malato deshidrogenasa; MalS=malato dehidrogenasa; MleA=probable enzima malolactica; CitA=citrato sintasa I; CitB=aconitasa; CitZ=citrato sintase II; CitC=isocitrato deshidrogenasa; OdhA=2-oxoglutarato deshidrogenasa (subunidad E1); OdhB=2-oxoglutarato deshidrogenase (subunidad E2); SucC=succinil-CoA sintetasa (subunidad beta); SucD=succinil-CoA sintetasa (subunidad alpha); SdhABC=Complejo de la succinato deshidrogenasa; CitG=fumarato hidratasa; CitH=malato deshidrogenasa.

Tabla 7. Niveles de transcripción relativa determinada por RT-qPCR de varios grupos de genes de las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp, respectivamente crecidas en MM con glucosa como fuente de carbono.

Vía metabólica y genes	Función	Niveles de expresión como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ usando a <i>B. subtilis</i> 168 como valor relativo		
		CVPYKSp	CVPTSGSp	CVPTSGHISp
1. Transporte de glucosa				
<i>glcT</i>	Anterminador transcripcional	2.29 ± 0.13	3.0 ± 0.13	2.57 ± 0.62
<i>ptsG</i>	Enzima específica para el transporte de glucosa, EIICBA (PTS)	1.08 ± 0.18	ND	ND
<i>ptsH</i>	Proteína HPr (PTS)	1.27 ± 0.26	5.90 ± 1.49	ND
<i>ptsI</i>	Enzima EI (PTS)	0.95 ± 0.06	4.22 ± 0.40	ND
<i>glcP</i>	Simporter de glucosa/manosa:H ⁺	1.70 ± 0.42	1.57 ± 0.25	1.78 ± 0.20
<i>glcU</i>	Permeasa de glucose	2.79 ± 0.47	3.37 ± 0.15	1.06 ± 0.12
<i>yurM</i>	Permeasa de azúcares	4.75 ± 0.89	2.54 ± 0.39	3.33 ± 0.13
<i>yurkN</i>	Permeasa de azúcares	4.17 ± 0.82	3.17 ± 0.71	2.51 ± 0.11
2. Glucólisis				
<i>glcK</i>	Glucocinasa	1.73 ± 0.19	1.11 ± 0.15	2.64 ± 0.32
<i>Pgi</i>	Glucosa-6-fosfato isomerasa	1.75 ± 0.29	0.89 ± 0.15	1.09 ± 0.24
<i>pfkA</i>	6-Fosfofructocinasa	2.31 ± 0.28	1.08 ± 0.17	0.95 ± 0.07
<i>fbaA</i>	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa	2.02 ± 0.25	1.06 ± 0.19	0.87 ± 0.13
<i>gapA</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	0.23 ± 0.02	0.42 ± 0.06	0.37 ± 0.03
<i>tpiA</i>	Triosa fosfato isomerasa	0.57 ± 0.06	0.84 ± 0.09	0.44 ± 0.05
<i>pgk</i>	Fosfoglicerato cinasa	0.66 ± 0.09	0.79 ± 0.15	0.61 ± 0.16
<i>pgm</i>	Fosfoglicerato mutasa	0.58 ± 0.15	0.61 ± 0.09	0.52 ± 0.11
<i>eno</i>	Enolasa	0.59 ± 0.03	0.60 ± 0.06	0.49 ± 0.06
<i>cggR</i>	Represor transcripcional de <i>gapA</i>	0.22 ± 0.03	0.72 ± 0.22	0.49 ± 0.08
<i>pykA</i>	Piruvato cinasa	ND	1.15 ± 0.22	1.74 ± 0.19
3. Gluconeogénesis y vía anaplerótica				
<i>pck</i>	PEP carboxicinas	0.48 ± 0.09	3.68 ± 0.99	1.60 ± 0.25
<i>gapB</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	0.70 ± 0.17	3.44 ± 1.03	6.70 ± 0.46
<i>fbp</i>	Fructosa-1,6-bifosfatasa	1.86 ± 0.33	1.4 ± 0.09	2.48 ± 0.62
<i>pycA</i>	Piruvato carboxilasa	1.48 ± 0.17	1.88 ± 0.17	1.64 ± 0.22
<i>ywka</i>	Malato deshidrogenasa	1.90 ± 0.13	0.37 ± 0.08	1.07 ± 0.18
<i>malS</i>	Malato deshidrogenasa	2.04 ± 0.06	1.18 ± 0.10	1.93 ± 0.16
<i>ytsJ</i>	Malato deshidrogenasa	2.70 ± 0.37	1.89 ± 0.33	1.43 ± 0.09
<i>mleA</i>	Enzima malolactica	1.67 ± 0.26	1.52 ± 0.22	2.76 ± 0.05
<i>pps</i>	PEP sintasa	0.63 ± 0.08	0.45 ± 0.10	0.26 ± 0.07
4. Vías fermentativas, de producción y utilización de acetoina y acetato				
<i>ldh</i>	L-lactato deshidrogenasa	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0
<i>ackA</i>	Acetato cinasa	1.31 ± 0.28	0.58 ± 0.14	0.37 ± 0.06
<i>pta</i>	Fosfotransacetilasa	1.41 ± 0.14	0.97 ± 0.21	0.24 ± 0.03
<i>alsS</i>	α -acetolactato sintasa	0.57 ± 0.12	0.42 ± 0.10	0.19 ± 0.05
<i>alsD</i>	α -acetolactato decarboxilasa	0.75 ± 0.12	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.07
<i>acsA</i>	Acetil-CoA sintetasa	4.28 ± 0.40	4.92 ± 0.70	22.0 ± 4.97
5. Ciclo TCA				
<i>pdhA</i>	Piruvato deshidrogenasa (E1 α)	1.08 ± 0.19	0.99 ± 0.15	1.20 ± 0.29
<i>pdhB</i>	piruvato deshidrogenasa (E1 β)	1.42 ± 0.18	1.04 ± 0.21	1.21 ± 0.19

<i>pdhC</i>	piruvato deshidrogenasa (dihidrolipoamida acetiltransferasa subunidad E2)	1.72 ± 0.16	1.05 ± 0.28	1.21 ± 0.30
<i>pdhD</i>	piruvato deshidrogenasa / 2-oxoglutarato deshidrogenasa (dihidrolipoamida deshidrogenasa subunidad E3)	1.94 ± 0.41	0.96 ± 0.24	1.24 ± 0.09
<i>cita</i>	Citrato sintasa I	1.45 ± 0.28	1.36 ± 0.38	1.24 ± 0.09
<i>citZ</i>	citrato sintasa II (principal)	2.07 ± 0.37	2.64 ± 0.24	2.0 ± 0.31
<i>citB</i>	aconitate hidratasa	2.19 ± 0.40	0.9 ± 0.08	2.88 ± 0.76
<i>Icd</i>	Isocitrato deshidrogenada	1.46 ± 0.27	2.19 ± 0.37	2.14 ± 0.22
<i>odhA</i>	2-oxoglutarate deshidrogenasa (subunidad E1)	1.71 ± 0.16	1.17 ± 0.23	1.15 ± 0.20
<i>odhB</i>	2-oxoglutarate deshidrogenasa (dihidrolipoamida transsuccinilasa, subunit E2)	2.52 ± 0.21	1.39 ± 0.24	1.88 ± 0.46
<i>sucC</i>	succinil-CoA sintetasa (beta subunit)	1.36 ± 0.12	1.49 ± 0.19	1.33 ± 0.29
<i>sucD</i>	succinil-CoA sintetasa	1.37 ± 0.14	1.23 ± 0.34	1.98 ± 0.36
<i>sdhA</i>	Succinato deshidrogenasa (subunidad flavoproteina)	6.00 ± 0.73	3.65 ± 0.85	5.71 ± 1.67
<i>sdhB</i>	Succinato deshidrogenasa (proteina hierro-sulfuro)	4.28 ± 0.12	1.52 ± 0.27	3.24 ± 0.58
<i>sdhC</i>	Succinato deshidrogenasa (proteina hierro-sulfuro)	5.85 ± 0.89	2.48 ± 0.60	2.92 ± 0.58
<i>citG</i>	fumarato hidratasa	2.05 ± 0.13	1.65 ± 0.35	0.78 ± 0.10
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	1.07 ± 0.25	1.64 ± 0.22	2.35 ± 0.31
6. Vía de las Pentosas Fosfato				
<i>zwf</i>	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	1.72 ± 0.14	0.82 ± 0.19	0.61 ± 0.09
<i>tkt</i>	Transacetolasa	1.60 ± 0.21	1.06 ± 0.22	0.79 ± 0.08
<i>yqjI</i>	Similar a 6-P-gluconato deshidrogenasa	2.86 ± 0.60	1.15 ± 0.14	0.93 ± 0.11
<i>ywlF</i>	Similar a ribosa-5-fosfato epimerasa	2.30 ± 0.54	1.28 ± 0.36	0.76 ± 0.17
<i>rpeE</i>	Similar to ribulose-5-phosphate 3-epimerase	1.24 ± 0.10	1.15 ± 0.33	1.5 ± 0.34
<i>ywjH</i>	Similar a transaldolasa	2.30 ± 0.12	1.85 ± 0.25	2.02 ± 0.57
7. Vía de síntesis de Aminoácidos Aromáticos				
<i>aroA</i>	3-deoxy-D-arabino-heptulose 7-fosfato sintasa	1.00 ± 0.13	1.13 ± 0.23	1.02 ± 0.08
8. Genes para la utilización de Xilosa				
<i>xylA</i>	Xilulosa isomerasa	0.52 ± 0.09	4.00 ± 0.25	67.58 ± 11.57
<i>xylB</i>	Xilulosa cinasa	0.92 ± 0.22	2.40 ± 0.44	47.38 ± 5.25
<i>xylR</i>	Repressor transcripcional del operon <i>xylAB</i>	0.84 ± 0.21	1.26 ± 0.23	2.30 ± 0.39
9. Nitrogen metabolism				
<i>gltA</i>	Glutamato sintasa (subunidad grande)	3.18 ± 0.78	1.8 ± 0.09	2.16 ± 0.58
<i>gltB</i>	Glutamato sintasa (subunidad pequeña)	2.46 ± 0.25	1.70 ± 0.34	2.76 ± 0.45
<i>tnrA</i>	Regulador transcripcional.	2.62 ± 0.68	1.29 ± 0.35	1.07 ± 0.27
10. Reguladores y otros				
<i>ccpA</i>	Regulador transcripcional que regula la represión catabólica de carbono	1.90 ± 0.35	1.19 ± 0.24	1.25 ± 0.20
<i>ccpC</i>	Regulador transcripcional que regula la represión catabólica de carbono	2.15 ± 0.06	3.62 ± 0.34	3.31 ± 0.73
<i>hprK</i>	HPr cinasa (fosforilación de HPr y Crh en Ser46)	4.00 ± 0.30	2.60 ± 0.33	2.84 ± 0.41
<i>crh</i>	catabolite repression HPr-like protein	2.03 ± 0.35	1.37 ± 0.24	1.63 ± 0.16
<i>clpP</i>	Proteasa Clp dependiente de ATP ATP-dependent Clp protease	0.73 ± 0.07	0.95 ± 0.28	1.86 ± 0.55

	proteolytic subunit (class III heat-shock protein)			
<i>codY</i>	Represor transcripcional	1.44 ± 0.12	0.88 ± 0.13	0.74 ± 0.16
<i>resD</i>	two-component response regulator involved in aerobic and anaerobic respiration	2.34 ± 0.35	1.92 ± 0.11	1.63 ± 0.19
<i>resE</i>	two-component sensor histidine kinase involved in aerobic and anaerobic respiration	1.87 ± 0.02	1.36 ± 0.15	1.47 ± 0.32
<i>sigB</i>	RNA polymerase general stress sigma factor	0.32 ± 0.05	0.35 ± 0.06	3.59 ± 0.46
<i>rpoA</i>	RNA polimerasa (subunidad alpha)	0.90 ± 0.09	0.76 ± 0.20	0.45 ± 0.03
<i>atpA</i>	ATP sintasa (subunidad alpha)	3.14 ± 0.26	1.72 ± 0.16	1.34 ± 0.08
<i>comK</i>	Factor de transcripción involucrado en competencia (CTF)	1.26 ± 0.31	0.76 ± 0.14	0.51 ± 0.15
<i>hbsU</i>	proteína HbsU	1	1	1

7.4.1 Transporte y fosforilación de glucosa. El nivel de transcrito de los genes *ptsGHI* no cambió en la cepa CVPYKSp con respecto a la cepa silvestre (Tabla 7). Este resultado no explica la baja capacidad de transporte de glucosa en esta cepa y sugiere que la causa es independiente del nivel de transcripción y obedece a un mecanismo desconocido, que tiene un efecto negativo sobre la actividad del sistema PTS. El nivel de transcrito de los genes *ptsHI* en la cepa CVPTSGSp incrementó 5.90 y 4.22 veces, respectivamente. Estos genes forman un operón, el cual se expresa de manera constitutiva en la presencia de glucosa (Gonzy-Tréboul et al., 1989). Sin embargo, no se sabe la razón de porque la inactivación del gen *ptsG* causó la sobreexpresión de los genes *ptsHI*. Por otro lado, se ha reportado que en *B. subtilis*, los genes *glcP* y *glcU* codifican para transportadores de glucosa (Paulsen et al., 1998; Fiegler et al., 1999). Mientras que, *yurM* y *yurN* codifican probables proteínas transportadoras de glucosa (Torsten et al., 2005). Los resultados de RT-qPCR muestran que *yurM* y *yurN* se sobreexpresaron en las tres mutantes (Tabla 7), mientras que el nivel de transcrito del gene *glcU* incrementó 2.79 y 3.37 veces en las cepas CVPYKSp y CVPTSGSp, respectivamente. La velocidad reducida de consumo de glucosa y la sobreexpresión de

estos genes sugieren que las mutantes de *B. subtilis* sienten una baja concentración interna de glucosa o G-6-P. Los datos de RT-qPCR sugieren que YurM, YurN o GlcU podrían contribuir al transporte de glucosa en estas cepas. La cual podría ser fosforilada por la glucocinasa de *B. subtilis* GlcK (Skarlatos and Dahl, 1998). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que el nivel de transcrito del gene *glcK* está incrementado 2.64 veces en la cepa CVPTSGHISp (Tabla 7).

7.4.2 Glucólisis. En *B. subtilis* los genes *gapA*, *pgk*, *tpi*, *pgm* y *eno* que codifican enzimas que catalizan la interconversión de triosas fosfato de dihidroxiacetona-fosfato a PEP son transcritos en un operon hexacistrónico junto con *cggR*. CggR es una proteína represora del operon *gapA* en la ausencia de sustratos glucolíticos. La glucosa induce la expresión de este operón (Ludwig et al., 2001). Bajo las condiciones de este estudio, los niveles de transcrito de los genes que forman el operon *gapA* están disminuidos en las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp con respecto a la cepa silvestre (Tabla 7). Este resultado concuerda con el flujo glucolítico disminuido (Tabla 4) y con la velocidad inicial de transporte de glucosa reducida significativamente en estas mutantes (Tabla 5).

7.4.3 Metabolismo de piruvato y acetil-CoA. El piruvato es oxidado para producir acetil coenzima A (Acetil-CoA) por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (*pdhABCD*). La acetil-CoA entra al ciclo de TCA y también es convertida en acetil fosfato y posteriormente a acetato a través de la fosfotransacetolasa (Pta) y la acetato cinasa (AckA) [Grundy et al., 1993a; Presecan-Siedel et al., 1999; Shin et al., 1999]. El piruvato también produce acetoina por acción de las enzimas acetolactato sintasa y acetolactato decarboxilasa codificadas por el operon *alsSD* (Renna et al., 1993). El

piruvato, también puede producir L-lactato por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (Ldh).

Se ha reportado que en cultivos con exceso de glucosa, *B. subtilis* produce grandes cantidades de acetato, acetoina y butanodiol (Speck and Freese, 1973). Sin embargo, en este trabajo, se observó una disminución significativa en la producción de acetato por las mutantes, con respecto a la cepa silvestre (Figura 4). Este resultado es consistente con los niveles de expresión disminuidos de los genes *pta* y *ackA* para las cepas CVPTSGSp y CVPTSGHISp (Tabla 7). En la cepa CVPYKSp, los niveles de expresión de los genes *pta* y *ackA* fueron de 1.3 y 1.4 veces más altos con respecto a la cepa silvestre. Este resultado no es consistente con el decremento del 87.6% en la producción de acetato en esta cepa, con respecto a la cepa silvestre (Figura 4). Sin embargo, la disminución en la acumulación de acetato está de acuerdo con los reportes de dos cepas de *B. subtilis*, la primera carece de la actividad de PykA y la segunda expresa el gene *pykA* a través de un promotor inducido por IPTG, cuando ambas cepas crecieron en medio mínimo con glucosa y la segunda en la ausencia del inductor IPTG, la producción de acetato disminuyó significativamente (Fry et al., 2000; Pan et al., 2006). Por otro lado, en los cultivos de medio mínimo con glucosa no se detectó producción de lactato. El nivel de transcrito para el gen *ldh*, está subexpresado en todas las mutantes, con respecto a la cepa silvestre (Tabla 7). Este resultado sugiere un mecanismo de regulación para *ldh* en respuesta a un flujo glucolítico bajo.

Se ha reportado que en una mutante de HPr (*ptsHI*) puede haber una eliminación parcial o total de RCC de varios genes catabólicos. En este contexto, está reportado que los genes *ackA* y *pta* que tienen localizado el sitio *cre* río arriba con respecto al inicio de la transcripción, son activados en presencia de glucosa (Turinsky et al., 1998; Moir-Blais., 2001; Shivers et al., 2006; Presecan-Siedel et al., 1999; Shin et al., 1999). Sin

embargo, en la cepa CVPTSGHISp, debe haber una reducción de la activación de estos genes como consecuencia de la inactivación de los genes *ptsGHI*, ya que esta cepa carece de la proteína HPr. Esto es consistente con la reducción en el nivel de transcrito observado para *ackA* y *pta* en la cepa CVPTSGHISp.

7.4.4 Utilización de acetato y xilosa.

B. subtilis no puede crecer en MM con xilosa como única fuente de carbono, debido a que carece de una permeasa específica para esta azúcar (Schmiedel and Hillen, 1996). Sin embargo, sí puede metabolizar D-xilosa por la acción de la isomerización a D-xilulosa (XylA) y posteriormente fosforilarla a xilulosa-5-P (XylB). Las enzimas XylAB son codificadas por los genes *xylAB* que forman un operón (Gartner et al., 1988). Este operón está sujeto a dos mecanismos de regulación: 1) la proteína XylR reprime la transcripción de *xylAB* ya que se une al sitio del operador en su región promotora (Dahl et al., 1994). La unión de D-xilosa a XylR lo libera del sitio del operador y causa la inducción de los genes. 2) en presencia de glucosa como fuente de carbono, tanto *xylA* como *acsA* están sujetos a represión catabólica por carbono (RCC) (Grundy et al., 1994; Zalieckas et al., 1998; Kraus et al., 1994; Miwa et al., 2000).

B. subtilis puede utilizar acetato como fuente de carbono por la acción de la enzima acetil-CoA sintetasa, que es codificada por el gen *acsA* (Grundy et al., 1993).

En este trabajo el nivel de transcrito del gen *acsA* fue 4.28, 4.92 y 22 veces mayor en las cepas CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp, respectivamente (Tabla 7), con respecto a la cepa silvestre. En la cepa CVPTSGSp, el nivel de transcrito de los genes *xylA* y *xylB* incrementó 4.0 y 2.40 veces, respectivamente, mientras que en la cepa CVPTSGHISp los niveles de transcrito de estos genes fue de 67 y 47 veces mayor, respectivamente, comparado con la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que las

cepas CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp tienen el potencial para coutilizar glucosa y acetato, mientras que las cepas CVPTSGSp y CVPTSGHISp podrían coutilizar glucosa y xilosa. Sin embargo, aún falta determinar si estas cepas pueden transportar xilosa. Por otro lado, estos resultados muestran que la inactivación de *pykA*, *ptsG* o *ptsGHI* podría haber eliminado la RCC in *B. subtilis* para la utilización de acetato ó xilosa. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos para la mutante *ptsHI* (Ser46Ala), donde se eliminó parcial o completamente la RCC para los genes *xylA* y *acsA* (Dahl et al., 1994; Zalieckas et al., 1998). Este podría explicar el hecho de que la cepa CVPTSGHISp muestre un mayor nivel de transcripción, ya que carece de los genes *ptsGHI*.

7.4.5 Vía común de síntesis de compuestos aromáticos. En *B. subtilis*, la enzima DAHP sintasa es codificada por el gen *aroA* (Kunts et al., 1997). Los valores de RT-qPCR para *aroA* indican que no hubo cambios significativos en la expresión de este gen, con respecto a la cepa silvestre (Tabla 7). Este resultado sugiere que la acumulación diferencial de DAHP en las mutantes de *B. subtilis* 168 puede ser causada principalmente por una concentración diferente de los precursores PEP y/o E4P, como consecuencia de las modificaciones en el metabolismo central.

7.4.6 Gluconeogénesis y vía anaplerótica. La PEP carboxicinas (*pckA*) cataliza mediante una reacción gluconeogénica la conversión de OAA a PEP. Esta reacción es esencial cuando los organismos crecen en sustratos intermediarios del ciclo de TCA (Diesterhaft and Freese, 1973; Yoshida et al., 2001). Otras reacciones que son esenciales bajo estas mismas condiciones son las catalizadas por gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapB*) y fructosa-1,6-bifosfatasa (*fbp*). Las enzimas málicas catalizan la descarboxilación oxidativa reversible de malato en piruvato con la

concomitante reducción de NAD(P)⁺. En *B. subtilis*, existen 4 genes parálogos que codifican 4 probables isoformas de enzimas málicas: *ywkA*, *ytsJ*, *mals* y *mleA* (Doan et al., 2003). Se ha demostrado que YtsJ tiene el principal rol en la utilización y conversión de malato a piruvato (Lerondel et al., 2006). En este trabajo, comparado a la cepa silvestre, los niveles de transcrito de *pckA* y *gapB* fueron 3.68 y 3.44 veces más alto, respectivamente en la cepa CVPTSGSp, mientras que en la cepa CVPTSGHISp, los niveles de transcrito de *gapB* y *fbp* fueron 6.70 y 2.48 veces más alto que la cepa silvestre, respectivamente (Figura 9, Tabla 7). Estos resultados indican que estas dos cepas que carecen de componente(s) del sistema PTS, exhiben una parcial respuesta transcripcional gluconeogénica en la presencia de glucosa. Los niveles de transcrito de los genes *ytsJ* y *mals* se sobreexpresaron solamente en la cepa CVPYKSp, con respecto a la cepa silvestre, mientras que, *mleA* se sobreexpresó solamente en la cepa CVPTSGHISp. La cepa CVPYKSp carece de la enzima PykA; por lo tanto, la síntesis de piruvato a partir de PEP procede solamente vía el sistema de PTS. Sin embargo, los experimentos de transporte de glucosa reportaron que la actividad de PTS en esta cepa esta altamente reducida. Así que, se espera que la síntesis de piruvato a partir de PEP también esté disminuida. Este resultado coincide con el reporte de una mutante de *B. subtilis* Pyk⁻ similar a la cepa CVPYKSp crecida en medio mineral con glucosa, donde la concentración de piruvato intracelular está significativamente reducida (Fry et al., 2000). Este hecho podría ser una señal metabólica que origine una sobreexpresión de los genes *ytsJ* y *mals* en la cepa CVPYKSp, y en consecuencia, un probable nivel incrementado de la actividad de estas enzimas málicas para producir piruvato de malato. Se ha reportado que en mutantes de *E. coli* Pyk⁻ existe un flujo de carbono alto a través de las enzimas málicas (Emmerling et al., 2002). Así mismo, en mutantes de *Corynebacterium glutamicum* Pyk⁻ se ha detectado una respuesta similar (Becker et al.,

2008). En conclusión, el incremento de flujo de carbono a través de las enzimas málicas puede ser una respuesta metabólica común para compensar con la velocidad reducida de síntesis de piruvato a partir de PEP. En este trabajo, el nivel de transcrito de *pps*, que codifica la PEP sintasa fue muy bajo en todas las mutantes analizadas con respecto a la cepa silvestre (Figura 9, Tabla 7). Esta respuesta podría ser para reducir la síntesis de PEP a partir de piruvato y así evitar la depleción de este último.

7.5. Generar mediante un cultivo lote con glucosa, a partir de cepas de *B. subtilis* que carecen de piruvato cinasa y del sistema de fosfotransferasa PTS, cepas derivadas que muestren una mayor velocidad de crecimiento con respecto a las cepas parentales como resultado de un proceso de evolución adaptativa.

En el grupo de investigación de los Dres. Francisco Bolívar y Guillermo Gosset se han desarrollado estrategias para generar cepas mutantes derivadas con la capacidad de utilizar rápidamente glucosa a partir de mutantes con la capacidad reducida de transportar glucosa porque carecen del sistema de fosfotransferasa PTS. Son dos las estrategias que se han aplicado para lograr este objetivo. 1) la selección de cepas mutantes que crecen mas rápidamente en MM con glucosa utilizando un sistema de cultivo continuo con tasas de dilución progresivamente mayores ($D = 0.4 - 0.8 \text{ h}^{-1}$) (Flores et al., 1996) y 2) la expresión de genes que codifican para la proteína transportadora GalP y la enzima glucocinasa (Glk) (Hernández-Montalvo et al 2003).

7.5.1 Evolución adaptativa a través de cultivos lote secuenciales. En este trabajo, las cepas mutantes CVPTSGHISp y CVPYKSp de *B. subtilis* que carecen del sistema PTS o la enzima PykA, respectivamente, fueron sometidas a un proceso de selección mediante cultivos lote secuenciales para obtener cepas mutantes que adquirieron nuevamente la capacidad de crecer rápidamente con glucosa como única fuente de carbono (cepas evolucionadas).

La unidad experimental que se utilizó en este tipo de cultivos fue un matraz bafleado de 250 ml con 25 ml de MM con 8 g/l de glucosa, suplementado con Sp y triptofano. La temperatura de incubación y agitación fueron 37° C y 300 rpm, respectivamente. Los cultivos iniciales con las cepas CVPTSGHISp y CVPYKSp, se

prepararon por duplicado bajo las condiciones descritas en la sección 6.4, excepto que la DO_{600nm} inicial fue de 0.01. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600nm} de 1.47 y 1.41 para las cepas CVPTSGHISp y CVPYKSp, respectivamente, se utilizaron como inóculos para empezar los cultivos secuenciales (figuras 10 y 21). Para cambiar de un pase a otro, se consideró que el crecimiento del cultivo estuviera en la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente una $DO_{600nm} = 1.0 - 1.5$). Se preparó una muestra de células de cada pase bajo condiciones asépticas con muestras de 1ml. El banco se guardó en crioviales conteniendo 1 ml de glicerol al 80%, las suspensiones se mezclaron con ayuda de un vórtex y se congelaron sobre hielo seco e inmediatamente se almacenaron a $-70^{\circ} C$.

7.5.2 Cultivos lote secuenciales con la cepa CVPTSGHISp. En la figura 10 se muestran cultivos secuenciales de la cepa CVPTSGHISp. El cultivo inicial de la cepa CVPTSGHISp requirió de 48 horas para alcanzar una DO_{600nm} de 1.47, mientras que el primer pase alcanzó una DO_{600nm} de 1.44 en 21 horas (Figura 10). En los pases posteriores se observa que el tiempo que se requirió para alcanzar una DO_{600nm} de aproximadamente 1.5 siguió disminuyendo hasta alcanzar 14 horas (Figura 10). Este resultado representó una recuperación significativa en la velocidad de crecimiento de esta cepa, tal vez como resultado de un proceso de evolución adaptativa.

Evolución adaptativa de la cepa CV8PTS

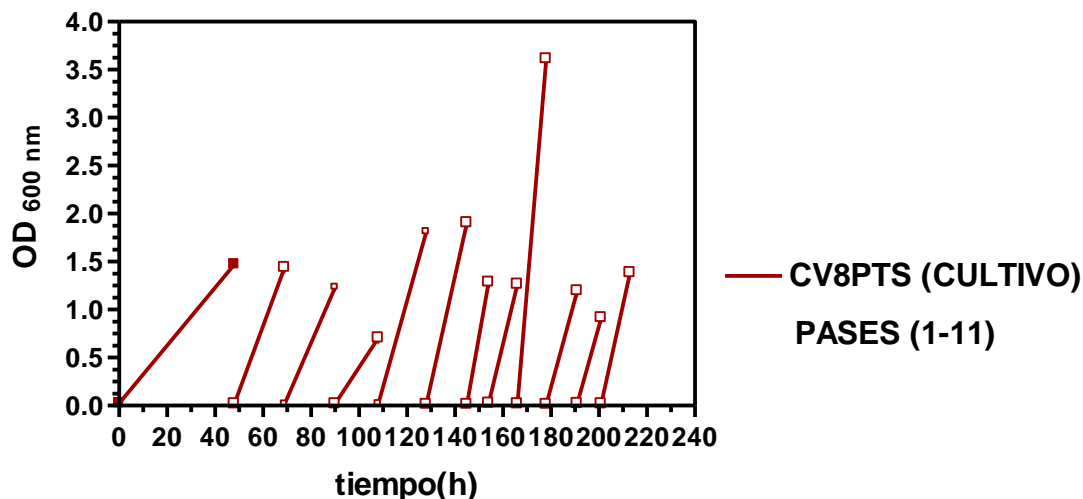


Figura 10. Cultivos lote secuenciales de la cepa CVPTSGHISp. (■) cultivo inicial de la cepa CVPTSGHISp, (□) pases secuenciales 1-11 de la cepa CVPTSGHISp.

7.5.3 Dinámica de la evolución de la cepa CVPTSGHISp. Para conocer la dinámica de la evolución de la cepa CVPTSGHISp se compararon los valores de las μ de 70 colonias aisladas evolucionadas con respecto a las cepas CVPTSGHISp y *B. subtilis* 168 (Figura 11). Las 70 colonias aisladas se obtuvieron de las muestras de células de cada pase. Específicamente, se aislaron 10 colonias de los pases 2 al 8 (en condiciones asépticas, se resuspendió una asada de la muestra congelada en 1 ml de LB, se efectuaron diluciones; se sembraron 100 y 50 μ l de cada dilución sobre placas de LB con Sp para obtener colonias aisladas). De cada pase, se seleccionaron al azar 10 colonias y de cada colonia se prepararon gliceroles, éstos se almacenaron a -70 °C.

Se realizó la caracterización individual de las 70 colonias aisladas en MM con glucosa 8 g/l, las condiciones de cultivo fueron similares a las ya descritas en la sección 6.4. Se calcularon las μ para cada colonia aislada, los valores de éstas se muestran en la figura 11.

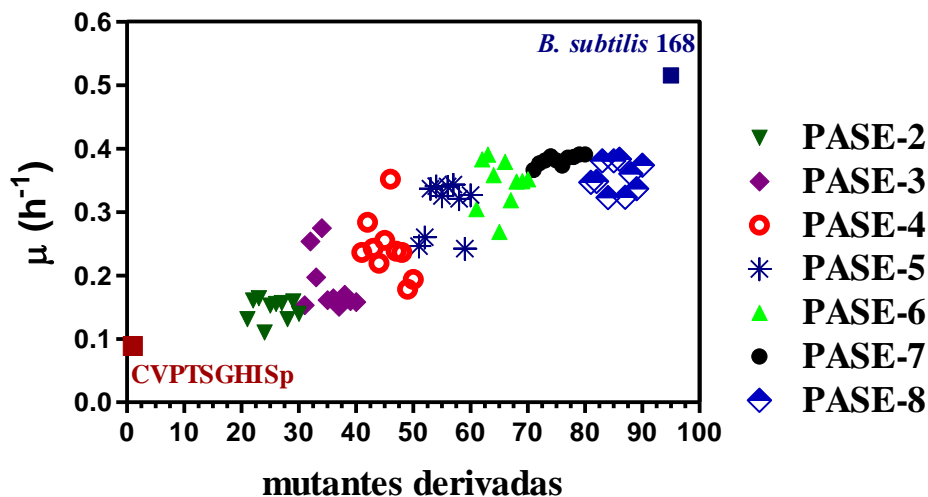


Figura 11. Dinámica de la evolución adaptativa de la cepa CVPTSGHISp que incluye la caracterización en MM con glucosa de 70 colonias aisladas evolucionadas. (■ CVPTSGHISp, ■ *B. subtilis* 168).

En el eje x se muestran las 70 colonias aisladas derivadas de los pases 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En el eje y se muestran los valores de la μ correspondientes a cada colonia evolucionada, así como para la cepa mutante CVPTSGHISp (0.09) y la cepa silvestre *B. subtilis* 168 (0.52). En la figura 11, se puede observar que a medida que transcurrieron los pases, la μ correspondiente a las colonias aisladas se incrementó con respecto a la tasa obtenida para la cepa mutante CVPTSGHISp, hasta alcanzar un valor casi constante. Sin embargo, este valor fue menor con respecto al obtenido para la cepa silvestre *B. subtilis* 168 correspondiendo al 65% aproximadamente. Es decir, en este experimento no se encontraron derivadas con una μ similar a la observada para la cepa silvestre (Figura 11).

En los pases 2 al 6 y el pase 8 se observó que las colonias presentaron valores diferentes de μ , lo que sugiere que dentro de cada pase hay una población heterogénea de cepas mutantes. Mientras que en el pase 7, las 10 colonias mostraron valores de μ similares, lo que sugiere una población más homogénea (Figura 11). En el pase 4, se observa una colonia con una velocidad de crecimiento mayor respecto al resto de las

derivadas analizadas en ese cultivo y similar a las obtenidas para los pases 5, 6 y 7 (Figura 11).

Bajo estas condiciones experimentales, el mejoramiento de la μ en las cepas derivadas fue inicialmente rápido pero se desaceleró en función del tiempo. Esta dinámica indica que las poblaciones, después de ser puestas en un nuevo ambiente, están evolucionando de una región de baja μ hacia un pico adaptativo.

7.5.4 Selección y caracterización cinética de 5 cepas evolucionadas en medio mineral con glucosa. En una primera etapa, se seleccionaron 5 cepas evolucionadas de los pases 4, 5, 6, 7 y 8; que se denominaron CV846, CV857, CV863, CV879 y CV86, respectivamente. Estas mutantes evolucionadas se caracterizaron en MM con glucosa, se determinó el crecimiento, consumo de glucosa, producción de ácido acético y acetoína (Figura 12). Para ello, se realizaron cultivos en matraces de 250 ml con 50 ml de MM suplementado con 8 g/L de glucosa.

La cepa silvestre, a las 15 horas de cultivo no consumió toda la glucosa adicionada, la mutante CVPTSGHISp consumió casi los 8 g/l de glucosa a las 48 horas del cultivo, mientras que las cepas evolucionadas a las 20 horas de cultivo consumieron toda la glucosa adicionada. En estas cepas también se eliminó significativamente la fase lag de crecimiento que presentó la cepa CVPTSGHISp (Figura 12).

Bajo estas condiciones se determinaron los parámetros cinéticos: μ y q_{Glc} . La tabla 8 muestra los resultados que son el promedio de dos experimentos independientes. Las cepas evolucionadas CV846, CV857, CV863, CV879 y CV886 exhibieron una μ correspondiente al 65, 67, 65, 64 y 65 %, respectivamente al compararse con la cepa *B. subtilis* 168 (Tabla 8), mientras que los valores de q_{Glc} fueron de $0.97 \text{ g}_{Glc}\text{g}_{DCW}^{-1}\text{h}^{-1}$ para la cepa silvestre y del 70, 59, 61, 70 y 64% para las cepas CV846, CV857, CV863, CV879 y CV886, respectivamente (Tabla 8). El aumento en las tasas de crecimiento y

de consumo de glucosa de las cepas evolucionadas sugiere que estas cepas incrementaron el flujo glucolítico con respecto a la cepa CVPTSGHISp. Estos resultados correlacionan con los obtenidos para una cepa PTS^-gluc^+ de *E. coli* (PB12) que se obtuvo en nuestro laboratorio a través de un método de cultivo continuo; a partir de la caracterización en MM con glucosa se reportó que la tasa de crecimiento obtenida para la cepa evolucionada PB12 correspondió a un 60% con respecto a la cepa silvestre de *E. coli* (Flores et al., 1996). Por lo tanto, ambas cepas evolucionadas de *E. coli* y *B. subtilis* recuperaron el crecimiento en magnitud similar.

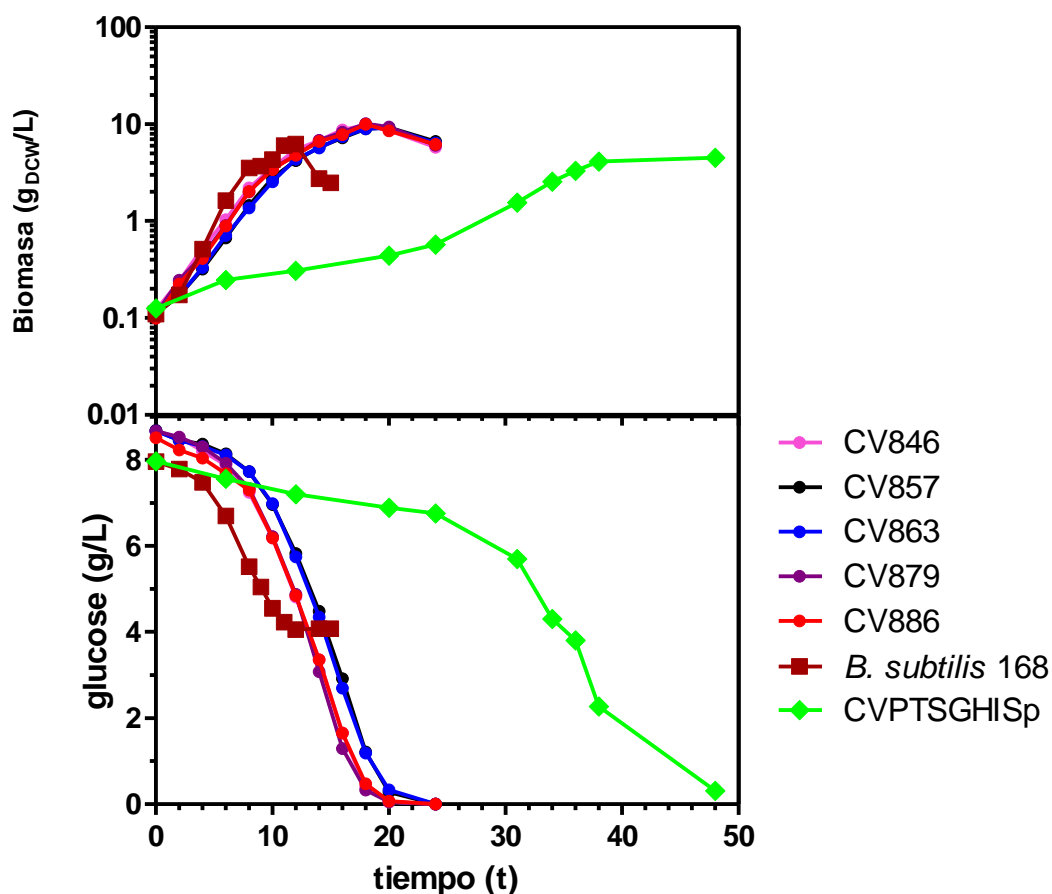


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre *B. subtilis* 168, mutante CVPTSGHISp y de 5 cepas evolucionadas en MM con glucosa 8 g/L. Los resultados obtenidos son el promedio de dos experimentos independientes.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la cepa silvestre *B. subtilis* 168, mutante CVPTSGHISp y de 5 cepas evolucionadas en MM con glucosa 8 g/L. Los resultados obtenidos son el promedio de dos experimentos independientes.

Cepas	μ (h ⁻¹)	porcentaje (%)	q_{Glc} ($\frac{g_{Glc}}{g_{DCW}} \cdot h^{-1}$)	Porcentaje (%)
<i>B. subtilis</i> 168	0.52	100	0.97	100
CVPTSGHISp	0.09	17	0.41	17.33
CV846	0.34	65	0.68	70
CV857	0.35	67	0.57	59
CV863	0.34	65	0.59	61
CV879	0.33	64	0.68	70
CV886	0.34	65	0.62	64

Otro dato interesante es que a pesar de mejorar su tasa de crecimiento y de consumo de glucosa, no se detectó la producción de ningún ácido orgánico por HPLC (datos no mostrados).

Como se muestra en la figura 4. La cepa silvestre produjo ácido acético y acetoína, en la misma figura la cepa mutante CVPTSGHISp sólo produjo acetoína. Este resultado es importante desde el punto de vista de aplicación industrial, ya que la producción de algún subproducto, entre ellos el ácido acético resulta desfavorable para el crecimiento y rendimiento de algún producto por microorganismos (Shuler and Kargi, 1992; De Anda et al., 2006). Interesantemente, la no acumulación de ácido acético y acetoína correlaciona con un incremento en la concentración celular de las cepas evolucionadas en MM con glucosa (Figura 12).

Estos datos preliminares nos permiten concluir que entre las cepas; silvestre *B. subtilis* 168, mutante CVPTSGHISp y las cepas evolucionadas CV846, CV857, CV863, CV879 y CV886 la distribución del flujos de carbono en el metabolismo central es diferente.

7.5.5 Selección y caracterización cinética de 10 cepas evolucionadas en medio mineral con xilosa y una mezcla de glucosa-xilosa, glucosa-xilosa-arabinosa como fuentes de carbono.

B. subtilis 168 no puede utilizar xilosa como única fuente de carbono ya que carece de un transportador específico para incorporarla, pero si puede metabolizarla por acción de las enzimas XylAB. Como parte de la caracterización de las 70 mutantes derivadas, se sembraron las cepas en placas con MM suplementado con xilosa como única fuente de carbono. De este experimento, se identificó que algunas cepas evolucionadas crecieron bajo estas condiciones de cultivo. Es decir, en el proceso de evolución adquirieron la capacidad de transportar xilosa. Este resultado es interesante, porque el proceso de adaptación de la cepa CVPTSGHISpo fue en MM con glucosa como única fuente de carbono.

Se estudió en detalle el patrón de crecimiento de 10 cepas evolucionadas CV842, CV844, CV846, CV849, CV854, CV857, CV861, CV863, CV879 y CV886 en MM suplementado con 8 g/L de xilosa. El resultado se presenta en la figura 13. Al comparar el crecimiento entre las cepas evolucionadas, observamos que las cepas CV842, CV844 y CV854 al igual que la cepa silvestre no pueden utilizar xilosa como única fuente de carbono (Figura 13). Mientras que las cepas CV846, CV849, CV857, CV861, CV863, CV879 y CV886 sí crecieron en MM con xilosa como única fuente de carbono (Figura 13).

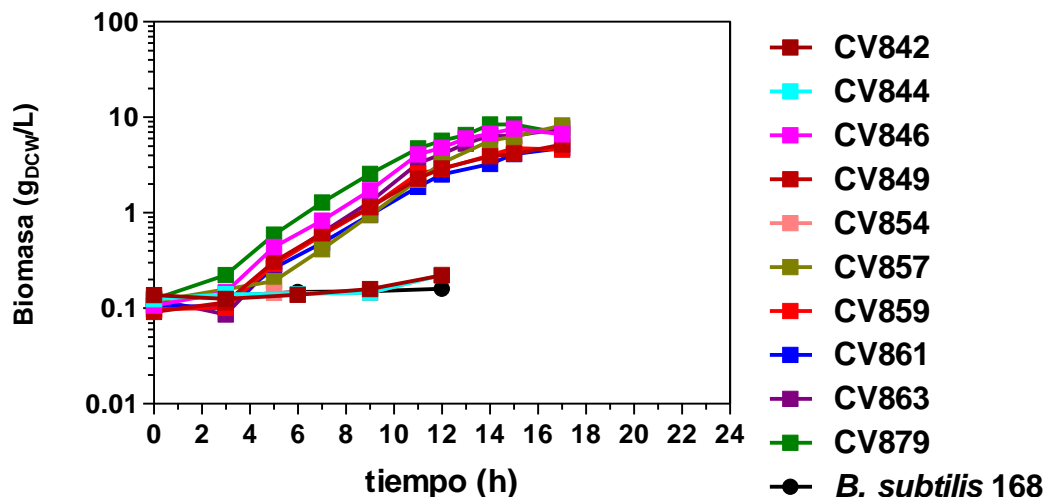


Figura 13. Cultivo de 10 cepas evolucionadas en MM con 8 g/L de xilosa como única fuente de carbono y energía.

También se estudió el patrón de crecimiento para algunas de las cepas evolucionadas en mezclas de glucosa-xilosa y glucosa-xilosa-arabinosa como fuentes de carbono y energía. Los resultados se muestran en las figuras 14 y 15, respectivamente. A diferencia de los resultados obtenidos en MM con xilosa como única fuente de carbono, las cepas CV842, CV844, CV854 y la cepa silvestre *B. subtilis* 168 sí crecieron desde el inicio del cultivo en MM suplementado con una mezcla de glucosa-xilosa (4 g/L de cada fuente de C) (Figura 14). Esto sugiere que la glucosa induce la síntesis de algún transportador que puede internalizar a la xilosa. Bajo esta condición de cultivo, la cepa silvestre consumió toda la glucosa durante las primeras 10 horas, y posteriormente presentó una fase lag de aproximadamente 4 horas antes de consumir lentamente toda la xilosa. Estos resultados, muestran un crecimiento de tipo diáuxico, como resultado de la RCC de glucosa sobre xilosa. En contraste, bajo esta condición de cultivo, las cepas CV842, CV844 y CV854 cutilizaron ambas fuentes de carbono, posiblemente debido a la reducción o eliminación de la RCC en estas cepas (Figura 14).

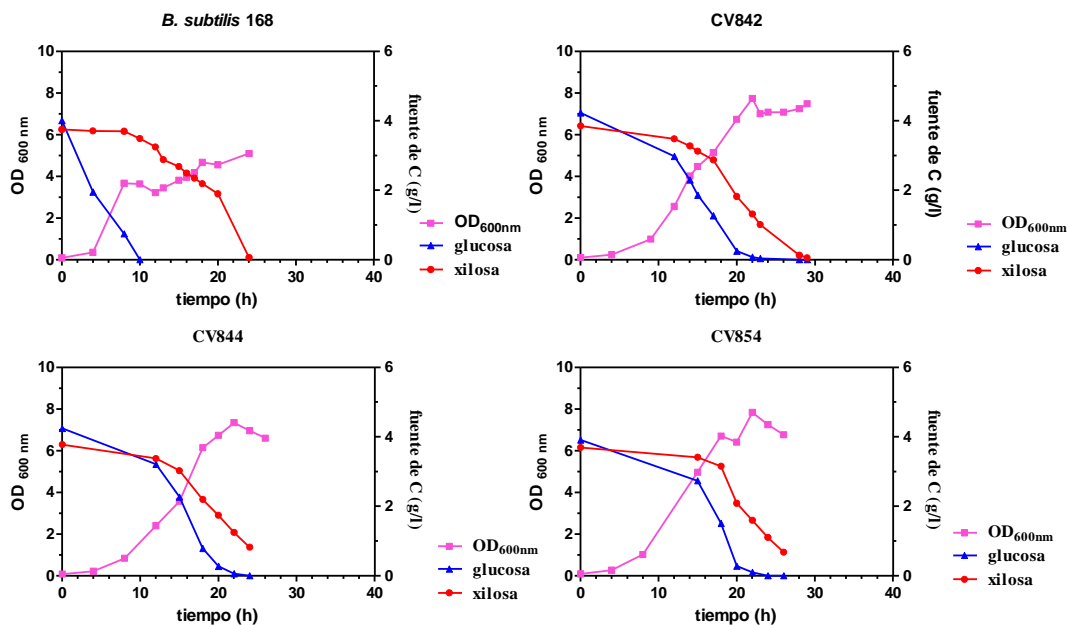


Figura 14. Cinéticas de crecimiento y utilización de fuentes de carbono de la cepa silvestre *B. subtilis* 168 y de 3 cepas evolucionadas (CV842, CV844 y CV854) en MM con una mezcla de glucosa - xilosa.

Las cepas CV846, CV849, CV857, CV861, CV863, CV879 y CV886 que pueden crecer en MM suplementado con glucosa o xilosa como únicas fuentes de carbono y energía (Figuras 12 y 13) presentaron un consumo simultáneo de glucosa-xilosa, en cultivos con ambas fuentes de carbono (datos no mostrados).

En la figura 15 se muestra el patrón de utilización de glucosa y xilosa por la cepa CV846 (el inóculo que se utilizó para este cultivo fue adaptado en xilosa). Estos datos indican que en esta cepa evolucionada también ocurrió una reducción importante en la RCC por glucosa.

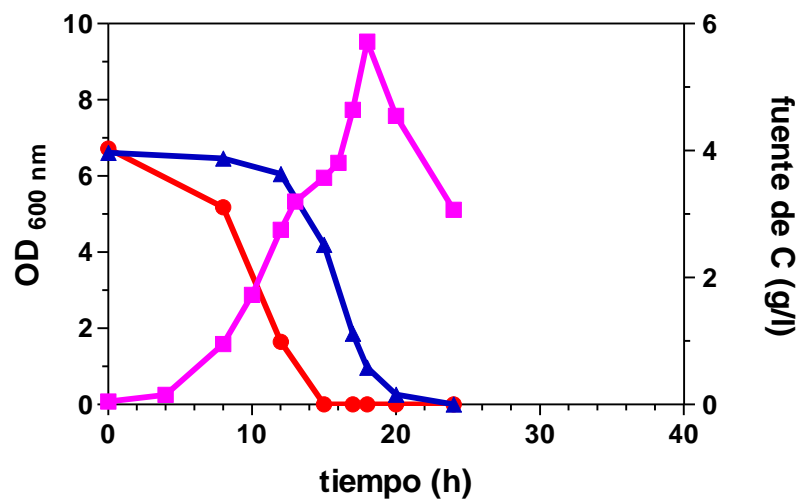


Figura 15. Cinética de crecimiento y utilización de fuentes de carbono en MM con una mezcla de glucosa - xilosa de la cepa evolucionada CV846. (■) OD_{600nm}; (▲) glucosa g/l; (●) xilosa g/l.

En cultivos con la cepa CV846 en MM suplementada con una mezcla de glucosa-xilosa-arabinosa (4 g/L de cada fuente de carbono) se observó la utilización simultánea de las tres fuentes de carbono (Figura 16).

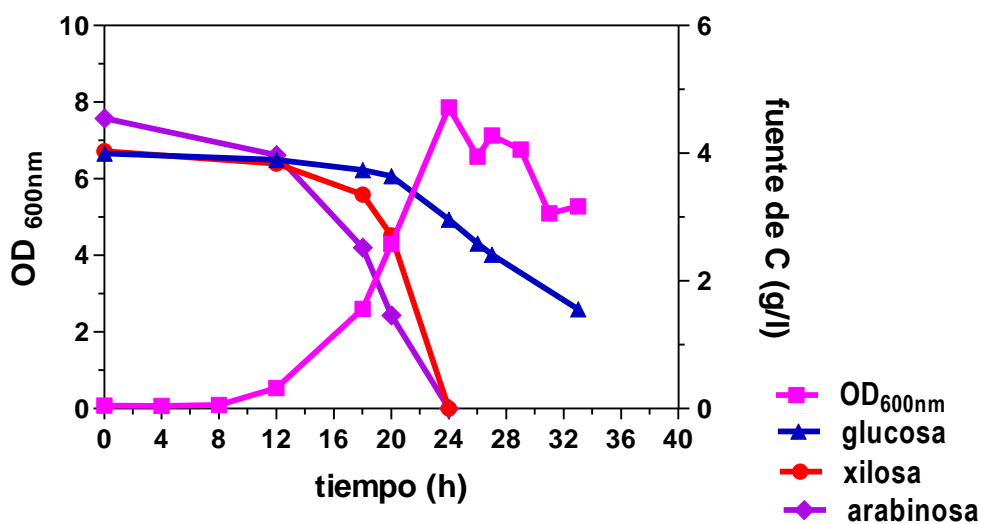


Figura 16. Cinética de crecimiento y utilización de fuentes de carbono en MM con una mezcla de glucosa - xilosa - arabinosa de la cepa evolucionada CV846.

Las propiedades adquiridas por estas cepas evolucionadas, plantea la posibilidad de utilizarlas en medios de cultivo que contengan hidrolizados de residuos agroindustriales como materia prima, los cuales contienen xilosa, glucosa y arabinosa. Considerando estos resultados, se ha planeado generar cepas para la producción de ácido láctico, un compuesto con aplicaciones industriales. Se espera que las cepas evolucionadas muestren un mejor desempeño en condiciones de producción, debido a su capacidad de consumir simultáneamente xilosa y glucosa.

7.5.6 Identificación de GlcP como probable transportador de glucosa y xilosa en las cepas evolucionadas.

Se ha reportado que el transportador GlcP internaliza glucosa en *B. subtilis* (Paulsen et al., 2009). Para probar si este transportador internaliza glucosa y xilosa en las cepas evolucionadas, se contruyeron mutantes, que tienen interrumpido el gen *glcP* en las cepas evolucionadas CV842, CV844, CV846, CV849, CV854, CV857, CV859, CV861, CV863 y CV879 así como en la cepa silvestre *B. subtilis* 168 (ver sección 6.5).

El efecto de la inactivación del transportador GlcP en las cepas evolucionadas sobre la utilización de glucosa o xilosa como fuente de carbono, se analizó en placas de MM suplementadas con glucosa ó xilosa como única fuente de carbono, las placas se incubaron por 24 horas a 37° C. Los resultados del crecimiento de las 11 cepas se muestran en tabla 9.

Estos resultados muestran que GlcP, codificada por el gen *glcP*, sí transporta glucosa o xilosa en algunas de las cepas evolucionadas, como la cepa CV846. Sin embargo, los resultados presentados en la tabla 9, sugieren la existencia de uno o más transportadores que adquirieron esta capacidad, ya que algunas derivadas que carecen de *glcP* sí crecieron tanto en glucosa como en xilosa.

Tabla 9. Crecimiento de la cepa silvestre *B. subtilis* 168 y de 10 cepas evolucionadas que tienen interrumpido el gen *glcP*. En placas con medio MM suplementado con glucosa o xilosa como fuente de carbono.

Mutantes <i>glcP</i>	Genotipo	Crecimiento en MM con glucosa	Crecimiento en MM con xilosa
168P	<i>B. subtilis</i> 168 <i>trpC2</i> $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	Si	No
CV842P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	Si	No
CV844P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	Si	No
CV846P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	No	No
CV849P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	Si	Si
CV854P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	Si	No
CV857P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	Si	Si
CV859P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	No	Si
CV861P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	No	Si
CV863P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	No	Si
CV879P	Evolucionada $\Delta(glcP)::loxP$ Sp	Si	Si

Se seleccionó a la cepa CV846P (*glcP*) para realizar una caracterización más detallada en un matraz con 50 ml de MM suplementado con glucosa o xilosa 8 g/L como única fuente de carbono. Los resultados se presentan en la figura 17. Se utilizó como control a la cepa CV846 (Figura 17).

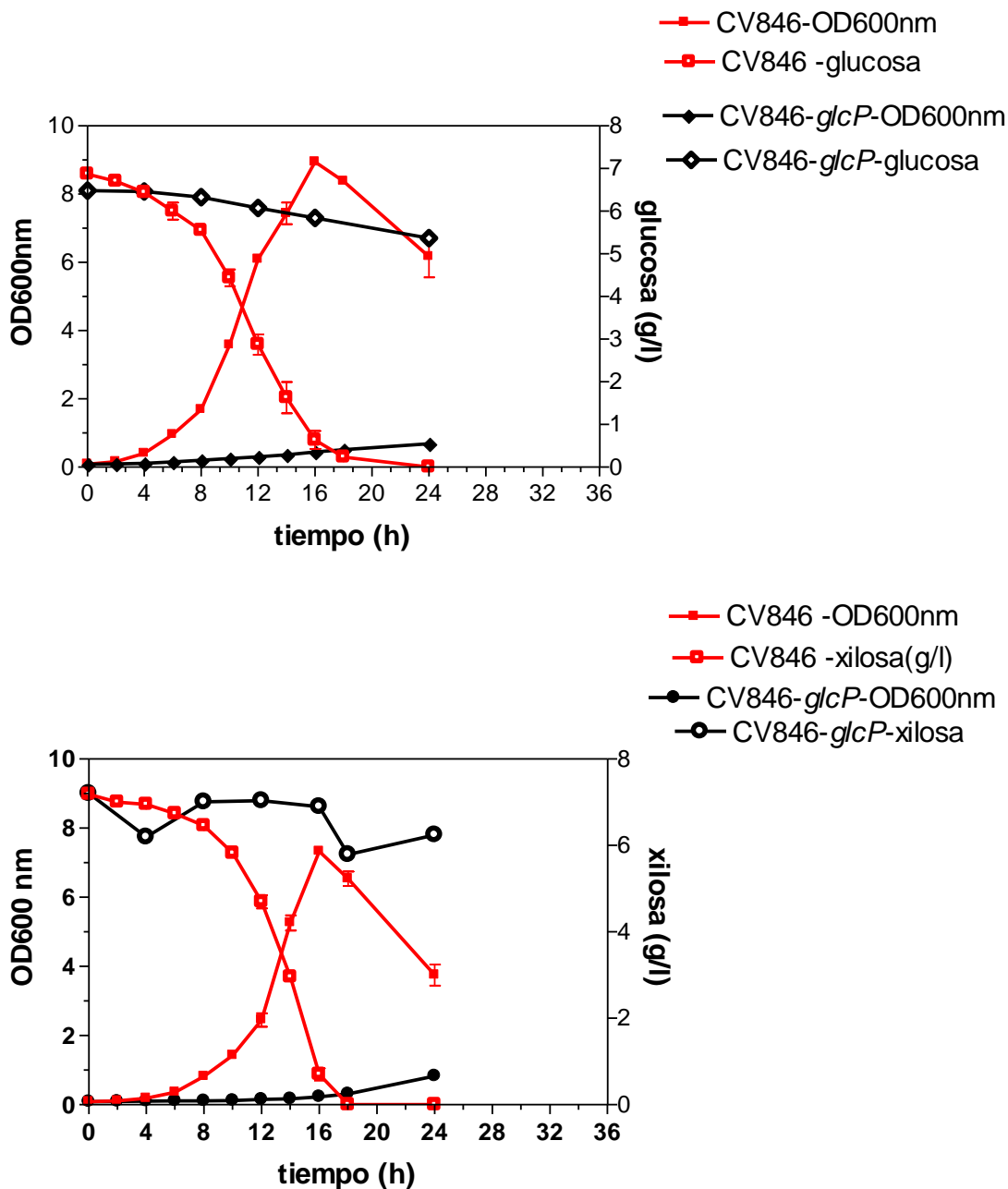


Figura 17. Cinéticas de crecimiento y utilización de glucosa o xilosa de la cepa CV846P (*glcP*) en MM. Se utilizó como control a la cepa CV846.

La cepa CV846P no creció durante las primeras 24 horas de cultivo. De este resultado podemos inferir que esta cepa evolucionada perdió su capacidad de utilizar glucosa y xilosa como única fuente de carbono al inactivar el gen *glcP*. Estos datos sugieren que en la cepa evolucionada CV846 de *B. subtilis*, la proteína GlcP es un

transportador de glucosa y xilosa. Este resultado concuerda con lo publicado por Paulsen et al (1999), quienes demostraron que el gen *glcP* es un transportador para glucosa en *B. subtilis*. Sin embargo, este es el primer trabajo, que demuestra que GlcP también es un transportador para xilosa en *B. subtilis*.

7.5.7 Efecto de las mutaciones en el metabolismo central y del proceso de evolución sobre la producción de DAHP.

Para estudiar el efecto de la eliminación de PTS que consume PEP y el proceso de evolución adaptativa sobre la magnitud del flujo de carbono disponible hacia la vía común de síntesis de los compuestos aromáticos, se inactivó el gene *aroB* en las derivadas CV842, CV844, CV846, CV849, CV854, CV857, CV859, CV861, CV863 y CV879 así como en la cepa silvestre *B. subtilis* 168 (ver secciones 6.4 y 6.5). Las mutantes que tienen interrumpido el gen *aroB* se denominaron: CV842B, CV844B, CV846B, CV849B, CV854B, CV857B, CV859B, CV861B, CV863B, CV879 y 168B.

Para determinar el rendimiento de DAHP en estas cepas, se realizaron cultivos utilizando MM con glucosa y extracto de levadura (ver sección 7.5.1). Todas las cepas evolucionadas acumularon DAHP, a una concentración similar a la producida por su cepa parental, CVPTSGHIB (datos no mostrados). Con base en este resultado, podemos suponer que en estas cepas mutantes evolucionadas podría suceder el mismo fenómeno que comentamos en la sección 7.4 para la cepa CVPTSGHISp. Es decir, que en las cepas evolucionadas el flujo de carbono en forma de PEP se dirige preferentemente hacia la síntesis de piruvato a través de la enzima piruvato cinasa y finalmente, hacia la vía de los ácidos tricarboxílicos. Este resultado indica que el proceso de evolución adaptativa no tuvo un efecto sobre la disponibilidad de PEP.

7.5.8 Efecto de las mutaciones en el metabolismo central y del proceso de evolución sobre la expresión de proteína verde fluorescente.

Se sabe que la acumulación de ácido acético a cierta concentración es tóxica para los microorganismos; debido a que puede inhibir el crecimiento celular (Shuler and Kargi, 1992). En este contexto, el resultado de varios trabajos ha demostrado que cepas de *E. coli* y *B. subtilis* modificados por IVM alcanzaron densidades celulares y productividades de proteína recombinante altas, al reducir la acumulación de ácido acético (De Anda et al., 2006; Pai et al., 2010; March et al., 2002; Bauer et al., 1990; Kim et al., 2003; San et al., 1994; Vemuri et al., 2006).

En este trabajo, la caracterización de varias cepas evolucionadas de la mutante CVPTSGHISp que carece del sistema PTS, en MM con glucosa, nos revelaron un incremento en la tasa de crecimiento y de consumo de glucosa, así como una mayor concentración de biomasa con respecto a su cepa parental. Al igual que la cepa CVPTSGHISp, estas derivadas evolucionadas no acumularon ácido acético. Estos resultados son interesantes y sugieren que las cepas evolucionadas podrían ser buenas candidatas para la producción de proteína recombinante ya que, el ácido acético no sólo inhibe el crecimiento celular si no que también causa un efecto negativo sobre la producción de proteína recombinante (Jensen and Carlsen, 1990; Hahm et al., 1994).

Para probar esta hipótesis, se seleccionaron 4 cepas evolucionadas CV842, CV846, CV863 y CV879 así como *B. subtilis* 168 y la cepa CVPTSGHISp. Se transformaron con el plásmido pSSBm85, este sistema de expresión tiene el gen *gfp* que codifica para la proteína verde fluorescente y fue diseñado para ser utilizado en *B. megaterium* (Stammen et al., 2010). La expresión del gen *gfp* está bajo el control del promotor del gen *xylA* de *B. megaterium*. Por esta razón, el inductor para la expresión

del gen *gpf* es xilosa, mientras que en la ausencia del inductor, la expresión del gen es mediada por el represor XylR.

Como parte inicial de este estudio, buscamos verificar si el plásmido pSSBm85 se puede replicar en *B. subtilis* y además expresa el gen *gfp*. Sin embargo, es condición necesaria que las cepas transporten xilosa para que expresen este gen. Por lo tanto, se espera que este sistema no se exprese en la cepa silvestre *B. subtilis* 168, pero sí en las cepas evolucionadas CV846, CV863 y CV879 ya que estas derivadas adquirieron la capacidad de incorporar xilosa (Figura 13).

Se realizaron cultivos con las cepas evolucionadas CV842, CV846, CV863, CV879, *B. subtilis* 168 y CVPTSGHISp transformadas con el plásmido pSSBm85 en tubos de ensayo con 5 ml de MM con 2 g/l de xilosa como fuente de carbono, la cual serviría como inductor desde el inicio del cultivo. Además, se estudiaron 3 concentraciones de tetraciclina (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y un cultivo sin antibiótico. Las cepas que no pueden transportar xilosa (*B. subtilis* 168, CVPTSGHISp y CV842) presentaron un crecimiento deficiente, el cual no incrementó en función del tiempo (datos no mostrados), mientras que las cepas evolucionadas CV846, CV863 y CV879 crecieron en la condición sin antibiótico, con 5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de tetraciclina, mientras que en 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de tetraciclina presentaron un crecimiento deficiente (Figura 18).

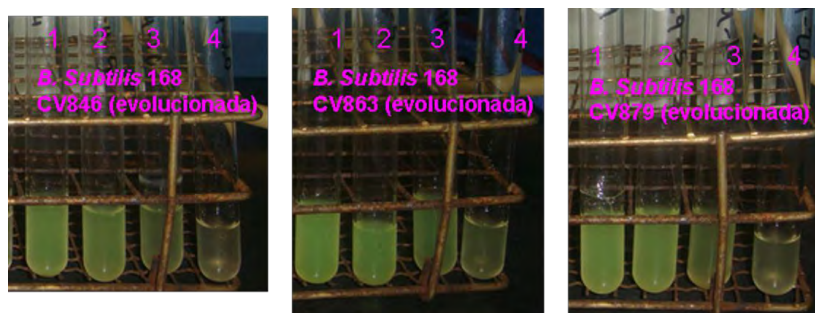


Figura 18. Cultivos de las cepas evolucionadas CV846, CV863 y CV879 que expresa el gen *gfp* a través del plásmido pSSBm85 en MM con xilosa 2 g/l. (1) sin antibiótico; (2) 5 µg/µl de tetraciclina; (3) 10 µg/µl de tetraciclina y (4) 20 µg/µl de tetraciclina.

Con este experimento se comprobó que el plásmido pSSBm85 se replicó en todas estas cepas de *B. subtilis*. Sin embargo, se observó que con 10 y 20 µg/µl de tetraciclina en MM, las cepas mostraron un crecimiento deficiente. Las cepas CV846, CV863 y CV879 que pueden utilizar xilosa como fuente de carbono, expresaron el gen *gfp* que codifican para la proteína verde fluorescente.

Estas cepas servirán de base a futuros proyectos que conlleven al estudio de producción de proteína recombinante con glucosa, xilosa, arabinosa y mezclas de estas fuentes de carbono.

7.5.9 Efecto de las mutaciones en el metabolismo central y del proceso de evolución sobre la producción de ácido láctico en condiciones de fermentación.

Se ha reportado que en medios ricos con glucosa, *B. subtilis* produce grandes cantidades de ácido láctico, como producto de fermentación (Espinosa de los Monteros et al., 2001). El gen presente en *B. subtilis* codifica para una L-lactato deshidrogenasa. En varios estudios se logró obtener L-lactato, ópticamente puro, con altos rendimiento de conversión de glucosa, celobiosa, fructosa, sacarosa y arabinosa en este producto (Romero et al., 2007; Ofelia Edith Carreón Rodríguez., 2010).

En este trabajo, se evaluó la capacidad de crecimiento y producción de ácido láctico por la cepa evolucionada CV846 en medio rico LB suplementado con 10 g/l de glucosa, 10 g/l de xilosa y mezclas de glucosa-xilosa (5 g/l cada fuente de carbono) y glucosa-xilosa-arabinosa (4 g/l cada fuente de carbono) en condiciones de fermentación, con respecto a las cepas *B. subtilis* 168 y CVPTSGHISp en medio rico LB suplementado con 10 g/l de glucosa (Figura 19).

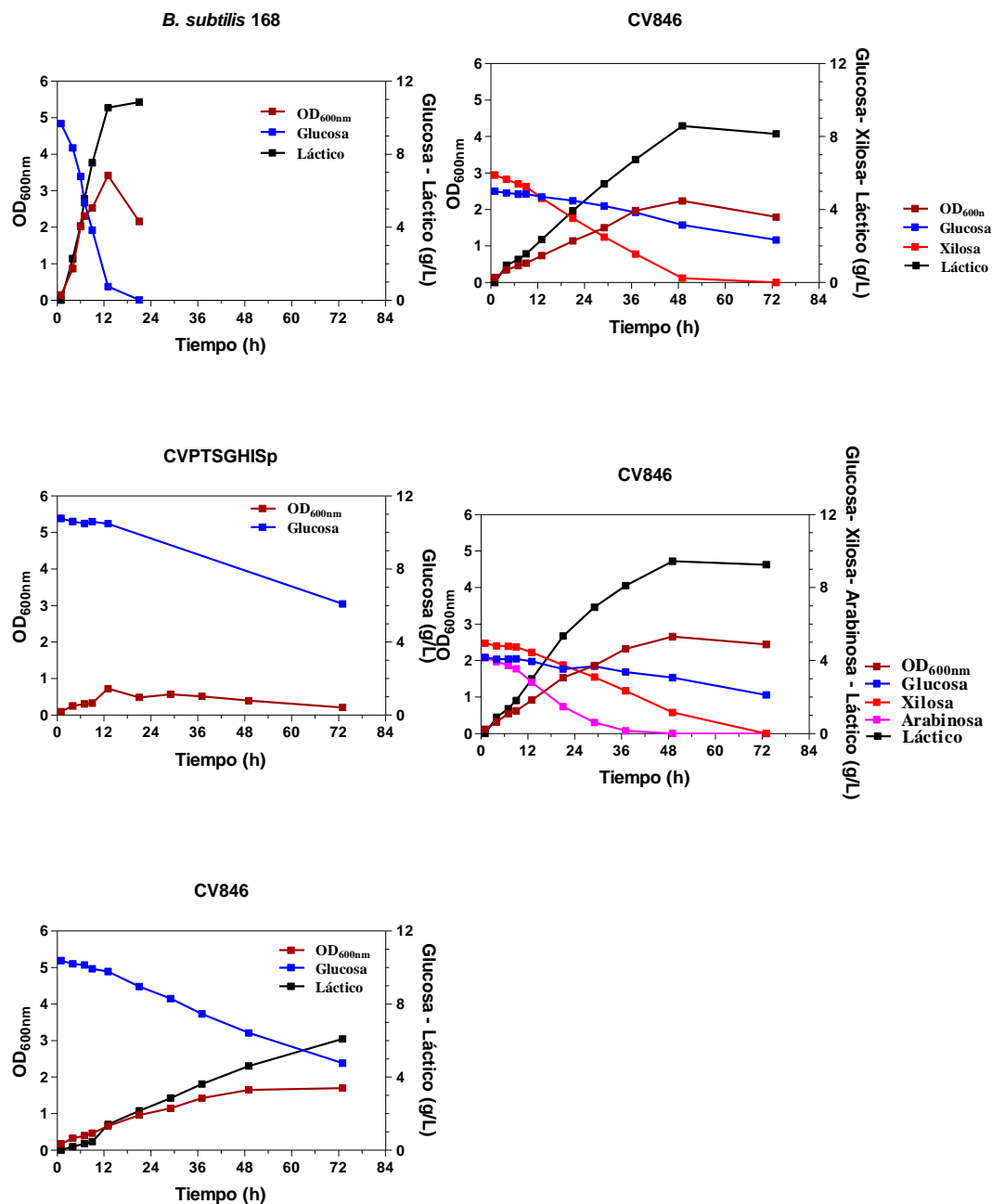


Figura 19. Cinéticas de crecimiento de las cepas *B. subtilis* 168, CVPTSGHISp y CV846 así como el patrón de utilización de fuentes de carbono de la cepa evolucionada CV846 en medio rico LB suplementado con mezclas de glucosa-xilosa y glucosa-xilosa-arabinosa en condiciones anaeróbicas.

En estas condiciones, se observó que la cepa silvestre de *B. subtilis* presentó tasas de crecimiento, consumo de glucosa y de producción de ácido láctico mayores con respecto a la cepa evolucionada CV846, mientras que la cepa CVPTSGHISp no creció.

La cepa silvestre consumió los 10 g/L de glucosa a las 20 horas de cultivo y produjo 10.9 g/L de L-lactato, óptimamente puro, con un rendimiento de conversión mayor al 100% de glucosa en este producto. El exceso lo produce probablemente los nutrientes proporcionados por el medio complejo utilizado (Figura 19). La cepa evolucionada CV846, creció en todas las fuentes de carbono utilizadas. Sin embargo, consumió 5.6 g/L de glucosa versus 9.5 g/L de xilosa consumida a las 72 horas de cultivo (Figura 19). Con respecto al patrón de utilización de xilosa, glucosa y arabinosa en la mezclas, éste fue similar al presentado por esta cepa en condiciones aeróbicas (Figuras 15 y 16).

En general, los resultados obtenidos de este experimento son relevantes porque mostraron que la cepa evolucionada CV846 de *B. subtilis* sí creció en condiciones de fermentación tanto con glucosa como con xilosa, mientras que su cepa ancestral, la mutante CVPTSGHISp (*ptsGHT*), no creció bajo estas condiciones. Este resultado puede ser producto del proceso de evolución.

Por otro lado, en medios minerales de glucosa y piruvato, se han identificado acetato, etanol, lactato y pequeñas cantidades de acetoina y 2,3-butanodiol como principales productos de fermentación (Nakano et al., 1997; Nakano y Zuber, 1998), sin embargo bajo las mismas condiciones de cultivo, Cruz Ramos et al (2001) identificaron la presencia de lactato, acético y 2-3 butanodiol como únicos productos de fermentación.

Romero-García (2007) y Ofelia Edith Carreón Rodríguez (2010) generaron cepas homolácticas de *B. subtilis* para incrementar la concentración de L- lactato. A través de la inactivación del gen *alsS*, que codifica para la acetolactato sintasa (AlsS) que cataliza la reacción de piruvato a acetolactato, parte inicial de la vía de síntesis de butanodiol (Figura 4). Las cepas homolácticas mostraron un incremento del 15% en el

rendimiento de ácido láctico a partir de glucosa en medio mineral con piruvato y la eliminación de 2-3 butanodiol (Romero García., et al 2007).

En este trabajo se obtuvieron cepas evolucionadas homolácticas, a través de interrumpir el gen *alsS* con el casete de Sp en las cepas evolucionadas CV846, CV854, CV863 y CV879 mediante el plásmido pTOPO*alsSlxSptlx* (Ofelia Edith Carreón Rodríguez., 2010). Se espera que las cepas evolucionadas homolácticas presenten un mejor desempeño en condiciones de producción, debido a su capacidad de producir únicamente este compuesto y debido a que consumen simultáneamente xilosa y glucosa. Estas cepas servirán de base a futuros proyectos que conlleven al estudio de producción de ácido láctico con glucosa, xilosa, arabinosa y mezclas de estas fuentes de carbono.

7.5.10 Cultivos lote secuenciales con la cepa CVPYKSp.

En la figura 20 se muestran los cultivos lote secuenciales por duplicado de la cepa CVPYKSp. El cultivo inicial de la cepa CVPYKSp requirió de aproximadamente 60 horas para alcanzar una DO_{600nm} de 1.41. Sin embargo, a medida que transcurrieron los pases, se observó que el tiempo requerido para alcanzar el crecimiento en fase exponencial disminuyó significativamente (Figura 20).

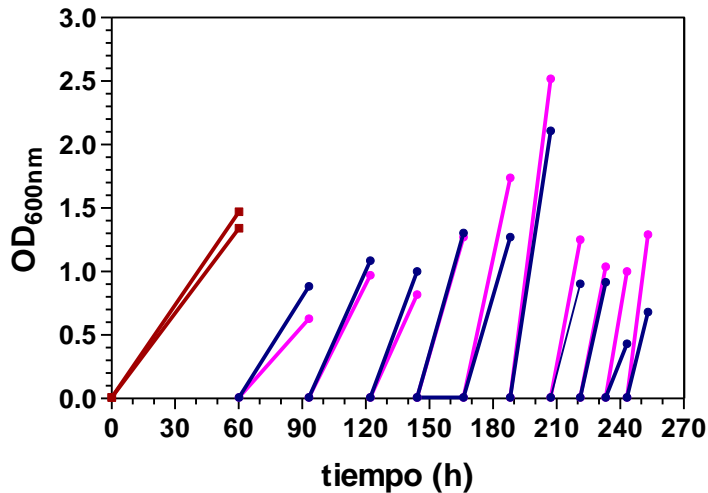


Figura 20. Cultivos lote secuenciales de la cepa CVPYKSp. Cultivo inicial de la cepa CVPYKSp (■) y pases secuenciales de la cepa CVPYKSp (•, •).

7.5.11 Dinámica de la evolución de la cepa CVPYKSp. Con el propósito de conocer la dinámica de la evolución de esta cepa, se aislaron colonias de todos los pases, siguiendo la estrategia descrita en la sección 9.1.3. En este experimento se observaron colonias de dos tamaños. Durante los pases 1, 2, 3 y 4 fueron de un tamaño pequeño. Sin embargo, a partir del pase 4 algunas colonias incrementaron el tamaño. En los pases consecutivos, el número de colonias grandes fue aumentando, mientras que el número de colonias pequeñas fue disminuyendo, y finalmente en el pase 7 y en los pases posteriores todas las colonias fueron grandes.

En función de esta característica se seleccionaron dos colonias del pase 2 (ambas pequeñas); 2 colonias del pase 4 (1 pequeña, 1 grande); 2 colonias del pase 5 (1 pequeña, 1 grande) y dos colonias para el pase 7 (ambas grandes). Las mutantes evolucionadas se denominaron CVPYK2-1, CVPYK2-2, CVPYK4-1, CVPYK4-2, CVPYK5-1, CVPYK5-2, CVPYK7-1 y CVPYK7-2.

7.5.12 Caracterización cinética de 8 mutantes evolucionadas en medio mineral con glucosa. Para determinar el crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido acético en MM con glucosa de las mutantes evolucionadas CVPYK2-1, CVPYK2-2, CVPYK4-1, CVPYK4-2, CVPYK5-1, CVPYK5-2, CVPYK7-1 y CVPYK7-2, se realizaron cultivos en matraces de 250 ml con 50 ml de MM suplementado con 8 g/L de glucosa.

Los controles que se utilizaron fueron las cepas *B. subtilis* 168 (silvestre) y CVPYKSp (PykA⁻). Los cultivos iniciaron con una DO_{600nm} de 0.1 y se tomaron muestras del cultivo periódicamente. En la Figura 21, se muestra crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido acético. Estos resultados nos sugieren que existen dos grupos de poblaciones: el primero incluyen las cepas CVPYK2-1, CVPYK2-2, CVPYK4-1 y CVPYK5-1 y el segundo a las cepas evolucionadas CVPYK4-2, CVPYK5-2, CVPYK7-1 y CVPYK7-2. Las cepas del grupo 1 recuperaron su crecimiento y consumo de glucosa parcialmente mientras que, las cepas del grupo 2 incrementaron significativamente su capacidad de crecimiento así como el consumo de glucosa con respecto a la cepa parental CVPYKSp. La primera población corresponde al grupo de colonias pequeñas, mientras que el segundo corresponde a las colonias grandes.

Con respecto a la síntesis de ácido acético, las cepas del grupo 1 mostraron una tasa de producción similar que la cepa CVPYKSp. Las cepas del grupo 2, mostraron un incremento en la tasa de producción con respecto a la cepa CVPYKSp. Estos datos sugieren un incremento en el flujo glucolítico en las cepas CVPYK4-2, CVPYK5-2, CVPYK7-1 y CVPYK7-2, con respecto la cepa parental CVPYKSp.

Figura 21. Caracterización cinética de cepas evolucionadas CVPYK2-1, CVPYK2-2, CVPYK4-1, CVPYK4-2, CVPYK5-1, CVPYK5-2, CVPYK7-1, CVPYK7-2 en medio mineral con glucosa 8 g/L. A) crecimiento, B) consumo de glucosa g/L y C) ácido acético (g/L).

Se determinó la tasa de crecimiento y de consumo de glucosa para las cepas evolucionadas. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros cinéticos μ y q_{Glc} de cepas evolucionadas. Estos valores se comparan con los obtenidos para la cepa silvestre *B. subtilis* 168 y la mutante CVPYKSp.

Cepas	Genotipo	μ (h ⁻¹)	q_{Glc} (g _{Glc} g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	Porcentajes de crecimiento con respecto a la cepa silvestre
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	0.52	0.97	100%
CVPYKSp	<i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.07	0.41	13.46153846
CVPYKSp 2-1	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.12	0.35	23.07692308
CVPYKSp 2-2	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.14	0.31	26.92307692
CVPYKSp 4-1	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.14	0.73	26.92307692
CVPYKSp 4-2	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.30	0.33	57.69230769
CVPYKSp 5-1	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.15	0.67	28.84615385
CVPYKSp 5-2	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.32	0.50	61.53846154
CVPYKSp 7-1	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.38	0.39	73.07692308
CVPYKSp 7-2	Evolucionada <i>trpC2</i> $\Delta(pykA)::loxPSploxP$	0.37	0.15	71.15384615

Bajo estas condiciones, la μ correspondiente a las cepas CVPYKSp 2-1, CVPYKSp 2-2, CVPYKSp 4-1 y CVPYKSp 5-1 incrementó ligeramente con respecto a la obtenida para la cepa CVPYK (Tabla 10). Sin embargo, las cepas CVPYKSp 4-2, CVPYKSp 5-2, CVPYKSp 7-1 y CVPYKSp 7-2 incrementaron significativamente la μ

con respecto a la cepa mutante CVPYKSp. Estos resultados sugieren que estos cambios son producto de mutaciones adquiridas durante el proceso de evolución.

El fenotipo de colonias chicas y grandes en placas LB para las cepas evolucionadas de la mutante CVPYKSp y la información obtenida de la caracterización en medio mineral con glucosa nos sugiere que al menos hay dos tipos de poblaciones.

8. CONCLUSIONES

- La inactivación de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* afectó de manera negativa la velocidad de crecimiento, la velocidad de consumo de glucosa y la producción de ácido acético.

- En cepas AroB⁻, que carecen de la enzima PykA y del sistema PTS se observó un aumento de 5.30 y 1.6 veces en $Y_{DAHP/Glc}$ con respecto a la cepa silvestre. Estos datos indican que la eliminación de las enzimas PykA y PTS, que utilizan al PEP como sustrato, incrementó la disponibilidad del precursor PEP sobre la magnitud del flujo de carbono hacia la vía común de síntesis de los compuestos aromáticos, siendo este efecto mayor en la mutante que carece del gen *pykA*.

-El análisis de expresión de genes del metabolismo central mediante RT-qPCR permitió identificar una respuesta de limitación de carbono en las tres mutantes que incluye: el incremento en el nivel de expresión de varios genes con respecto a su cepa silvestre; entre ellos los que codifican para transportadores de glucosa tales como *glcU*, *yurM* y *yurN*, genes que codifican para el uso de fuentes alternas a la glucosa como son *acsA* y *xylAB*, así como el decremento en el nivel de expresión de varios genes con respecto a su cepa silvestre relacionados con la síntesis de ácido acético (*ptaA*, *ackA*) y la disminución en el operón glucolítico *gapA*.

-A partir de una cepa PTS^- sometida a un cultivo lote en medio mineral con glucosa, fue posible obtener cepas capaces de crecer 3.7 veces más rápidamente en glucosa con respecto a la mutante CVPTSGHISp.

-Como resultado del proceso de evolución adaptativa en glucosa, algunas cepas evolucionadas (70%) adquirieron la capacidad de crecer en xilosa como fuente de carbono (Xil^+) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

-La caracterización cinética aeróbica y anaeróbica de la cepa evolucionada CV846 (*ptsGHI*) Xil^+ en medio mineral y en LB respectivamente con mezclas de glucosa-xilosa y de glucosa-xilosa-arabinosa mostraron un patrón de coutilización de estas fuentes de carbono en ambas condiciones de cultivo.

La inactivación de *glcP* en la cepa evolucionada CV846 eliminó la capacidad de crecer en glucosa y xilosa.

A partir de una cepa $PykA^-$ sometida a un cultivo lote en medio mineral con glucosa, fue posible obtener al menos dos tipos de poblaciones de cepas capaces de crecer 2 y 5 veces más rápidamente en glucosa con respecto a la mutante CVPYKSp.

9. PERSPECTIVAS

-Realizar análisis de flujos metabólicos en las mutantes CVPTSGHISp, CVPTSGSp y CVPYKSp, comparar con la cepa silvestre *B. subtilis* 168.

-Determinar la secuencia genómica de algunas cepas evolucionadas y complementar con datos de transcripción de genes o proteómica así como el análisis de flujos metabólicos para ampliar el entendimiento de los mecanismos encontrados por las cepas evolucionadas para mejorar su fenotipo en las condiciones evaluadas.

-Medir transporte de glucosa y xilosa en algunas cepas evolucionadas.

-Encontrar los transportadores alternos que contribuyen a la internalización de glucosa y xilosa en otras cepas evolucionadas *ptsGHI*.

-Interrumpir el gen *pykA* en la cepa evolucionada CV846 AroB⁻, sobreexpresar el gen que codifica para la enzima DHAP sintasa y evaluar su contribución sobre la concentración del intermediario aromático DAHP mediante células en reposo.

10. REFERENCIAS

- Bacher A, Eberhardt S, Eisenreich W, Fischer M, Herz S, Illarionov B, Kis K and Richter G. Biosynthesis of rivoflavin. *Vitamins and Hormones* 2001., 61: 1-49.
- Báez-Viveros JL, Bolívar F and Gosset G: Determination of 3-deoxy-D-arabino heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol Bioeng* 2001., 73: 530-535.
- Bauer D. A, Ben-Basst A, Dawson M, Dela Peunte V. T and Neway J. O: Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutante *Appl Environ Microbiol* 1990., 56: 1296-1302.
- Becker J, Klopprogge C and Wittmann C: Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* 2008., 7:1-8.
- Blangy D, Buc H, and Monod J: Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1968., 31: 13-35.
- Blencke HM, Homuth G, Ludwig H, Mäder U, Hecker M and Stülke J: Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab Eng* 2003., 5: 133-149.
- Berry A: Improving production of aromatic compounds in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Trends Biotechnol* 1996., 14: 250-256.
- Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976., 72: 248-254.
- Bron S, Meima R, Maarten Van Dijn J, Wipat A and Harwood CR: Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2nd edition. Edited by Demain A. ASM Press. EUA., 1999.
- Bustin AS, Benes V, Garson AJ, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl WM, Shipley LG, Vandesompele Jo, Wittwer TC: The MIQE guidelines: minimum information for publications of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 2009., 55: 1-12.
- Cabrera-Valladares N, Martínez LM, Flores N, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F and Gosset G: Physiologic consequences of glucose transport and phosphoenolpyruvate node modifications in *Bacillus subtilis* 168. *J mol microbiol biotechno* 2012., 22: 177-197.
- Carreón Rodríguez Ofelia Edith. Fermentación homoláctica de disacáridos y monosacáridos utilizando a *Bacillus subtilis* Δ alsS. Tesis de maestría. 2010.

- Curtis JS and Epstein W: Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucose phosphotransferase, mannose phosphotransferase, and glucokinase. *J Bacteriol* 1975., 122: 1189-1199.
- Cruz-Ramos H, Hoffmann T, Marino M, Nedjari H, Presecan-Siedel E, Dreesen O, Glaser P and Janh D: Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* 2000., 182: 3072-3080.
- Dahl MK, Degenkolb J and Hillen W: Transcription of the *xyl* operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base-pairs. *J Mol Biol* 1994., 243: 413-424.
- Deutscher J, Kessler U, Alpert CA and Hengstenberg W: Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-ser-HPr and its possible regulatory function. *Biochemistry* 1984., 23: 4455-60.
- De Anda R, Lara AR, Hernandez V, Hernandez-Montalvo V, Gosset G, Bolivar F and Ramirez OT: Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng* 2006., 8: 281-90.
- Diesterhaft M and Freese E: Pyruvate kinase of *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* 1972., 268(2): 373-380.
- Diesterhaft M and Freese E: Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 1973., 248: 6062-6070.
- Draths KM, Pompliano DL, Conley DL, Frost JW, Berry A, Disbrow GL, Staversky RJ and Lievens JC: Biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: the role of transketolase. *J Am Chem Soc* 1992., 114: 3956-3962.
- Doan T, Servant P, Tojo S, Yamaguchi H, Lerondel G, Yoshida K, Fujita Y and Aymerich S: The *Bacillus subtilis ywkA* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM twocomponent system in response to malate. *Microbiol* 2003., 149: 2331-2343.
- Doelle HW, Ewings KN and Hollywood NW: Regulation of glucose metabolism in bacterial systems. *Adv Biochem Eng* 1982., 23:1-35.
- Evans PR and Hudson PJ: Structure and control of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature* 1979., 279: 500-504.
- Espinosa de los Monteros J, Martínez A and Valle F: Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001., 57: 379-384.

-Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K, Bailey JE and Sauer U: Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2002., 184: 152-164.

-Fiegler H, Bassias J, Jankovic I and Bruckner R: Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. J Bacteriol 1999., 181: 4929-4936.

-Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol 1996., 14: 620-623.

-Flores S, Gosset G, Flores N, de Graaf AA and Bolivar F: Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. Metab Eng 2002., 4: 124-37.

-Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G and Bolívar F: Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. Metab Eng 2005., 7: 70-78.

-Fry B, Zhu T, Domach M, Koepsel R, Phalakornkule C and Ataai M: Characterization of growth and acid formation in a *Bacillus subtilis* pyruvate kinase mutant. App Environ Microbiol 2000., 66: 4045-4049.

-Galinié A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer MC, et al: New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. Proc Natl Acad Sci USA 1998., 95: 1823-28.

-Gartner D, Geissendorfer M and Hillen W: Expression of the *Bacillus subtilis* *xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. J Bacteriol 1988., 170: 3102-3109.

-Gonzy-Tréboul G, Zagorec M, Rain-Guion MC and Steinmetz M: Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. Mol Microbiol 1989., 3: 103-112.

-Gonzy-Tréboul G, de Waard JH, Zagorec M and Postma PW. The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for IIGlc and IIIGlc domains. Mol Microbiol 1991., 5(5): 1241-1249.

-Grundy FG, Waters DA, Takova TY and Henkin TM: Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 1993a., 10: 259-71.

-Grundy FJ, Waters DA, Allen GSH and Henkin TM: Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. Journal of Bacteriology 1993b., 175: 7348-7355.

-Grundy JF, Turinsky JA and Henkin TM: Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. J Bacteriol 1994., 176: 4527-4533.

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

-Hahm DH, Pan J, and Rhee JS: Characterization and evaluation of a *pta* (phosphotransacetylase) negative mutant of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase. Appl Microbiol Biotechnol 1994., 42:100-107.

-Henkin TM, Grundy FJ, Nicholson WL and Chambliss GH: Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli lacI* and *galR* repressors. Mol Microbiol 1991., 5: 575-584.

-Henkin TM: The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett 1996., 135: 9-15.

-Henner D, and Yanofsky C: *Biology of the Firmicutes "Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biology and Physiology" (Mulligan)* (Sonenshein, A. L. Hoch, J. A., Losick, R. ed). 1st ed ASM Press. E.U.A. 1993.

-Hueck CJ, Hillen W: Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-Positive Bacteria?. Mol Microbiol 1995; 15: 395-401.

-Jacob S, Allmansberger R, Gärtner D and Hillen W: Catabolite repression of the operon for xylose utilization from *Bacillus subtilis* W23 is mediated at the level of transcription and depends on a *cis* site in the *xylA* reading frame. Mol Gen Genet 1991., 229: 189-196.

-Jensen EB and Carlsen S: Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. Biotechnol Bioeng 1990., 36:1-11.

-Kim JH and Chambliss GH: Contacts between *Bacillus subtilis* catabolite regulatory protein CcpA and amyO target site. Nucleic Acid Res 1997., 25: 3490-3496.

-Kim Young Soo, Seo Jeong Hyun, and Cha Hyung Joon: Enhancement of heterologous protein expression in *Escherichia coli* by co-expression of nonspecific DNA-binding stress protein, Dps. Enzyme and Microbial Technology 2003., 33: 460-465.

-Kunz F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al: The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature 1997., 390: 249-256.

-Kraus A, Hueck C., Gärtner D., and W. Hillen. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis xyl* operon involves a *cis* element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression. J Bacteriol 1994., 176: 1738-1745.

- Lerondel G, Doan T, Zamboni N, Sauer U, Aymerich S: YtsJ has the major physiological role of the four paralogous malic enzyme isoforms in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2006., 188: 4727-4736.
- Livak K and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Method* 2001., 25: 402-408.
- Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH and Saier Jr MH: Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* 2005., **187**: 7826-7839.
- Ludwig H, Homuth G, Schmalisch M, Dyka MF, Hecker M and Stülke J: Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol Microbiol* 2001., 41: 409-422.
- Lu J and Liao JC: Metabolic engineering and control análisis for production of aromatics: role of transaldolase. *Biotechnol Bioeng* 1997., 53: 132-138.
- March JC, Eiteman MA and Altman E: Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2002., 68: 5620-4.
- Martínez A, Ramírez TO, Valle F: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997., 47: 40-45.
- Miller JE, Backman KC, O'Connor MJ and Hatch RT: Production of phenylalanine and organic by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 1987., 2: 143-149.
- Miwa Y, Nagura K, Eguchi S, Fukuda H, Deutscher J and FujitaY: Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol Microbiol* 1997., **23**: 1203-1213.
- Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W and Saier MH Jr: Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* 2001., 39: 1366-1381.
- Moir-Blais TR, Grundy FJ and Henkin TM: Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis* *ackA* promoter requires sequences upstream of the CcpA binding site. *J Bacteriol* 2001., 183: 2389-2393.
- Miwa Y, Nakata A, Ogiwara A, Yamamoto M and FujitaY: Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 2000., 28(5): 1206-1210.
- Nakano MM, Dailly YP, Zuber P and Clark DP: Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: Identification of fermentative end products and genes required for growth. *J Bacteriol* 1997., 179: 6749-6755.

-Nothhaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M and Titgemeyer F. The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J Bacteriol* 2003., 185: 7019-7023.

-Papagianni Maria: Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microbial Cell Factories* 2012., 11: 50

-Pan Z, Zhu T, Domagalski N, Khan S, Koepsel RR, Domach MM and Ataa MM: Regulating expression of pyruvate kinase in *Bacillus subtilis* for control of growth rate and formation of acidic byproducts. *Biotechnol Prog* 2006., 22: 1451-1455.

Pan Z, Cunningham DS, Zhu T, Ye K, Koepsel RR, Domach MM and Ataa MM: Enhanced recombinant protein production in pyruvate kinase mutant of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010., 85: 1769-1778.

-Patnaik R and Liao JC: Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol* 1994., 60: 3903-3908.

-Paulsen LI, Chauvaux S, Choi P and Saier MH Jr: Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: Identification of a novel Hexose: H⁺ symporter. *J Bacteriol* 1998., 180: 498-504.

-Pittard AJ: Biosynthesis of the aromatic aminoacids: In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology Volume 1 (28). 2nd edition. Edited by Neidhardt C. ASM Press, Washington, USA; 1996: 458-484.

-Ponce E, Flores N, Martínez A, Valle F and Bolívar F: Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J bacteriol* 1995., 177: 5719-5722.

-Postma PW, Lengeler JW and Jacobson GR. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 1993., 57: 543-94.

-Presecan-Siedel E, Galinier A, Longin R, Deutscher J, Danchin A, Glaser P and Martin-Verstraete I: Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1999., 181: 6889-6897.

-Renna MC, Najimudin N, Winik LR, Zahler SA: Regulation of the *Bacillus subtilis* *alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* 1993., 175: 3863-3875.

-Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, et al. A novel bacterial protein kinase that controls carbon catabolite repression. *Mol Microbiol* 1998., 27: 1157-70.

-Reizer J, Bachem S, Reizer A, Arnaud M, Saier HM Jr and Stülke J: Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis- the complete

complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. Microbiology 1999., 145: 3419-3429.

-Romero S, Merino E, Bolívar F, Gosset G and Martínez A: Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for ethanol production: lactate dehydrogenase plays a key role in fermentative metabolism. Appl Environ Microbiol 2007., 73(16): 5190-5198.

-Romero-García S, Hernández-Bustos C, Merino E, Gosset G and Martínez A: Homolactic fermentation from glucose and cellobiose using *Bacillus subtilis*. Microbial Cell Factories 2009., 8: 23-30.

-Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York., USA; 1989.

-San KY, Bennett GN, Aristidou AA and Chou CH: Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. Ann N Y Acad Sci 1994., 721: 257-267.

-Schallmeyer M, Singh A and Ward OP: Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Can J Microbiol 2004., 50: 1-17.

-Schmiedel D and Hillen W: A *Bacillus subtilis* 168 mutant with increased xylose uptake can utilize xylose as sole carbon source. FEMS Microbiol Lett 1996., 135: 175-178.

-Shin BS, Choi SK and Park SH: Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene. J Biochem 1999., 126: 333-339.

-Shivers Robert P, Dineen Sean S and Sonenshein Abraham L: Positive regulation of *Bacillus subtilis ackA* by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. Molecular Microbiology 2006., 62(3): 811-822.

-Singh M, Sanjay KSP and Kalia VP: *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. Microbial Cell Factories 2009., 8: 38.

-Skarlatos P and Dahl KM: The glucose kinase of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 1998., 10: 3222-3226.

-Speck EL and Freese E: Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. J Gen Microbiol 1973., 78: 261-27.

-Srinivasan PR and Sprinson DB: 2-keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7 phosphate synthase. J Biol Chem 1958., 234: 716-722.

-Stülke J, Martin-Verstraete I, Zagorec M, Rose M, Klier A and Rapoport G: Induction of the *Bacillus subtilis ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. Mol Microbiol 1997., 25: 65-78.

- Stülke J and Hillen W: Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* 1998., 85: 583-592.
- Stülke J and Hillen W: Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 1999., 2: 195-201.
- Stülke J and Hillen W: Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annu Rev Microbiol* 2000., 54:849-80.
- Shuler M L and Kargi Fikret. *Bioprocess engineering: basic concepts*. Prentice Hall, 1992.
- Stammen S., Müller KB., Korneli C., Biedendieck R., Gamer M., Franco-Lara E and Jahn D: Intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl Environ Microbiol* 2010., 76(12): 4037-4046.
- Sutrina SL, Reddy P, Saier MH Jr and Reizer J: The glucose permease of *Bacillus subtilis* is a single polypeptide chain that functions to energize the sucrose permease. *J Biol Chem* 1990., 265(30): 18581-18589.
- Schumacher MA, Seidel G, Hillen W and Brennan RG: Phosphoprotein Crh-Ser46-P displays altered binding to CcpA to effect carbon catabolite regulation. *J Biol Chem* 2006., **281**: 6793-6800.
- Torsten K, Weibezahn J, Berhardt J, Homuth G and Hecker M: Genome-wide mRNA profiling in glucose starved *Bacillus subtilis* cells. *Molecular Genetics and Genomics* 2005., 274:1-12.
- Turinsky AJ, Grundy FJ, Kim JH, Chambliss GH and Henkin TM: Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J Bacteriol* 1998., 180: 5961-5967.
- Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, and Eiteman MA: Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl Environ Microbiol* 2006., 72:3653-61.
- Warner J and Lolkema J: CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol Biol Rev* 2003., 67: 475-490.
- Weickert MJ, Adhya S: Isorepressor of the gal regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1992., 226: 69-83.
- Weickert MJ and Chambliss GH: Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990., **87**: 6238-6242.
- Westers L, Westers H and Quax WJ: *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2004., 1694: 299-310.

- Wolfgang K and Marahiel MA: Structure-function relationship and regulation of two *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, HBSu and AbrB. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2002., 4: 323-329.
- Wulf De P and Vandamme EJ: Production of D-ribose by fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997., 48: 141-148
- Yanisch-Perron C, Vieira J and Messing J: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985., 33: 103-119.
- Ye R., Yang LP and Wong S-L: Construction of protease deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: Inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular LonA protease. *Proc. of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry, Seoul, Korea 1996* :160-169.
- Ye RW, Tao W, Bedzyk L, Young T, Chen M and Li L: Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J Bacteriol* 2000., 182: 4458-4465.
- Yoshida K, Kobayashi K, Miwa Y, Kang CM, Matsunaga M, Yamaguchi H, Tojo S, Yamamoto M, Nishi R, Ogasawara N, Nakayama T and Fujita Y: Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 2001., 29: 683-692.
- Zalieckas JM, Wray VL Jr and Fisher HS: Expression of the *Bacillus subtilis acaA* gene: position and sequence context affect cre-mediated carbon catabolite repression. *J Bacteriol* 1998., 180: 6649-6654.
- Zhu T, Phalakornkule C, Koepsel R, Domach MM and Atai MM: Cell growth and by-product formation in a pyruvate kinase mutant of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2001., 17: 624-628.
- Zhu T, Pan Z, Domagalski N, Koepsel R, Atai MM and Domach MM: Engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced total synthesis of folic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 2005., 71: 7122-7129.

11. ARTICULOS DE *B. subtilis* RELACIONADOS A ESTE TRABAJO.

11.1 Cabrera-Valladares N, Martínez LM, Flores N, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F and Gosset G: Physiologic consequences of glucose transport and phosphoenolpyruvate node modifications in *Bacillus subtilis* 168. J mol microbiol biotechnol 2012; 22: 177-197.

11.2 Licona-Cassani C, Lara AR, Cabrera-Valladares N, Escalante A, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F and Gosset G: Inactivation of Pyruvate Kinase or the Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System Increases Shikimic and Dehydroshikimic Acid Yields from Glucose in *Bacillus subtilis*. J mol microbiol biotechnol 2013; 24(1): 37-45.

Physiologic Consequences of Glucose Transport and Phosphoenolpyruvate Node Modifications in *Bacillus subtilis* 168

Natividad Cabrera-Valladares Luz M. Martínez Noemí Flores
Georgina Hernández-Chávez Alfredo Martínez Francisco Bolívar
Guillermo Gosset

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, México

Key Words

Bacillus subtilis · Sugar phosphotransferase system · Pyruvate kinase · Central metabolism · Gene expression

Abstract

The phosphoenolpyruvate (PEP) node is an important carbon distribution point in the central metabolic networks; therefore, its modification is a common strategy employed for developing microbial production strains. In this study, mutants of *Bacillus subtilis* 168 were generated with deletions of *pykA* (which encodes pyruvate kinase), *ptsG* (which encodes the glucose-specific IICBA^{Glc} component) or the *ptsGHI* operon [which encodes IICBA^{Glc}, HPr protein and enzyme I from the PEP:sugar phosphotransferase system (PTS)]. These modifications caused a reduction in the initial rate of [¹⁴C]-glucose import, corresponding to 10.99, 2.83 and 0.50% of that found in *B. subtilis* 168 for strains with inactive *pykA*, *ptsG* or *ptsGHI* genes, respectively. Characterization of derivative strains lacking 3-dehydroquinate synthase activity showed that inactivation of *pykA* leads to an 8-fold increase in carbon flow to the common aromatic pathway. Quantitative real-time PCR analyses of 76 genes from several functional classes revealed a carbon starvation transcriptional pattern that includes a partial gluconeogenic re-

sponse and overexpression of genes encoding non-PTS glucose importers in the strains lacking functional *pykA*, *ptsG* or *ptsGHI* genes. A transcriptional response consistent with pyruvate limitation was also detected, which includes upregulation of genes encoding malic enzymes that generate pyruvate from malate. Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

Introduction

Aromatic compounds are a class of chemicals with many industrial applications. These products are typically synthesized from petroleum. Despite the prevalence of production processes for aromatics, concerns about pollution and the nonrenewable nature of petroleum have motivated the search for alternative manufacturing schemes. The development of novel technologies for the production of chemicals from renewable raw materials has been enabled by the application of metabolic engineering strategies for the generation of novel microbial strains useful in the production of various compounds. These emerging technologies are an attractive alternative; however, their economic viability depends on achieving a high level of efficiency and productivity. Therefore,

KARGER

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

© 2012 S. Karger AG, Basel
1464–1801/12/0223–0177\$38.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/mmb

Guillermo Gosset
Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62210 (Mexico)
Tel. +52 777 329 1601, E-Mail gosset@ibt.unam.mx

a major challenge in biotechnology is to identify bacterial species that can be modified for the generation of efficient and robust production strains.

The Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* has long been used to produce enzymes and metabolites on an industrial scale [Schallmeyer et al., 2004]. This soil microbe has the natural capacity to secrete proteins, and it has been designated as GRAS (generally recognized as safe) by the Food and Drug Administration (FDA, USA). *B. subtilis* is considered a model Gram-positive bacterium; its genome sequence has been determined, and its physiology is well understood [Kunts et al., 1997]. *B. subtilis* and *Escherichia coli* share a large number of metabolic similarities and a few remarkable differences. In *E. coli*, the enzyme phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase carries out an anaplerotic reaction leading to the synthesis of oxaloacetate (OAA). In contrast, *B. subtilis* lacks PEP carboxylase, but it possesses the enzyme pyruvate carboxylase (PycA), which transforms pyruvate into OAA in an analogous anaplerotic reaction (fig. 1). These differences in the central metabolic network raise the question of whether these organisms will respond differently to similar genetic perturbations in this part of their metabolisms. There are numerous reports on the effects of modifications to reactions around the PEP and pyruvate nodes in *E. coli* [Sauer and Eikmanns, 2005], but there are far fewer reports for *B. subtilis* [Zhu et al., 2005]. Inactivation of the pyruvate kinase enzyme in *B. subtilis* has been reported to cause an intracellular accumulation of PEP; in contrast, a much smaller accumulation is observed in a similar, mutant strain of *E. coli* [Zhu et al., 2001]. This result is relevant in a biotechnological context because PEP is a precursor for the synthesis of several metabolites, including the aromatic compounds.

The common aromatic pathway, also known as the shikimate pathway, starts with the condensation of PEP and D-erythrose 4-phosphate (E4P) to yield 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) in a reaction catalyzed by the DAHP synthase enzyme (AroA) (fig. 1). In the second step of the pathway, DAHP is converted to 3-dehydroquinate (DHQ) by the enzyme dehydroquinate synthase (AroB). Five more steps lead to the synthesis of chorismate (CHO), a branching point where pathways for the syntheses of the aromatic amino acids L-tryptophan, L-tyrosine and L-phenylalanine originate [Pittard, 1996]. Flux partitioning at the PEP node has been identified as the major determinant of the yield of aromatics from glucose [Patnaik and Liao, 1994]. Thus, a strategy applied in *E. coli* to increase PEP availability for the synthesis of aromatics includes inactivating enzymes

that consume PEP. Inactivation of genes encoding protein components from the PEP:sugar phosphotransferase system (PTS), pyruvate kinase or PEP carboxylase have been shown to increase the yields of aromatics from glucose in *E. coli* [Baez-Viveros et al., 2001; Flores et al., 1996; Miller et al., 1987]. It also has been shown that overexpression of the *pps* gene encoding PEP synthase also increases production of aromatics [Patnaik and Liao, 1994].

In this study, we determined the cellular response to genetic modifications that eliminate reactions that consume PEP and also participate in glucose import. Isogenic strains lacking pyruvate kinase, PTS protein IICBA^{Glc} or the proteins encoded by the *ptsGHI* operon were generated and characterized. From these mutants, derivatives lacking AroB activity were generated, allowing the quantification of carbon flow to the common aromatic pathway by measuring the intermediate, DAHP. To explore the transcriptional response in the *pykA*⁻, *ptsG*⁻ and *ptsGHI*⁻ mutants, we used quantitative real-time PCR (RT-qPCR) to analyze the transcript levels of 76 genes that are involved in central metabolism.

Results and Discussion

To determine the effects of disrupting reactions that consume PEP on the physiology of *B. subtilis*, mutants were generated that lack pyruvate kinase activity or specific components of the PTS. *B. subtilis* 168 mutant strains lacking the pyruvate kinase enzyme (CVPYKSp) and components of the PTS (CVPTSGSp and CVPTSGHISp) were constructed (table 1). Inactivation of pyruvate kinase was expected to have a negative impact on the rate of pyruvate generation, whereas inactivation of PTS proteins was also expected to cause a reduction in the rate of pyruvate generation as well as impair glucose transport.

Characterization of *B. subtilis* 168 and Mutant Derivatives Growing on Glucose and Other Carbon Sources

The capacity to grow on several PTS and non-PTS sugars by *B. subtilis* 168, CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp was determined in cultures grown in shake flasks with mineral medium (MM) supplemented with 8 g/l of PTS (glucose, fructose, sucrose or maltose) or non-PTS (arabinose or glycerol) carbon sources. The wild-type strain displayed growth with all tested sugars, but the final cell concentrations of cells grown using maltose, glycerol or arabinose were lower than those for cells grown using glucose, fructose or sucrose (table 2). Strain

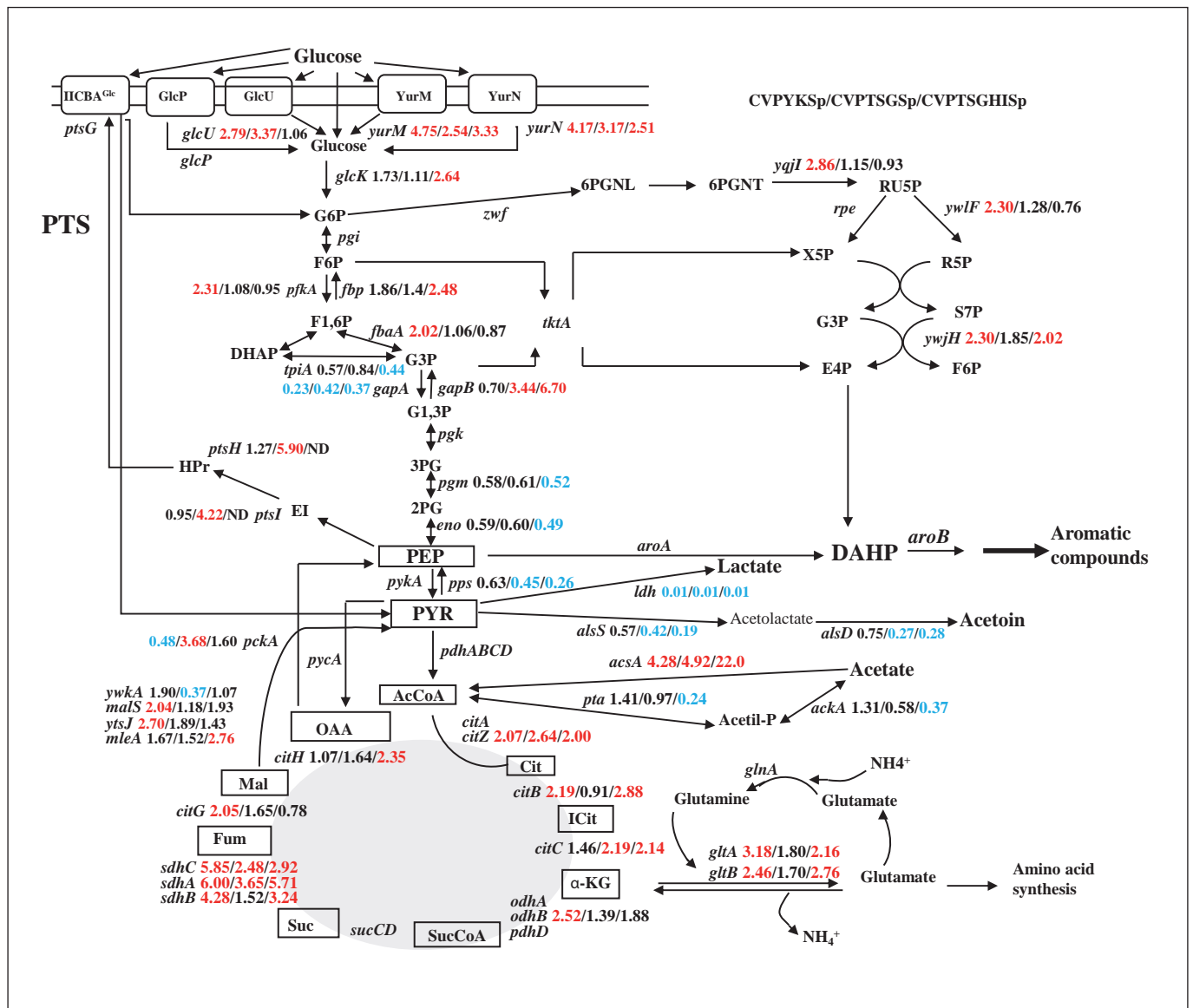


Fig. 1. Relative transcript levels for genes from central metabolism for strains CVPYKSp (first value), CVPTSGSp (second value) and CVPTSGHISp (third value), as compared to *B. subtilis* 168. Relative gene transcript level values ≥ 2 are shown in red color, whereas values ≤ 0.5 are shown in blue, values outside this range are shown in black. These values are relative to reference strain *B. subtilis* 168. The transcript level value for all genes from *B. subtilis* 168 was set to 1 and for this reason was omitted from the figure. PYR = Pyruvate; IICBA^{Glc} = glucose-specific IICBA^{Glc} component; HPr = phosphocarrier protein; EI = enzyme I; G6P = glucose-6-phosphate; F6P = fructose-6-phosphate; F1,6P = fructose 1,6-biphosphate; DHAP = dihydroxyacetone phosphate; G3P = glyceraldehyde-3-phosphate; G1,3P = glycerate 1,3-biphosphate; 3PG = glycerate-3-phosphate; 2PG = glycerate-2-phosphate; AroA = 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase; 6PGNL = gluconolactone-6-phosphate; 6PGNT = gluconate-6-phosphate; RU5P = ribulose-5-phosphate; X5P = xylulose-5-phosphate; S7P = sedoheptulose-7-phosphate; PykA = pyruvate

kinase A; AlsS = acetolactate synthase; AlsD = acetolactate decarboxylase; LDH = L-lactate dehydrogenase; PdhABCD = pyruvate dehydrogenase complex; AcCoA = acetyl-CoA; PtA = phosphotransacetylase; AckA = acetate kinase; AcsA = acetyl-CoA synthetase; Cit = citrate; Icit = isocitrate; α -KG = α -ketoglutarate; SucCoa = succinyl-CoA; Suc = succinate; Fum = fumarate; Mal = L-malate; YwkA = similar to malate dehydrogenase; YtsJ = similar to malate dehydrogenase; MleA = malate dehydrogenase; MleA = probable malolactone enzyme; CitA = citrate synthase I; CitB = aconitase, CitZ = citrate synthase II; CitC = isocitrate dehydrogenase; OdhA = 2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 subunit); OdhB = 2-oxoglutarate dehydrogenase (dihydroliipoamide transsuccinylase, E2 subunit); SucC = succinyl-CoA synthetase (beta subunit); SucD = succinyl-CoA synthetase (alpha subunit); SdhA = succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit); SdhB = succinate dehydrogenase (iron-sulfur protein); SdhC = succinate dehydrogenase (cytochrome b558 subunit); CitG = fumarate hydratase; CitH = malate dehydrogenase.

Table 1. Strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Genotype	Source or reference ^a
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Simone Seror (Université Paris-Sud)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F'::Tn10 proA+B+lacIq Δ(<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1endA1 gyrA96(Nal^r)thi hsdR17</i> (r _k - m _k ⁺) <i>glnV44relA1lac</i>	Sambrook et al. [1989]
CVPYKSp	<i>trpC2pykA::loxPaadAloxP</i>	pUCpykAloxPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPTSGSp	<i>trpC2ptsG::loxPaadAloxP</i>	pUCptsGloxPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPTSGHISp	<i>trpC2ptsGHI::loxPaadAloxP</i>	pUCptsGHIlloxPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPYK	same as CVPYKSp with spectinomycin resistance cassette free and one site <i>loxP</i>	pCRM-Ts-Phleo → CVPYKSp
CVPTSG	same as CVPTSGSp with spectinomycin resistance cassette free and one site <i>loxP</i>	pCRM-Ts-Phleo → CVPTSGSp
CVPTSGHI	same as CVPTSGHISp with spectinomycin resistance cassette free and one site <i>loxP</i>	pCRM-Ts-Phleo → CVPTSGHISp
168B	<i>B. subtilis</i> 168 with <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pUCaroBloxPsp → <i>B. subtilis</i> 168
CVPYKB	same as CVPYK with <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pUCaroBloxPsp → CVPYK
CVPTSGB	same as CVPTSG with <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pUCaroBloxPsp → CVPTSG
CVPTSGHIB	same as CVPTSGHI with <i>aroB::loxPaadAloxP</i>	pUCaroBloxPsp → CVPTSGHI
Plasmid	cloned gene	
pUC19	high copy number <i>E. coli</i> plasmid, Ap ^r , <i>lacZ</i>	Yanish-Perron et al. [1985]
ploxSpec-Walt	<i>E. coli</i> plasmid Ap ^r ; <i>aadA</i> gene is flanked by <i>loxP</i> sites	Fernando Valle (Genencor)
pCRM-Ts-Phleo	<i>E. coli</i> and <i>B. subtilis</i> shuttle plasmid, thermosensitive replication, Ap ^r , Phleo ^r , carrying the <i>cre</i> gene	Fernando Valle (Genencor)
pUCpykloxPsp	pUC19 carrying the <i>pykA::loxPaadA</i> gene	this study
pUCptsGloxPsp	pUC19 carrying the <i>ptsG::loxPaadA</i> gene	this study
pUCptsGHIlloxPsp	pUC19 carrying the <i>ptsGHI::loxPaadA</i> gene	this study
pUCaroBloxPsp	pUC19 carrying the <i>aroB::loxPaadA</i> gene	this study

^a Arrows indicate construction by transformation.

Table 2. Utilization of PTS and non-PTS carbon sources by *B. subtilis* 168 and mutant derivative strains

Strains	Glucose ^a	Fructose	Sucrose	Maltose	Glycerol	Arabinose
<i>B. subtilis</i> 168	4.80	2.80	2.00	1.00	0.90	1.00
CVPYKSp	0.40	0.72	0.50	0.50	NG	NG
CVPTSGSp	0.83	3.10	2.70	0.60	0.52	1.61
CVPTSGHISp	0.43	NG	NG	NG	NG	1.62

NG = No growth. ^a OD_{600nm}, after 24 h.

CVPYKSp displayed poor growth with all evaluated PTS sugars. In addition, this strain was unable to grow using the non-PTS sugars glycerol and arabinose. The significant growth impairment of CVPYKSp with the PTS sugars could be the result of accumulation of phosphorylated glycolytic intermediates, including PEP, as will be discussed below. Strain CVPTSGSp grew well using fructose, sucrose or arabinose, but it displayed impaired growth using glucose, maltose or glycerol. As expected, strain CVPTSGHISp grew poorly using glucose and did not grow at all using the other PTS sugars. However, this strain grew well using arabinose as the sole carbon source (table 2).

Detailed kinetic and stoichiometric characterization of *B. subtilis* 168, CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp was carried out in shake flask cultures in MM supplemented with 8 g/l of glucose (fig. 2). Under these conditions, a reduced specific growth rate (μ) was observed for CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp (table 3). At the end of culture, *B. subtilis* 168 had consumed 50.63% of the added glucose. In contrast, CVPTSGSp, CVPTSGHISp and CVPYKSp had lower final cellular concentrations and consumed more glucose than the wild-type strain but over a longer time period. The specific glucose consumption rates (q_{Glc}) were 0.97 g_{Glc}g_{DCW}⁻¹h⁻¹ for *B. subtilis* 168 and 0.31, 0.58

Table 3. Specific growth rate (μ), specific glucose consumption rate (q_{Glc}) and initial rate of glucose transport for *B. subtilis* 168 and mutant derivative strains

Strains	μ h^{-1}	q_{Glc} $\text{g}_{\text{Glc}}\text{g}_{\text{DCW}}^{-1}\text{h}^{-1}$	[^{14}C]-Glucose transport rate $\text{nmol}_{\text{Glc}}\text{min}^{-1}\text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$
<i>B. subtilis</i> 168	0.52 ± 0.02	0.97 ± 0.05	42.22 ± 4.73
CVPYKSp	0.06 ± 0.002	0.31 ± 0.04	4.64 ± 0.45
CVPTSGSp	0.17 ± 0.01	0.58 ± 0.06	1.19 ± 0.30
CVPTSGHISp	0.09 ± 0.01	0.37 ± 0.05	0.21 ± 0.10

and $0.37 \text{ g}_{\text{Glc}}\text{g}_{\text{DCW}}^{-1}\text{h}^{-1}$ for CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp, respectively (table 3). The observed low μ and q_{Glc} for CVPTSGHISp was expected because this strain lacks the general energy coupling proteins of the PTS. Deletion of *ptsGHI* genes completely abolishes PTS activity. It has been reported that residual glucose transport in Gram-positive bacteria lacking PTS could be carried out by two non-PTS-dependent permeases identified as GlcP and GlcU [Fiegler et al., 1999; Paulsen et al., 1998]. CVPTSGSp displayed a higher μ on glucose than CVPTSGHISp, suggesting that one or more EII PTS complexes can transport this sugar when the glucose-specific IICBA^{Glc} complex is not functional. A similar response has been observed in *E. coli*, where inactivation of the glucose-specific PTS component IIBC^{Glc} lead to an approximately 20% reduction in the growth rate with glucose [Curtis and Epstein, 1975]. In this case, the remaining glucose transport capacity in *E. coli* was dependent on the mannose PTS complex. For *B. subtilis*, it is not known which PTS complex(es) could be partially replacing the function of IICBA^{Glc}.

It has been reported that *B. subtilis* cultures grown using glucose accumulate acetate and the neutral metabolite acetoin. After exhaustion of the preferred carbon sources, acetoin and acetate can be reused as alternate carbon and energy sources [Ali et al., 2001]. In the present study, under the evaluated conditions, the wild-type strain produced 0.87 g/l of acetate as the main byproduct, CVPTSGSp accumulated approximately half that amount, and CVPTSGHISp produced no acetate. At a concentration of 0.87 g/l of acetate, growth of the wild-type strain was probably inhibited, so glucose consumption was arrested. In contrast, the mutant strains accumulated less acetate and consumed all the glucose in the medium (fig. 2). Acetoin accumulated in cultures of all the strains, with the highest level detected for CVPYKSp (0.9 g/l) (fig. 2). Lactate was not detected in the cultures of any of the studied strains.

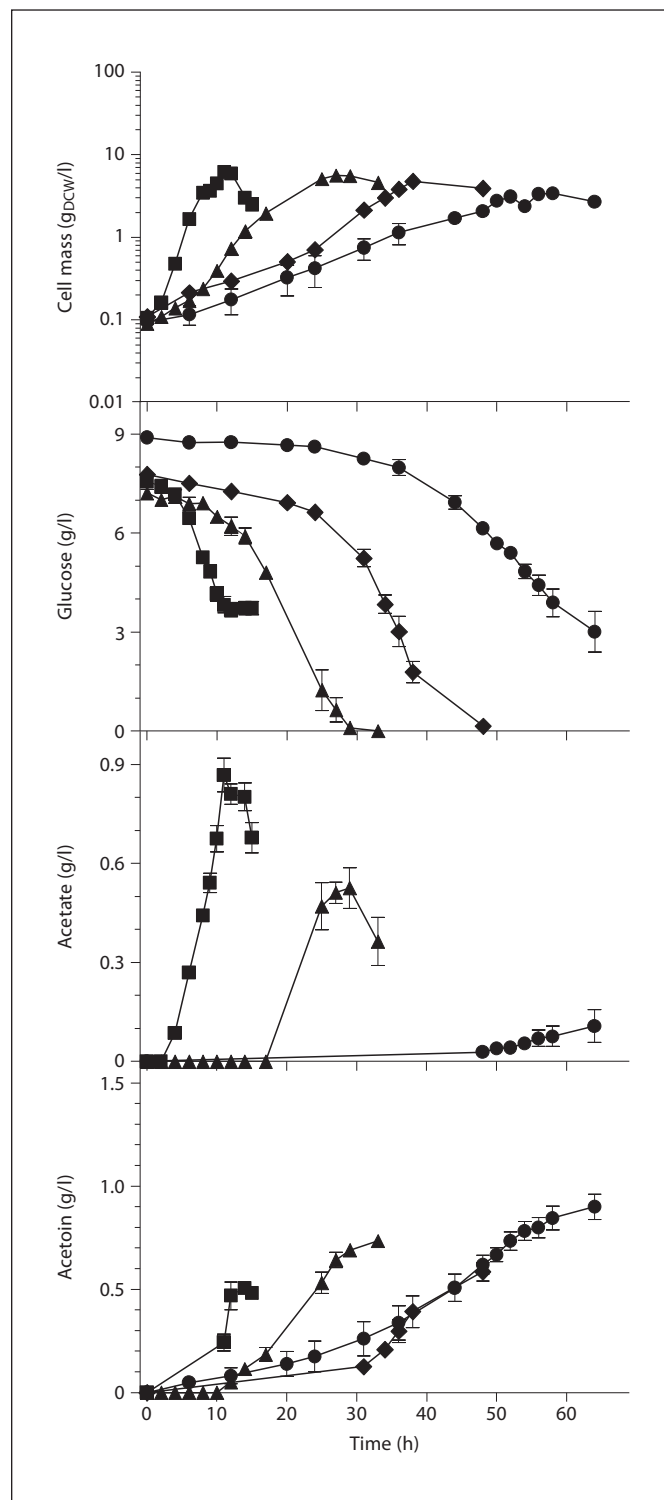


Fig. 2. Flask cultures of *B. subtilis* 168 and derivatives strains. **a** Biomass. **b** Glucose. **c** Acetate. **d** Acetoin. ■ = *B. subtilis* 168; ● = CVPYKSp (*pykA::loxPaadAloxP*); ▲ = CVPTSGSp (*ptsG::loxPaadAloxP*); ◆ = CVPTSGHISp (*ptsGHI::loxPaadAloxP*). Cultures were grown in mineral medium supplemented with 8 g/l of glucose. Graphs show results from the mean of four experiments.

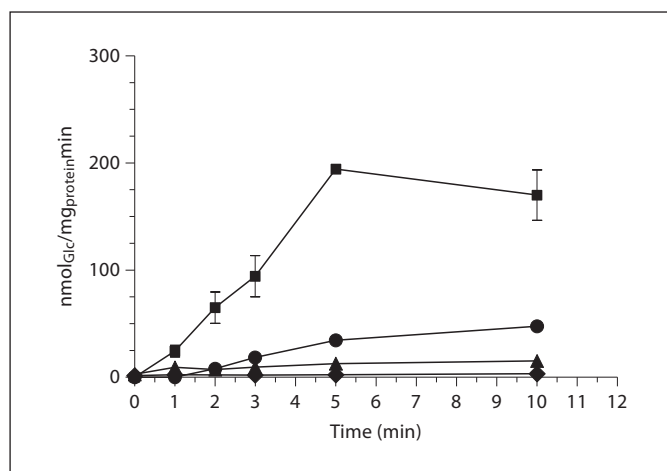


Fig. 3. Initial rates of glucose transport for *B. subtilis* 168 and derivative strains. ■ = *B. subtilis* 168; ● = CVPYKSp (*pykA::loxPaadAloxP*); ▲ CVPTSGSp (*ptsG::loxPaadAloxP*); ◆ = CVPTSGHISp (*ptsGHI::loxPaadAloxP*). Graphs show the mean of three independent experiments.

Table 4. Specific glucose consumption rate (q_{Glc}), DAHP production rate (q_{DAHP}) and DAHP yield from glucose ($Y_{\text{DAHP/Glc}}$) for AroB⁻ derivatives of *B. subtilis* 168 and mutant strains in resting cell experiments

Strains	q_{Glc} mmol _{Glc} g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹	q_{DAHP} mmol _{DAHP} g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹	$Y_{\text{DAHP/Glc}}$ mmol _{DAHP} mmol _{Glc} ⁻¹
168B	2.60 ± 0.11	0.19 ± 0.02	0.07 ± 0.01
CVPYKB	1.55 ± 0.37	0.53 ± 0.04	0.37 ± 0.04
CVPTSGB	1.65 ± 0.16	0.19 ± 0.02	0.10 ± 0.01
CVPTSGHIB	1.67 ± 0.27	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01

Measurement of the Initial Rate of Glucose Transport

The modifications performed to PTS components in these strains were expected to have a negative impact on glucose transport. To quantify the extent of the impairment to glucose import, the initial rates of [¹⁴C]-glucose transport were measured (table 3). When compared to the wild-type strain, the rates of glucose uptake were strongly reduced in CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp, corresponding to 10.99, 2.83 and 0.50%, respectively (fig. 3; table 3). A reduction in glucose transport was not expected in strain CVPYKSp because no cellular component involved directly in glucose transport was modified. It has been reported that in a strain lacking *pykA*, the intracellular concentration of PEP is increased. Because

PEP is an inhibitor of Pfk, it is possible that a higher PEP pool in the CVPYKSp strain would inhibit Pfk, resulting in glucose-6-phosphatase accumulation and subsequent inhibition of PTS glucose transport [Fry et al., 2000].

DAHP Production and Yield from Glucose in Strains Lacking Dehydroquinase Synthase Activity

To study the effects of disrupting activities that consume PEP on the magnitude of carbon flow into the common aromatic pathway, isogenic *B. subtilis* strains that lack AroB activity were constructed by deleting the *aroB* gene in *B. subtilis* 168, CVPYK, CVPTSG and CVPTSGHI to generate the following derivatives: 168B, CVPYKB, CVPTSGB and CVPTSGHIB, respectively (table 1). These strains are unable to metabolize DAHP; therefore, this intermediate accumulates, and it is secreted into the culture medium. Production of DAHP was measured in either resting cell or flask batch cultures. Under resting cell conditions, only *B. subtilis* 168B consumed all the glucose after 12 h of culture (fig. 4a). CVPYKB, CVPTSGB and CVPTSGHIB displayed q_{Glc} corresponding to 60, 63 and 64%, respectively, of the *B. subtilis* 168B level (table 4). Analysis of the supernatants showed that all the derivatives lacking AroB accumulated DAHP (fig. 4a). In these experiments, CVPYKB exhibited the highest DAHP molar yield from glucose ($Y_{\text{DAHP/Glc}}$) (0.37 mmol_{DAHP}mmol_{Glc}⁻¹) (table 4). Experiments were also performed in shake flasks with MM supplemented with glucose and yeast extract. After 50 h of culture time, final DAHP concentrations of 0.56, 4.0, 1.0 and 1.0 g/l were observed for *B. subtilis* 168B, CVPYKB, CVPTSGB and CVPTSGHIB, respectively (fig. 4b).

The above results indicate that CVPYKB displayed the best DAHP production parameters. A *B. subtilis* strain with reduced PykA activity has been shown to improve the production of folic acid, a compound that requires a precursor from the common aromatic pathway [Zhu et al., 2005]. However, the previous report did not compare the effect of PTS inactivation. Our study shows that in *B. subtilis*, *pykA* disruption is a better strategy to increase carbon flow to the common aromatic pathway than inactivation of *ptsG* or *ptsGHI*.

RT-qPCR Analysis of Genes from the Central Metabolism of *B. subtilis* 168 and Mutant Derivatives

The above results show that modifications of the central metabolism significantly altered growth, glucose transport, glycolytic flux and carbon flow into the common aromatic pathway in mutant strains. To determine the effects of these mutations on the transcription pat-

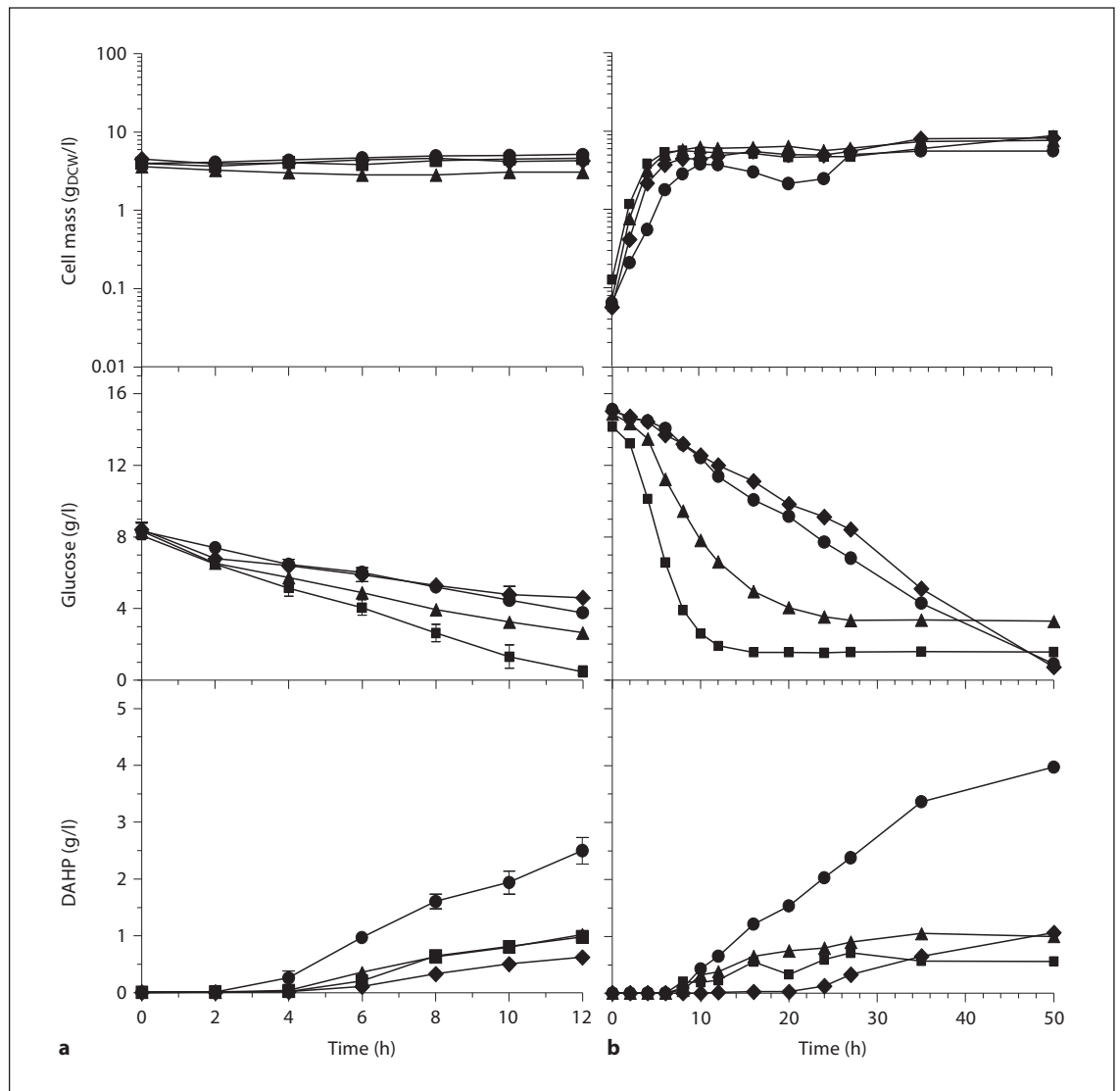


Fig. 4. Cultures of AroB⁻ derivatives of *B. subtilis* 168 and mutant strains for the production of DAHP. **a** Resting cell experiments. **b** Flask cultures in complex medium. ■ 168B, ● CVPYKB, ▲ CVPTSGB, and ◆ CVPTSGHIB. **a** Graphs show the mean of three independent experiments. **b** Graphs show the mean of two independent experiments.

terns of genes from the central metabolism, RT-qPCR analyses were performed. Strains were grown in MM containing 8 g/l of glucose as the sole carbon source. The reported transcript level values are shown relative to the corresponding value determined for the wild-type strain *B. subtilis* 168. We considered that a gene was overexpressed when the transcript level measured by RT-qPCR was ≥ 2.0 and down regulated when the transcript level was ≤ 0.5 when compared to the value of the same gene in the wild-type strain.

Glucose Transport and Phosphorylation

In wild-type *B. subtilis*, glucose transport and phosphorylation are mediated by the PTS system. The transcript level of the *ptsGHI* operon did not change in CVPYKSp when compared to *B. subtilis* 168 (table 5). This result is not in agreement with the low glucose transport capacity measured for this strain. Therefore, as discussed in a previous section, the glucose import impairment in strain CVPYKSp could be caused by an as yet undefined mechanism that has a negative effect on PTS

Table 5. Relative transcription levels determined by RT-qPCR of several groups of genes from strains *B. subtilis* 168, CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp

Pathway, process or group of genes	Function	Expression levels as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ with <i>B. subtilis</i> 168 as normalizing value		
		CVPYKSp	CVPTSGSp	CVPTSGHISp
<i>Glucose transport and phosphorylation</i>				
<i>glcT</i>	transcriptional antiterminator	2.29 ± 0.13	3.0 ± 0.13	2.57 ± 0.62
<i>ptsG</i>	PTS glucose-specific enzyme IICBA component	1.08 ± 0.18	ND	ND
<i>ptsH</i>	HPr protein	1.27 ± 0.26	5.90 ± 1.49	ND
<i>ptsI</i>	PTS enzyme I	0.95 ± 0.06	4.22 ± 0.40	ND
<i>glcP</i>	glucose/mannose:H ⁺ symporter	1.70 ± 0.42	1.57 ± 0.25	1.78 ± 0.20
<i>glcU</i>	glucose uptake protein	2.79 ± 0.47	3.37 ± 0.15	1.06 ± 0.12
<i>yurM</i>	sugar permease	4.75 ± 0.89	2.54 ± 0.39	3.33 ± 0.13
<i>yurkN</i>	sugar permease	4.17 ± 0.82	3.17 ± 0.71	2.51 ± 0.11
<i>Glycolysis</i>				
<i>glcK</i>	glucose kinase	1.73 ± 0.19	1.11 ± 0.15	2.64 ± 0.32
<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase	1.75 ± 0.29	0.89 ± 0.15	1.09 ± 0.24
<i>pfkA</i>	6-phosphofructokinase	2.31 ± 0.28	1.08 ± 0.17	0.95 ± 0.07
<i>fbpA</i>	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	2.02 ± 0.25	1.06 ± 0.19	0.87 ± 0.13
<i>gapA</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.23 ± 0.02	0.42 ± 0.06	0.37 ± 0.03
<i>tpiA</i>	triose phosphate isomerase	0.57 ± 0.06	0.84 ± 0.09	0.44 ± 0.05
<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	0.66 ± 0.09	0.79 ± 0.15	0.61 ± 0.16
<i>pgm</i>	phosphoglycerate mutase	0.58 ± 0.15	0.61 ± 0.09	0.52 ± 0.11
<i>eno</i>	enolase	0.59 ± 0.03	0.60 ± 0.06	0.49 ± 0.06
<i>cggR</i>	transcriptional repressor of <i>gapA</i>	0.22 ± 0.03	0.72 ± 0.22	0.49 ± 0.08
<i>pykA</i>	pyruvate kinase	ND	1.15 ± 0.22	1.74 ± 0.19
<i>Gluconeogenesis and anaplerotic pathways</i>				
<i>pck</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	0.48 ± 0.09	3.68 ± 0.99	1.60 ± 0.25
<i>gapB</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.70 ± 0.17	3.44 ± 1.03	6.70 ± 0.46
<i>fbp</i>	fructose-1,6-bisphosphatase	1.86 ± 0.33	1.4 ± 0.09	2.48 ± 0.62
<i>pycA</i>	pyruvate carboxylase	1.48 ± 0.17	1.88 ± 0.17	1.64 ± 0.22
<i>ywkA</i>	malate dehydrogenase	1.90 ± 0.13	0.37 ± 0.08	1.07 ± 0.18
<i>malS</i>	malate dehydrogenase	2.04 ± 0.06	1.18 ± 0.10	1.93 ± 0.16
<i>ytsJ</i>	malate dehydrogenase	2.70 ± 0.37	1.89 ± 0.33	1.43 ± 0.09
<i>mleA</i>	malolactic enzyme	1.67 ± 0.26	1.52 ± 0.22	2.76 ± 0.05
<i>pps</i>	phosphoenolpyruvate synthase	0.63 ± 0.08	0.45 ± 0.10	0.26 ± 0.07
<i>Fermentation and acetoin and acetate production and utilization genes</i>				
<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0
<i>ackA</i>	acetate kinase	1.31 ± 0.28	0.58 ± 0.14	0.37 ± 0.06
<i>pta</i>	phosphotransacetylase	1.41 ± 0.14	0.97 ± 0.21	0.24 ± 0.03
<i>alsS</i>	alpha-acetolactate synthase	0.57 ± 0.12	0.42 ± 0.10	0.19 ± 0.05
<i>alsD</i>	alpha-acetolactate decarboxylase	0.75 ± 0.12	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.07
<i>acsA</i>	acetyl-CoA synthetase	4.28 ± 0.40	4.92 ± 0.70	22.0 ± 4.97
<i>TCA cycle</i>				
<i>pdhA</i>	pyruvate dehydrogenase (E1 alpha subunit)	1.08 ± 0.19	0.99 ± 0.15	1.20 ± 0.29
<i>pdhB</i>	pyruvate dehydrogenase (E1 beta subunit)	1.42 ± 0.18	1.04 ± 0.21	1.21 ± 0.19
<i>pdhC</i>	pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoamide acetyltransferase E2 subunit)	1.72 ± 0.16	1.05 ± 0.28	1.21 ± 0.30
<i>pdhD</i>	pyruvate dehydrogenase/2-oxoglutarate dehydrogenase (dihydrolipoamide dehydrogenase E3 subunit)	1.94 ± 0.41	0.96 ± 0.24	1.24 ± 0.09
<i>citA</i>	citrate synthase I (minor)	1.45 ± 0.28	1.36 ± 0.38	1.24 ± 0.09
<i>citZ</i>	citrate synthase II (major)	2.07 ± 0.37	2.64 ± 0.24	2.0 ± 0.31
<i>citB</i>	aconitase	2.19 ± 0.40	0.91 ± 0.08	2.88 ± 0.76
<i>citC</i>	isocitrate dehydrogenase	1.46 ± 0.27	2.19 ± 0.37	2.14 ± 0.22
<i>odhA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase (E1 subunit)	1.71 ± 0.16	1.17 ± 0.23	1.15 ± 0.20
<i>odhB</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase (dihydrolipoamide transsuccinylase, E2 subunit)	2.52 ± 0.21	1.39 ± 0.24	1.88 ± 0.46
<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase (beta subunit)	1.36 ± 0.12	1.49 ± 0.19	1.33 ± 0.29
<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase (alpha subunit)	1.37 ± 0.14	1.23 ± 0.34	1.98 ± 0.36
<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase (flavoprotein subunit)	6.00 ± 0.73	3.65 ± 0.85	5.71 ± 1.67
<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase (iron-sulfur protein)	4.28 ± 0.12	1.52 ± 0.27	3.24 ± 0.58
<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase (iron-sulfur protein)	5.85 ± 0.89	2.48 ± 0.60	2.92 ± 0.58
<i>citG</i>	fumarate hydratase	2.05 ± 0.13	1.65 ± 0.35	0.78 ± 0.10
<i>citH</i>	malate dehydrogenase	1.07 ± 0.25	1.64 ± 0.22	2.35 ± 0.31

Table 5 (continued)

Pathway, process or group of genes	Function	Expression levels as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ with <i>B. subtilis</i> 168 as normalizing value		
		CVPYKSp	CVPTSGSp	CVPTSGHISp
<i>Pentose phosphate pathway</i>				
<i>zwf</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.72 ± 0.14	0.82 ± 0.19	0.61 ± 0.09
<i>tkt</i>	transketolase	1.60 ± 0.21	1.06 ± 0.22	0.79 ± 0.08
<i>yqjI</i>	6-phosphate-gluconate dehydrogenase	2.86 ± 0.60	1.15 ± 0.14	0.93 ± 0.11
<i>ywlF</i>	similar to transaldolase	2.30 ± 0.54	1.28 ± 0.36	0.76 ± 0.17
<i>rpeE</i>	similar to ribulose-5-phosphate 3-epimerase	1.24 ± 0.10	1.15 ± 0.33	1.5 ± 0.34
<i>ywjH</i>	similar to transaldolase	2.30 ± 0.12	1.85 ± 0.25	2.02 ± 0.57
<i>Common aromatic pathway</i>				
<i>aroA</i>	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase/chorismate mutase-isozyme 3	1.00 ± 0.13	1.13 ± 0.23	1.02 ± 0.08
<i>Xylose utilization</i>				
<i>xylA</i>	xylose isomerase	0.52 ± 0.09	4.00 ± 0.25	67.58 ± 11.57
<i>xylB</i>	xylulose kinase	0.92 ± 0.22	2.40 ± 0.44	47.38 ± 5.25
<i>xylR</i>	transcriptional repressor of the xylose operon	0.84 ± 0.21	1.26 ± 0.23	2.30 ± 0.39
<i>Nitrogen metabolism</i>				
<i>gltA</i>	glutamate synthase (large subunit)	3.18 ± 0.78	1.8 ± 0.09	2.16 ± 0.58
<i>gltB</i>	glutamate synthase (small subunit)	2.46 ± 0.25	1.70 ± 0.34	2.76 ± 0.45
<i>tnrA</i>	transcriptional pleiotropic regulator involved in global nitrogen regulation	2.62 ± 0.68	1.29 ± 0.35	1.07 ± 0.27
<i>Regulators and others</i>				
<i>ccpA</i>	Transcriptional regulator mediating carbon catabolite repression	1.90 ± 0.35	1.19 ± 0.24	1.25 ± 0.20
<i>ccpC</i>	transcriptional regulator mediating carbon catabolite repression	2.15 ± 0.06	3.62 ± 0.34	3.31 ± 0.73
<i>hprK</i>	HPr kinase (phosphorylation of HPr and Crh proteins at Ser46)	4.00 ± 0.30	2.60 ± 0.33	2.84 ± 0.41
<i>crh</i>	catabolite repression HPr-like protein	2.03 ± 0.35	1.37 ± 0.24	1.63 ± 0.16
<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (class III heat-shock protein)	0.73 ± 0.07	0.95 ± 0.28	1.86 ± 0.55
<i>codY</i>	transcriptional pleiotropic repressor	1.44 ± 0.12	0.88 ± 0.13	0.74 ± 0.16
<i>resD</i>	two-component response regulator involved in aerobic and anaerobic respiration	2.34 ± 0.35	1.92 ± 0.11	1.63 ± 0.19
<i>resE</i>	two-component sensor histidine kinase involved in aerobic and anaerobic respiration	1.87 ± 0.02	1.36 ± 0.15	1.47 ± 0.32
<i>sigB</i>	RNA polymerase general stress sigma factor	0.32 ± 0.05	0.35 ± 0.06	3.59 ± 0.46
<i>rpoA</i>	RNA polymerase (alpha subunit)	0.90 ± 0.09	1.03 ± 0.12	0.57 ± 0.16
<i>atpA</i>	ATP synthase (subunit alpha)	3.20 ± 0.27	1.63 ± 0.23	1.60 ± 0.28
<i>comK</i>	competence transcription factor (CTF)	1.26 ± 0.31	1.18 ± 0.30	0.41 ± 0.09
<i>hbs</i>	nonspecific DNA-binding protein HBsu	1.0	1.0	1.0

ND = Not detected.

activity. In CVPTSGSp, the transcript levels of *ptsH* and *ptsI* were 5.90- and 4.22-fold higher, respectively. These results are in agreement with a previous report, which indicated that *ptsH* and *ptsI* form an operon [Gonzy-Tréboul et al., 1989]. However, it is not known why the inactivation of *ptsG* causes the overexpression of *ptsHI*.

In *B. subtilis*, genes *glcP* and *glcU* have been characterized as encoding glucose transporters [Fiegler et al., 1999; Paulsen et al., 1998]. In addition, gene expression analysis of *B. subtilis* in response to glucose starvation revealed that several genes, including *yurM* and *yurN*,

were overexpressed, suggesting that they encode putative glucose transport proteins [Torsten et al., 2005]. RT-qPCR data show that *yurM* and *yurN* were overexpressed in CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp (fig. 1; table 5), while the *glcU* transcript levels were increased 2.79- and 3.37-fold in CVPYKSp and CVPTSGSp, respectively. It has been reported that an *E. coli* strain lacking PTS activity overexpresses the *mglB* and *lamB* genes, which encode proteins involved in glucose transport. This response is the result of low internal glucose or glucose-6-phosphate concentrations [Flores et al.,

2005]. The reduced glucose uptake rate and the upregulation of *yurM*, *yurN* and *glcU* genes suggest that the *B. subtilis* mutants sense a low concentration of internal glucose or glucose-6-phosphate. The RT-qPCR data suggest that YurM, YurN or GlcU could be contributing to glucose transport in these strains. These non-PTS putative transporters could internalize glucose that should be phosphorylated by glucokinase (GlcK) [Skarlatos and Dahl, 1998]. The transcript level for *glcK* increased (2.64-fold) only in CVPTSGHISp (table 5).

Glycolysis, Gluconeogenesis and Anaplerotic Pathways

With the exception of the *pgi* and *fbaA* genes, which encode phosphoglucosomerase and fructose 1,6-bisphosphate aldolase, respectively, the genes from the glycolytic pathway are clustered in functionally related units. For example, the *gapA*, *pgk*, *tpi*, *pgm* and *eno* genes encode enzymes catalyzing the interconversion of triose phosphates from dihydroxyacetone-phosphate to PEP and are transcribed from a hexacistronic operon together with *cggR*. Protein CggR is a repressor of the *gapA* operon, and the presence of glucose in the medium induces its expression [Ludwig et al., 2001]. The transcript levels of glycolytic genes from the *gapA* operon in CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp were significantly decreased (table 5). This result is in agreement with the reduced rates of glucose import measured in these strains and the expected lower glycolytic flux (table 3).

Conversion of OAA to PEP is a gluconeogenic reaction carried out by PEP carboxykinase (*pckA*). This reaction is essential when the organism grows on TCA cycle intermediates [Diesterhaft and Freese, 1973; Yoshida et al., 2001]. Reactions catalyzed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapB*) and fructose-1,6-bisphosphatase (*fbp*) are also essential under gluconeogenic conditions. The CcpN protein has been described as an additional mediator of carbon catabolite repression in *B. subtilis*, which acts on the *pckA* and *gapB* genes and thereby prevents synthesis of these enzymes in the presence of glycolytic substrates [Servant et al., 2005]. In contrast, *fbp* is expressed constitutively [Blencke et al., 2003]. Malic enzymes catalyze the reversible oxidative decarboxylation of malate into pyruvate with the concomitant reduction of NAD(P)⁺. Bioinformatic analyses of the *B. subtilis* genome sequence have revealed the presence of four paralogous genes encoding putative malic enzyme isoforms: *ywkA*, *ytsJ*, *mals* and *mleA*. On the basis of protein sequence comparisons, these putative malic enzymes can be distributed in two groups: YwkA and MalS

in one group and YtsJ and MleA in the other [Doan et al., 2003]. It has been demonstrated that YtsJ fulfills the main physiological role in malate utilization of these four paralogous enzymes [Lerondel et al., 2006].

Compared to the wild-type strain, the transcript levels in CVPTSGSp for *pckA* and *gapB* were 3.68- and 3.44-fold higher, respectively. In CVPTSGHISp, *gapB* and *fbp* transcript levels were 6.70- and 2.48-fold higher than the wild-type strain, respectively (table 5). These results indicate that these two strains, which lack PTS components, display a partial gluconeogenic transcriptional response in the presence of glucose. The transcript level of genes encoding the malic enzymes, *ytsJ* and *mals*, were overexpressed only in CVPYKSp compared to *B. subtilis* 168, while *mleA* was overexpressed only in CVPTSGHISp. CVPYKSp lacks PykA activity; therefore, synthesis of pyruvate from PEP can proceed only via PTS activity in this strain. However, glucose transport experiments indicated that PTS activity in this strain is highly reduced; therefore, the rate of pyruvate synthesis from PEP is also expected to be decreased (table 3). This result is consistent with a report indicating that in a similar strain lacking PykA growing in mineral medium with glucose, the pyruvate intracellular concentration was significantly low [Fry et al., 2000]. The expected low pyruvate concentration in CVPYKSp could be a metabolic signal that causes the upregulation of the genes *ytsJ* and *mals*. Increased levels of malic enzymes would result in a higher rate of synthesis of pyruvate from malate. In *E. coli* mutants lacking PykA activity, an increase in carbon flux through the malic enzymes has been observed [Emmerling et al., 2002]. A similar response has been detected in *Corynebacterium glutamicum* pyruvate kinase mutants [Becker et al., 2008]. Therefore, increased flux through malic enzymes is a common metabolic response in these microorganisms to compensate for a reduction in the rate of pyruvate synthesis from PEP. Interestingly, the transcript level of the *pps* gene encoding PEP synthase was lower in all the examined mutant strains than in the wild-type (table 5). This response would be expected to reduce the rate of synthesis of PEP from pyruvate, therefore reducing depletion of the latter.

Pyruvate and Acetyl-CoA Metabolism

Pyruvate can be oxidized to generate acetyl coenzyme A (acetyl-CoA), which enters the TCA cycle in a reaction catalyzed by the pyruvate dehydrogenase complex (*pdhABCD*). Acetyl-CoA can be converted to acetyl phosphate and, further, to acetate via phosphotransacetylase (Pta) and acetate kinase (AckA) [Grundy et al., 1993;

Presecan-Siedel et al., 1999; Shin et al., 1999]. Pyruvate can yield acetoin via acetolactate synthase and acetolactate decarboxylase enzymes encoded by *alsS* and *alsD*, respectively [Renna et al., 1993]. Pyruvate can also be reduced for the regeneration of NAD⁺ to produce L-lactate via lactate dehydrogenase (Ldh).

In the presence of excess glucose, *B. subtilis* is known to produce large amounts of acetate, acetoin and butanediol [Speck and Freese, 1973]. Compared to the wild-type strain, a decrease in the formation of acetate in the mutant strains was observed (fig. 2). This result is consistent with the lower expression levels observed in CVPTSGSp and CVPTSGHISp for the *pta*, *ackA*, *alsS* and *alsD* genes (table 5). In CVPYKSp, the transcript levels of the *pta* and *ackA* genes were 1.3- and 1.4-fold higher, respectively, than those of the wild type. These results are not in agreement with the observed 87.6% decrease in acetate accumulation compared to the wild-type strain. However, acetate production data are in agreement with reports showing that a *B. subtilis* strain with an inducible *pyk* gene (iPYK), in the absence of the inducer grew very slowly in glucose minimal medium, and acetate production was significantly reduced [Fry et al., 2000; Pan et al., 2006]. No lactate was detected in cultures with the wild-type or mutant strains, but the transcript level for the *ldh* gene encoding L-lactate dehydrogenase was highly down regulated (0.01) in all mutants (table 5). This result suggests the existence of a transcriptional regulatory mechanism in *ldh* that responds to low glycolytic flux.

The TCA Cycle

In *B. subtilis*, the synthesis and activity of the first three enzymes of the TCA cycle are regulated in response to the cell's need for ATP, reducing power, and 2-ketoglutarate as precursors for glutamate and glutamine production [Rosenkrantz et al., 1985]. When a readily metabolized carbon-energy source, such as glucose, glutamate or glutamine, is present in the medium, the activities of citrate synthase, aconitase and isocitrate dehydrogenase are greatly reduced. *B. subtilis* has two distinct, homologous citrate synthase genes, *citA* and *citZ*, the latter being responsible for the majority of citrate synthase activity in the organism [Jin and Sonenshein, 1994; Ohné, 1974; Rosenkrantz et al., 1985]. In *B. subtilis*, aconitase and isocitrate dehydrogenase are encoded by *citB* and *citC*, respectively. The *citZ* and *citC* genes form an operon together with *citH*, the gene that encodes malate dehydrogenase [Jin and Sonenshein, 1994a, b]. The *citC* and *citH* genes are also transcribed

from gene-specific promoters [Jin et al., 1996]. Acetyl-CoA is transferred to OAA by the enzyme citrate synthase to initiate the TCA cycle. The PycA carries out an anaplerotic reaction, leading to the synthesis of OAA. Therefore, carbon fluxes through the PycA, CitZ and CitA enzymes represent the principal routes for carbon feeding into the TCA cycle. When cells are grown in a medium containing glucose and glutamine as the sole carbon and nitrogen sources, transcription from the *citZ* and *citB* promoters is strongly repressed by CcpC [Jin and Sonenshein, 1994a; Rosenkrantz et al., 1985]. This protein is a LysR family transcriptional regulator that negatively regulates genes encoding enzymes of the tricarboxylic acid branch of the citric acid cycle [Jourlin-Castelli et al., 2000]. In addition, the CcpA protein also controls expression of TCA cycle genes directly by regulating transcription of *citZ* and indirectly by regulating the availability of citrate, the inducer for CcpC [Kim et al., 2002]. The CcpA protein [Henkin et al., 1991; Hueck and Hillen, 1995; Miwa et al., 2000] is a member of the LacI/GalR family of transcriptional regulators [Weickert and Adhya, 1992], which can act as a repressor in carbon catabolite repression (CCR) and as an activator in carbon catabolite activation (CCA) [Stülke and Hillen, 1999].

RT-qPCR analyses showed that the transcript level of the *citZ* gene was increased 2.0-fold in CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp (fig. 1; table 5) compared to the wild-type strain. The isomerization of citrate to isocitrate is catalyzed by aconitase. When compared to the wild-type strain, the *citB* transcript level was 2.0-fold higher in CVPYKSp; however, the level did not change in CVPTSGSp or CVPTSGHISp. The transcript level of *citC* did not change in CVPYKSp compared to the wild type strain. However, the transcript level of this gene increased 2.0-fold in CVPTSGSp and CVPTSGHISp (table 5). The 2-oxoglutarate dehydrogenase complex is composed of E1 (*odhA*) and E2 (*odhB*). The *odhA* and *odhB* transcript levels were 1.71- and 2.52-fold higher, respectively, in CVPYKSp. In *B. subtilis*, succinate dehydrogenase (succinate: menaquinone reductase) is encoded by *sdhC* (cytochrome b558), *sdhA* (Fp), and *sdhB* (Ip); these genes are organized into the *sdhCAB* operon. The transcript levels of the *sdhCAB* genes were 5.85-, 6.00- and 4.28-fold higher in CVPYKSp; 2.48-, 3.65- and 1.52-fold higher in CVPTSGSp, and 2.92-, 5.71- and 3.24-fold higher in CVPTSGHISp. The *citG* gene encodes fumarase; the transcript level for this gene was 2.05-fold higher in CVPYKSp. The *citH* transcript level was 2.35-fold higher in CVPTSGHISp (table 5). The observed transcriptional

pattern where several genes encoding enzymes from the TCA cycle are overexpressed suggests a response to increased flux in this metabolic cycle to compensate for pyruvate limitation. Flux analysis of a PykA-deficient derivative of a lysine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum* showed a slight increase in TCA cycle flux as a response to disruption of pyruvate kinase activity [Becker et al., 2008].

Acetate and Xylose Utilization Genes

B. subtilis can utilize acetate and acetoin as carbon sources. The *acsA* gene, which encodes the enzyme acetyl CoA synthetase, is required for acetate utilization [Grundy et al., 1993]. *B. subtilis* can metabolize D-xylose via consecutive isomerization to D-xylulose (XylA) and then phosphorylation to xylulose-5-P (XylB). The enzymes for this pathway are encoded in the *xylAB* operon [Gartner et al., 1988]. However, *B. subtilis* is not able to grow on D-xylose as the sole carbon source due to the lack of a xylose-specific permease [Schmiedel and Hillen, 1996]. The *xylAB* operon is repressed by XylR, which binds to operator sites in the promoter region and prevents transcription initiation [Dahl et al., 1994]. The binding of D-xylose releases XylR from its operator sites and causes induction. In addition, the *xylAB* operon and the *acsA* gene are subject to CCR. In the presence of glucose, transcription of *xylA*, *xylB* and *acsA* is repressed at a cis-acting site called a carbon repression element (*cre*) [Grundy et al., 1994; Jacob et al., 1991] by the catabolite repressor protein CcpA [Henkin et al., 1997]. The *acsA* transcript level was 4.28-, 4.92- and 22-fold higher in CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp, respectively (table 5), than in the wild-type strain. In CVPTSGSp, the *xylA* and *xylB* transcript levels increased 4.0- and 2.40-fold, respectively, whereas in CVPTSGHISp, the *xylA* and *xylB* transcript levels increased 67- and 47-fold, respectively, compared to the wild-type strain. The observed results suggest that CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp have the potential to utilize both glucose and acetate, whereas CVPTSGSp and CVPTSGHISp could utilize both glucose and D-xylose. However, it remains to be determined whether D-xylose transport can occur in these strains. The above results show that inactivation of *pykA*, *ptsG* or *ptsGHI* causes disruption of CCR in *B. subtilis*. The results for CVPTSGHISp are in agreement with data from a *ptsHI* mutant (Ser46Ala replacement), where CCR was partially or completely relieved in the *xylAB* and *acsA* genes [Dahl et al., 1994; Zalieckas et al., 1998]. The capacity to utilize both glucose and acetate or glucose and xylose can be useful

traits in *B. subtilis* production strains employed in fermentation processes having mixtures of these carbon sources as raw materials.

Pentose Phosphate Pathway

During growth on hexoses, the pentose phosphate (PP) pathway becomes a major source of pentose precursors for nucleotide biosynthesis and the anabolic redox cofactor NADPH [Gottschalk et al., 1986]. The first two enzymes of the oxidative branch of the PP pathway participate in NADPH generation; they are glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphate-gluconate dehydrogenase, encoded by the *zwf* and *yqjI* genes, respectively [Zamboni et al., 2004]. It has been reported that *B. subtilis* directs highly variable fluxes through the oxidative PP pathway when it grows on glucose [Dauner et al., 2001]. The RT-qPCR data show that relative transcript levels of the *zwf* gene did not vary across mutant strains (table 5; fig. 1). However, the transcript level of the *yqjI* gene increased 2.86-fold in CVPYKSp. It has been reported that a *B. subtilis* derivative lacking PykA accumulates a high intracellular concentration of glucose-6-phosphate when growing in mineral medium with glucose [Fry et al., 2000]. It remains to be determined if glucose-6-phosphate has a positive regulatory effect on the *yqjI* gene in *B. subtilis*. The *tkt* gene which encodes transketolase is involved in the non-oxidative branch of the PP pathway. This enzyme creates a reversible link between glycolysis and the PP pathway together with transaldolase activities (YwlF, YwjH) (fig. 1). The transcript level of *ywlF* gene increased 2.30-fold in CVPYKSp, whereas in CVPYKSp and CVPTSGHISp, the transcript level of the *ywjH* gene increased 2.30- and 2.02-fold, respectively, compared to the wild-type strain. These results suggest increased metabolic activity in the non-oxidative branch of the PP pathway in CVPYKSp and CVPTSGHISp.

The Common Aromatic Pathway

In *B. subtilis*, the DAHP synthase enzyme is encoded by the *aroA* gene [Kunts et al., 1997]. The RT-qPCR data reveal that the transcript level of the *aroA* gene did not change in any of the studied strains (fig. 1; table 5). Therefore, the observed differences in DAHP accumulation in *B. subtilis* 168 mutant strains can be considered to be caused mainly by the altered intracellular concentrations of precursor PEP as a consequence of modifications to the central metabolism.

Conclusions

The construction and characterization of isogenic *B. subtilis* strains lacking functional *pykA*, *ptsG* or *ptsGHI* genes allowed determination of the effects of such modifications on some key physiological parameters. Inactivation of PykA caused a significant reduction in the rate of PEP consumption for pyruvate synthesis, as indirectly demonstrated by the increased rate of DAHP production. This result indicates that higher PEP metabolic availability for the synthesis of compounds derived from this precursor, including aromatic compounds, was available in a *pykA* mutant strain than in the wild type or in mutants with inactive *ptsG* or *ptsGHI* genes.

The inactivation of *pykA* or PTS components involved in glucose import caused a reduction in the consumption of this sugar and the corresponding low glycolytic flux, which was ascertained by the observed reduction in the production of organic acids. Analysis of transcript levels by RT-qPCR of the central metabolism genes showed the transcriptional response of these *B. subtilis* mutants to carbon limitation, which includes overexpression of known and putative non-PTS glucose transporters as well as lower expression values for genes involved in the biosynthesis of fermentation products. Detection of increased transcript levels for genes encoding malic enzymes, which convert malic acid to pyruvate, suggests a response in this mutant to compensate for pyruvate limitation. Furthermore, the detection of increased transcript levels of genes involved in acetate and xylose utilization in the presence of glucose indicates disruption of CCR, suggesting the possibility of simultaneous consumption of these carbon sources by the mutant strains.

The physiological and transcriptional analyses performed in this study provide further insight into the roles of PykA and specific PTS components in *B. subtilis*. This information should be useful in future efforts aimed at designing *B. subtilis* strains for the production of compounds derived from PEP that must utilize single or multiple carbon sources as raw materials.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Plasmids and Media

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in table 1. *B. subtilis* 168 was used as the host strain for the construction of mutants on the PEP node and DAHP production (a generous gift from Simone Seror, Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie). *E. coli* XL1 Blue was used in cloning

experiments [Sambrook et al., 1989]. For the construction of plasmids, *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin 200 µg/ml (Ap), phleomycin 10 µg/ml (Phleo) and spectinomycin 100 µg/ml (Sp). Cultures to determine specific growth rate (μ), specific glucose consumption rate (q_{Glc}) and organic acids production were carried out in shake flasks. Samples of frozen stocks of each strain were inoculated in glass tubes with 5 ml of LB supplemented with the respective antibiotics as required and incubated overnight in a shaker (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) at 37°C and 300 rpm. An aliquot of 50 µl or 300 µl from *B. subtilis* 168 or mutant strains, respectively, was used to inoculate a 250-ml baffled flask with 50 ml of MM supplemented with 8 g/l of glucose [Martinez et al., 1997] and the required antibiotics. Biomass concentrations were determined and calculations were performed to adjust inoculum size to an OD_{600nm} of 0.1. Batch cultures were performed in 250 ml baffled flasks with 50 ml of MM supplemented with 8 g/l of glucose at 37°C, 300 rpm. The MM composition was (per liter) $(NH_4)_2SO_4$ 4 g, K_2HPO_4 5.32 g and KH_2PO_4 6.4 g, the initial pH was adjusted to 7.0. This medium was supplemented with a of trace solution containing (per liter) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g, $MnCl_2$ 5 mg, $CaCl_2$ 3 mg, citrate 10 mg and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 mg. All the cultures in MM were supplemented with a 100 × solution of L-tryptophan (4 mg/ml), since strain *B. subtilis* 168 is an auxotroph for this amino acid. The MM was also prepared using PTS (glucose, fructose, maltose and sucrose) and non-PTS carbon sources (arabinose and glycerol) at 8 g/l as a sole carbon source. The experiments for measuring DAHP production with *aroB*⁻ mutant strains were performed using 250 ml baffled flasks at 37°C, employing resting cell cultures in MM and batch cultures in complex medium. The preinoculum for each strain was started from a sample of a frozen stock in 5 ml of LB medium with antibiotic and grown overnight at 37°C. A fraction of the preinoculum was used to start a 50-ml inoculum at an OD_{600nm} of 0.1. The MM supplemented (per liter) with glucose 16 g, yeast extract 15 g, tyrosine 8 mg, phenylalanine 8 mg, tryptophan 4 mg, 2,3-dihydroxybenzoic acid 35 mg, p-hydroxybenzoic acid 48 mg, and p-aminobenzoic acid 62 mg was utilized for growing the inoculum in resting cell experiments [Báez-Viveiros et al., 2001]. When the inoculum reached an OD_{600nm} of 3–4, cells were harvested by centrifugation at 20°C (4,000 rpm for 15 min), washed twice with MM supplemented with 8 g/l of glucose before being resuspended in 50 ml of the same medium. This medium is free of aromatic aminoacids and vitamins that *aroB*⁻ strains no longer can synthesize, thus, cells cannot grow. For batch cultures in complex medium, a fraction of the preinoculum was used to start a 50 ml batch culture at an OD_{600nm} of 0.1. The MM supplemented (per liter) with glucose 15 g and yeast extract 5 g was utilized in batch cultures. Samples from the resting cell cultures and batch cultures were taken up periodically for assaying the cell, DAHP, glucose and organic acid concentration. Cultures for isolating total RNA were performed in 250 ml baffled flasks with 50 ml of MM supplemented with glucose 8 g/l at 37°C and 300 rpm, starting at an OD_{600nm} of 0.1 and harvested at the exponential phase at an OD_{600nm} of 1.0.

PCR Amplification and DNA Manipulation

Amplification by polymerase chain reaction (PCR) of target genes was performed with elongase DNA polymerase (Invitrogen, Baltimore, Md., USA), according to recommendations by

Table 6. Nucleotide sequences of the primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'–3')	Description
ON1	GGCAAGAACGTT GGAAATTC	5' <i>pykA</i> gene/ <i>EcoRI</i> site
ON2	CGAGGGC AAGCTT TCTGG	3' <i>pykA</i> gene/ <i>HindIII</i> site
ON3	CACTATATCCTGAG GAGCTC CAAATTGCC	5' <i>ptsG</i> gene/ <i>SacI</i> site
ON4	GATTTTTTCGAGCTCTTCTTTTG	3' <i>ptsG</i> gene
ON5	CAGCCGGA AGGATCCC AACTGGAAG	3' <i>ptsG</i> gene/ <i>BamHI</i> site
ON6	GGCAAGAACAC GGATCCC GCAAATTGTC	5' <i>ptsI</i> gene/ <i>BamHI</i> site
ON7	CAATGCCCATG AAGCTT GTTGCAAACG	3' <i>ptsI</i> gene/ <i>HindIII</i> site
ON8	CGCAGTCGTTGAACAATTC	5' <i>aroB</i>
ON9	AGCAACTACAGTTGAACGGG	3' <i>aroB</i>
<i>Glucose transport and phosphorylation</i>		
glcTBsa	AAAAAGCGGGACTCTGCCTT	
glcTBsb	GTGCTGATTGACCTCGGACA	
ptsGBsa	CTGGAAGTCGGCAACAACATT	
ptsGBsb	TCAGGTCTAGGCTTGCGTCC	
ptsHBsa	AGCAAATACGACGCTGACGTTA	
ptsHBsb	TCAGCGCCTTTAGCGATACC	
ptsIBsa	GGAAAATGGGTTGGCATGTG	
ptsIBsb	GACGTTGCGCTCATTGAGAAC	
glcPBsa	CAGGCACATTAGAAAACGACAGTTG	
glcPBsb	AGCGCCTAATCCAAAAGAGAACTT	
glcUBsa	TCACTTGGACAGGCCAACC	
glcUBsb	AACAGCGAGGTGAAAACGAG	
yurMBsa	GGTCAGTCTTGTGCCGCTTT	
yurMBsb	TGAATGGGATCCGATAAGCC	
yurNBsa	TCTTTTTGCCGGTTGTCATCT	
yurNBsb	GATGGCCTGAAGCAGCTGAT	
<i>Glycolysis</i>		
glcKBsa	AATTGTCAGCGCGAGATGTG	
glcKBsb	TCCGAGCACCAAACCAAGAT	
pgiBsa	GCGGATAACGATCTTGACGG	
pgiBsb	CCGTCTGTATGGGCAAGCAT	
pfkABsa	TATCGGTGGAGACGGTTCCT	
pfkABsb	TGCCCGAATGTCATTATCA	
fbaABsa	TGCGATTCACTTAGACCACGG	
fbaABsb	CAAATGGATGGTGAGAAGCGT	
gapABsa	CCTTGGCTACAGCGAAGAGC	
gapABsb	TGCTGCCTTCCATAACCATTG	
tpiABsa	CTACTGCGTCATCGGCCACT	
tpiABsb	GCACAATGCCGTGTTTGGAA	
pgkBsa	CAAAGTTGTATTCTGCCGCG	
pgkBsb	GGTGTGATTGTTGGAAGCG	
pgmBsa	TCCGGAATGGTTGAACCAAC	
pgmBsb	ATGATAGCGTGTCCGCCTTT	
enoBsa	TGGCGTATCTATGGCTTGTGC	
enoBsb	TCGGTACAGGAAGCGTTTTTG	
cgRBsa	ATCCGGAGACAGCGATCAAT	
cggRBsb	CAGCGACGATATTTTTGCCTG	
pykABsa	CGTTCTACG GATGTGCTCGA	
pykABsb	TTGTCAACGCCCTCTTGTT	

Table 6 (continued)

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Description
<i>Gluconeogenesis and anaplerotic pathways</i>		
pckABsa	AATGTCGGTGAAAAAGGCCG	
pckABsb	TCGTCACCGATCAGCTTGC	
gapBBsa	CAACGGGTTTGGAAGAATCG	
gapBBsb	GCGTTTCTGCGGAATAGCTG	
fbpBsa	AGGATAAACCGTATGCGGGC	
fbpBsb	ATCTGTCGCCAGGTCATCG	
pycABsa	ATTTCGAACTCAACGGGCAG	
pycABsb	GCTTGGATTTGTCCGGTCTG	
ywkABsa	CTGGGAAGACCTTGGAACA	
ywkABsb	TAATCGCGCCAGTACCTTGA	
malSBsa	GTATCATATCGGGCAGGCAAA	
malSBsb	CTTCAAACATGCCGTCGGTA	
ytsJBsa	TGAAGAGCGCCTCAAAAAAGA	
ytsJBsb	GTTTCAGCGCGTTCACAAGA	
mleABsa	GAAGTGATCGCGGCTGTACA	
mleABsb	TTCATTTGGATTTTCCGCC	
ppsBsa	GACGTCGCAGATGTGATTCG	
ppsBsb	CCGCCATCAAACCTTAGCCAG	
<i>Fermentation, acetoin and acetate production and utilization genes</i>		
ldhABsa	AAAACCTGGTGAGACACGCC	
ldhABsb	AGAAAATGCCAAATCCG	
ackABsa	CCGGCAAATATCGTTGGAAT	
ackABsb	TGCTCAGGCATTGTTTGGTG	
ptaBsa	AAGCGGAGCTGCTCACTCAA	
ptaBsb	CCATGATGAACACGCCTGAA	
alsSBsa	TGGAGCAAGGTGTCACACATG	
alsSBsb	CCGGGCAACGATAATTTTCAG	
alsDBsa	CAATTCAGGCGGACACGTTT	
alsDBsb	AATCCGCTGTGTTTCGGAAGT	
acsABsa	GAGCCGCTAAATCCGGAAGT	
acsABsb	CAGATGAGCTGACTGCCCGT	
<i>TCA cycle</i>		
pdhABsa	CTAATGCGCCGCATGGTATT	
pdhABsb	TCTTGACCCGCAGTAGGAGC	
pdhBBa	ATGCGTTACGCACAGAACTGA	
pdhBBb	TTGCAATCCTTCTGTGCGCAC	
pdhCBa	AGGCTTGCTTGTACCGGTTG	
pdhCBb	GCTTGCCTTACGAGCTTTT	
pdhDBsa	GTAGGACGCCGTCCAAACAC	
pdhDBsb	TTTGTGCGGCACTGTTTGTC	
citABsa	AGCAGAAGCGATTGTTTGC	
citABsb	CAAAATCGATGGCCCTCATC	
citZBsa	GGTCTGCGTCGCAACACTTT	
citZBsb	TCATAACGCCTTCATTGCTC	
citBBsa	CATCAAACCCATACGTGCTGA	
citBBsb	CGGTGCAAGTGACGTTTCA	
citCBsa	GGCGGTATCCGTTCTTTGAA	
citCBsb	TTTACCGGTGACGGCACTC	
odhABsa	AGCCCGCATTACCGTTAGC	
odhABsb	GCTTTGTGTTTCGCGTTTCT	
odhBBsa	AAAGTTCTGCCCTGCTCCT	
odhBBsb	TGCTTCTCGCTCACCTCTT	
sucCBsa	GACTGCTCAATCGCCGAAAT	

Table 6 (continued)

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Description
sucCBsb	CGGTACAACGCATTGCTGTC	
sucDBsa	AGTTCAAACAACCGGCGCTA	
sucDBsb	TCACGAGATCAAGCTCCGC	
sdhABsa	CCTGAAGGCCTGCTTGATTT	
sdhABsb	TCCAGTGCGTAAAGCAGCTG	
sdhBBsa	AAAACCCCGCCAGTCTTGTA	
sdhBBsb	CAACCTGCAAATCACGAACG	
sdhCBsa	TCCGGCTATGCTTGGTTTTT	
sdhCBb	TTACCGTGATGCCCCATGTA	
citGBsa	ATGCGTGTGTGAAGGCGT	
citGBsb	GCTGCAATCGCTTCTGCTTT	
citHBsa	TAATCGGCCAGTCAGGTGTG	
citHBsb	GCCGAGTACGAAACCAGTCAC	
<i>Pentose phosphate pathway</i>		
zwfBsa	AAATCCGCGAAGCATTACG	
zwfBsb	CGCATTGGCAAATCGAATC	
tktBsa	CAATGGCATAACACGCTGTGG	
tktBsb	TGACCCGTGTCCAGCAGATA	
yqjIBsa	AAACAGGCAAACCGCTTGTT	
yqjIBsb	AAGCGGAACGCCTAAGTCAA	
ywjHBsa	TTGACATTCACGGCCTTGAC	
ywjHBsb	CATTGTGCCGATA TGAGCCC	
rpeBsa	CTGATTTTGCCGCTTTAGGC	
rpeBsb	GATATTCGGGACAAAATGGCC	
ywlFBsa	CACAAACATCCTTGCGATGG	
ywlFBsb	GGTGTCTTCCCCCGGTAAC	
tktBsa	CAATGGCATAACACGCTGTGG	
tktBsb	TGACCCGTGTCCAGCAGATA	
<i>Common aromatic pathway</i>		
aroABsa	GGTGGAGCCTTTAAGCCTCG	
aroABsb	GCCAGATCAAATTCATCCGC	
<i>Xilose utilization</i>		
xylABsa	TTGAAGCCAATCATGCCACA	
xylABsb	ACCCTGGTTTGCGTCAACCG	
xylBBsa	TTTATACGATGGGGCGTCA	
xylBBsb	CACCCCTGCAATAATTGCT	
xylRBsa	GGCAGGATACTCCGTTGGAA	
xylRBsb	CCAAATGGCGGTATTGATCAA	
<i>Nitrogen metabolism</i>		
gltABsa	AAAGGACATGTTACACAGGCA	
gltABsb	GCGGAATTGGTGTGAGTCGT	
gltBBsa	AAGAAGCATCGAAACGGCAA	
gltBBsb	AATCGGACAGCCGGATGTAA	
tnrABsa	CGAAAGCTCATTTACCCGCA	
tnrABsb	CCGTCTTACGCTTATTGGC	
<i>Regulators and others</i>		
ccpABsa	CGTTCTCCAGTGCCGATTGT	
ccpABsb	TTCACGGCATCATAAATCGC	
ccpCBsa	GCCGGTGAGAAAATCATTGAG	
ccpCBsb	AATGTGCCGTGAATTTACCT	
hprkBsa	AATACGACCGGCTCGGACTT	
hprKBsb	GACTGCAAGATTTCCGGCTG	

Table 6 (continued)

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Description
crhBsa	TAAACGCCAAAAGCATCATGG	
crhBsb	CTCCAGCGCCTCTTGTTCAT	
clpPBsa	TTGCGAACTCCATCGTGTCA	
clpPBsb	GGCTGTAATAGAGCCGCC	
codYBsa	GCGCAACAGTTGTCGGAAT	
codYBsb	AAGCGAGCTGATAGCCATTTG	
resDBsa	GTTTCAGCCCCGAGAGAAGTCG	
resDBsb	CGAGCACATTTTTTCGTCCGGT	
resEBsa	CGCCTGAAGCAAAAAGAGCTG	
resEBsb	CGACATCAAAAAGCACCCATG	
sigBBsa	AGTCGATCGGCTCATAAGCG	
sigBBsb	TTTTTCGCAAGCATGTCAACC	
rpoABsa	TGGAAGCACTGGACCGAAAG	
rpoABsb	CAGCATGTTGAGCTTCGTCAAG	
atpABsa	TGACCTCGACCAAGCGACTC	
atpABsb	CTTGCTTTTTCAACCGGAAGC	
comKBsa	GGTATACCGAACAGCGTGGC	
comKBsb	TCCGCTCTTCTTTCGGGTAC	
<i>Reference gene</i>		
hbsUBsa	ATCGGTTTTGGTAACTTCGAGG	
hbsUBsb	GCAGGTACTTTGCTTGCTGGA	

The bold and underlined letters indicate restriction sites.

the supplier, in a Gene Amp PCR System thermocycler (Perkin Elmer Cetus, Inc., USA). Primer sets employed for amplification of target genes are listed in table 6. DNA manipulations were performed using standard procedures [Sambrook et al., 1989]. *E. coli* XL1-Blue was transformed by electroporation and *B. subtilis* was transformed according to a two-step protocol [Bron et al., 1999]. Chromosomal DNA was extracted from *B. subtilis* with a DNA chromosomal extraction kit (MO BIO Laboratories, Inc.).

Construction of a Mutant Strain Lacking Pyruvate Kinase Activity

A fragment of the *pykA* gene (1,086 bp) was amplified by PCR using chromosomal DNA from *B. subtilis* 168 as template and primers ON1 and ON2 (table 6). The PCR-generated fragment containing *EcoRI* and *HindIII* sites at the 5' and 3' ends, respectively, was digested with these two enzymes and cloned into pUC19 generating pUCpykA. This plasmid served as a backbone for the insertion in the filled-in *Cla* I site of a 1,255 bp *HincII* DNA fragment with the *aadA* gene flanked by *loxP* sites derived from ploxPSpec-Walt (a generous gift from Fernando Valle, Genencor, Palo Alto, Calif., USA). The resulting plasmid, pUCpykloxPsp (table 1) was linearized with *EcoRI* and used to transform *B. subtilis* 168 competent cells. The transformants were plated on solid LB medium with 100 µg/ml Sp and cultured at 37°C. 10 colonies were selected and their chromosomal DNA

was probed by PCR with primers ON1 and ON2. A PCR product of 2,341 bp was obtained from eight colonies, corresponding to 1,086 bp from the *pykA* gene and 1,255 bp from the *aadA* gene and the *loxP* sites. One of these mutants was selected and named CVPYKSp (table 1).

Construction of a Mutant Strain Lacking the Glucose-Specific Enzyme IICBA^{Glc} PTS Component

A 3,327-bp fragment was amplified by PCR using chromosomal DNA from *B. subtilis* 168 as template and primers ON3 and ON4 (table 6). This PCR product contains the coding region of *ptsG* gene and 693 bp upstream. The PCR-generated fragment was digested with *FspI* and *HindIII* and cloned into pUC19 digested with *SmaI* and *HindIII*, to generate plasmid pUCptsG. This plasmid was digested with *Bstz17I* and *BglII*, to delete 902 bp from the *ptsG* gene and replace it with a 1,118 bp *HincII* *BglII* DNA fragment containing the *aadA* gene flanked by *loxP* sites derived from ploxPSpec-Walt resulting in plasmid pUCptsGloxPsp. This plasmid was linearized with *SacI* and transformed into *B. subtilis* 168. Transformants were selected on Sp plates and cultured at 37°C. Chromosomal DNA from six transformants was examined by PCR using primers ON3 and ON4. In all of them a 3,543-bp fragment corresponding to 2,425 bp of the *ptsG* gene and 1,118 bp of the *aadA* gene and the *loxP* sites was amplified. One of these mutant strains was selected and named CVPTSGSp (table 1).

Construction of a Mutant Strain Lacking Enzyme I (EI), HPr Kinase Protein (HPr) and the IICBA^{Glc} PTS Component

Two PCR products of 770 and 799 bp were amplified using chromosomal DNA from *B. subtilis* 168 as template and primer pairs ON3/ON5, ON6/ON7 (table 6), respectively. The 770-bp PCR product includes 694 bp from the upstream region of the *ptsG* gene and 76 bp from the coding region. The 799-bp PCR product includes 115 bp of the *ptsI* gene and 684 bp from its downstream region. PCR products were digested with *SacI*/*Bam*HI and *Bam*HI/*Hind*III, respectively. The *SacI*-*Bam*HI fragment was cloned into pUC19 digested with the same enzymes to generate plasmid pUCG. This plasmid served as a backbone for the insertion of the *Bam*HI-*Hind*III fragment yielding pUCGI. Finally, this plasmid was digested with *Bam*HI and ligated to an 1,196-bp *Bam*HI DNA fragment derived from ploxSpec-Walt with the *aadA* gene flanked by *loxP* sites. The resulting plasmid was named pUCptsGHIlloxPsp. It was linearized with *SacI* and used to transform *B. subtilis* 168. Transformants were selected on Sp plates and cultured at 37°C. Chromosomal DNA from ten transformants was examined by PCR with primers ON3 and ON7 to detect the desired genetic modification. A 2,765-bp PCR fragment corresponding to 1,569 bp from *ptsG* and *ptsI* genes and 1,196 bp from the *aadA* gene and the *loxP* sites was detected in ten candidate transformants. One of these mutants was selected and named CVPTSGHISp (table 1). It has a 3,980-bp deletion including the complete *ptsH* gene and most of *ptsG* and *ptsI* genes.

Excision of the Spectinomycin Antibiotic Resistance Marker in Strains CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp

The *aadA* gene used to inactivate the *pykA*, *ptsG* and *ptsGHI* genes is flanked by two *loxP* sites. Therefore, the CRE recombinase was used to excise the *aadA* gene to generate strains that could be further genetically modified. The mutants CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp were transformed with plasmid pCRM-Ts-Phleo that includes a gene coding for the CRE recombinase, this plasmid only replicates at 30°C (a generous gift from Fernando Valle, Genencor, Palo Alto, Calif., USA). Transformants cells were selected on LB plates with Phleo at 30°C by 36 h. To cause the loss of pCRM-Ts-Phleo, one transformant was picked and placed on 5 ml antibiotic-free LB medium and incubated at 42°C for 12 h; dilutions of this culture were plated on antibiotic-free LB plates and incubated at 42°C by 24 h. The resulting colonies were picked on LB containing Sp, LB containing Phleo and antibiotic-free LB plates to identify colonies which lost the Sp resistance cassette and pCRM-Ts-Phleo. Loss of the Sp cassette was verified by PCR using primer pairs ON1/ON2 for CVPYKSp, ON3/ON4 for CVPTSGSp and ON3/ON7 for CVPTSGHISp. The antibiotic free mutant strains were named CVPYK, CVPTSG and CVPTSGHI (table 1).

Construction of Strains Lacking Dehydroquinase Activity

A 1,222-bp PCR product including the *aroB* gene was amplified by PCR using chromosomal DNA from *B. subtilis* 168 as template and primers ON8 and ON9 (table 6). The PCR product was digested with *Kpn*I and *Eco*RI, deleting 206 bp from the *aroB* gene and it was cloned into pUC19 digested with the same enzymes to produce plasmid pUCaroB. This plasmid served as a backbone for the insertion of a *Hinc*II fragment with the *aadA* gene flanked by

loxP sites derived from ploxPSpec-Walt into a unique *Eco*RV site present in the *aroB* gene resulting in plasmid pUCaroBloXPSp (table 1). Competent cells of *B. subtilis* 168, CVPYK, CVPTSG and CVPTSGHI strains were transformed with this plasmid and plated on solid LB with Sp and supplement with glucose 4 g/l or arabinose 4 g/l for the CVPYK and CVPTSGHI strains. Colonies that grew on this antibiotic were confirmed by phenotype and by PCR using primers ON8 and ON9. The strains lacking DHQS activity (*aroB*⁻ derivatives) did not grow in mineral medium with glucose since they are auxotrophic for the aromatic amino acids and vitamins. The *aroB*⁻ derivatives recovered growth in mineral medium with glucose when it was supplemented with tyrosine, phenylalanine, tryptophan, 2,3-dihydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid and *p*-aminobenzoic acid at the same concentration employed for the resting cell culture. Chromosomal DNA from several colonies with this phenotype was probed by PCR with primers ON8 and ON9. PCR products of 2,477 bp were obtained from *aroB*⁻ derivatives strains, corresponding to 1,222 bp from the *aroB* and 1,255 bp from the *aadA* gene and *loxP* sites. The *aroB*⁻ derivatives strains were named 168B, CVPTSGB, CVPTSGHIB and CVPYKB (table 1).

Measurement of Cell, Glucose, 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonate 7-Phosphate and Fermentation Products Concentrations

Cell concentration was determined by measuring of optical density at 600 nm. Optical density was converted to dry cellular weight based on their proportional relationship (1.0 optical density at 600 nm = 0.35 g cell dry weight/l). Cells were removed from samples by centrifugation at 13,000 rpm by 5 min and the supernatants were stored at -20°C until sample analysis. Glucose, acetate and acetoin concentration were determined with a HPLC system (600E quaternary bomb, 717 automatic injector, 2,410 refraction index, and 996 photodiode array detectors, Waters, Milford, Mass., USA) using an Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm; 9 Å; Bio-Rad, Hercules, Calif., USA). Running conditions were: 5 mM H₂SO₄ as the mobile phase and 0.5 ml/min as flow rate at 50°C. DAHP concentration in culture supernatants was determined by the thiobarbituric acid assay [Srinivasan and Sprinson, 1958]. This method does not distinguish between DAH and DAHP, and, therefore, the DAHP levels presented will reflect the sum of both compounds.

Measurement of the Initial Rate of [¹⁴C]-Glucose Transport

B. subtilis 168, CVPYKSp, CVPTSGSp and CVPTSGHISp were grown overnight in MM with 8 g/l of glucose at 37°C and 300 rpm. This culture was used to inoculate 50 ml of MM containing 8 g/l of glucose, at an initial OD_{600nm} of 0.1, and grown under the same conditions. When the cells reached an OD_{600nm} of 1.5, they were centrifuged 15 min at 20°C at 4,000 rpm, washed two times with MM supplemented with tryptophan 4 mg/ml and resuspended in the same medium at an 0.5 OD_{600nm} for the wild-type strain and 1.0 OD_{600nm} for mutant strains. For the [¹⁴C]-glucose uptake assays, 540 µl of the cell resuspension were incubated 3 min at 37°C, then the reaction was started by the addition of 60 µl of labeled [¹⁴C] D-glucose (5 mCi mmol⁻¹) and unlabeled glucose (final concentration 0.05 mM). The reactions were kept at 37°C in a water bath and 50-µl samples were taken at 0, 1, 2, 3, 5 and 10 min. Samples were filtered immediately through membrane filters (25 mm Filter Membrane 0.2 µm Nylon, PGC Scien-

tifics) and washed five times with 1 ml of cold MM. Filters were dried and placed in vials with 5 ml of Ecolite scintillation cocktail. Radioactivity was measured in a scintillation counter. The [^{14}C]-glucose uptake rates were calculated from initial linear data in a plot of [^{14}C]-glucose versus time. The protein concentration was quantified by the Bradford [1976] method.

RNA Extraction, DNase Treatment and cDNA Synthesis

Total RNA at least from three independent cultures for each strain was extracted from cultures in MM with glucose. When cultures biomass concentration reached an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 1.0, a 10-ml sample was collected, mixed with 0.5 ml of a RNA later solution (Ambion Inc., Tex., USA) and centrifuged for 15 min/20°C/4,000 rpm. The cells were resuspended in 1 ml buffer I (0.3 M sucrose, 0.1 M sodium acetate and 15 mg/ml lysozyme) and incubated 16 min at room temperature. The mixture was then treated with 2 ml of buffer II (0.01 M sodium acetate, 2% SDS) for 3 min at 70°C. Total RNA was extracted for 3 min with 2 ml of hot acidic phenol and then kept on ice for 5 min. A second extraction was performed with hot acidic phenol and immediately, two more extractions were carried out using phenol:chloroform:isoamlic (25:24:1) and chloroform respectively. RNA was precipitated with 3 M sodium acetate-ethanol. Samples were then suspended in 300 μl of DNase and RNase-free water (Ambion Inc., Tex., USA) and 0.5 μl of RiboLock RNase inhibitor (Fermentas Life Sciences, USA). Total RNA concentration and the 260/280 and 260/230 ratios were determined using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA integrity for each sample was determined in formaldehyde agarose gels (1.2%). RNAs were stored at -70°C. DNase treatment of total RNA samples was performed with TURBO DNA-free kit (Ambion Inc, Tex., USA) following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 to 5 μg of total RNA for each 10 μl reaction with a mixture of 10 pmol/ μl of specific reverse primers for each analyzed gene (table 6), using RevertAidTM H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Inc.) and following the manufacturer's conditions. cDNA was used as template for RT-qPCR assays.

RT-qPCR Experiments

All RT-qPCR experiments were performed at least in triplicate for each gene from each strain. Variation of transcript level for

each analyzed gene never exceeded 30%. These experiments were performed following the MIQE guidelines (Minimal Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) [Bustin et al., 2009]. RT-qPCR was performed with the 7300 Real Time PCR System and the SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Biosystems), MicroAmp optical 96-well Reaction Plates (Applied Biosystems, Calif., USA) and Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems, UK). Amplification conditions were performed as described by Flores et al. [2005] regarding primer sequence design and amplimers size. The length of the utilized forward (name ending with 'a') and reverse (name ending with 'b') primers was between 18 and 24 nucleotides, GC content from 42.9 to 63.2% and a T_m between 58 and 68.1°C. The final primer concentration, in a total volume of 12 μl , was 0.83 μM , 5 ng of target cDNA for each gene were added to the reaction mixture since a higher concentration was not within the dynamic range for the reference *B. subtilis hbsU* gene. A nontemplate control reaction mixture was included for each gene and values appeared for all genes after 31 cycles. The quantification technique used to analyzed data was the $2^{-\Delta\Delta\text{C}_q}$ method described by [Livak and Schmittgen, 2001]. The data were normalized using the *hbsU* gene as an internal control (reference gene) [Wolfgang and Marahiel, 2002]. A reproducible expression level for this gene was detected in all the strains under the culture conditions employed in this study. For each analyzed gene of the wild type strain, the transcription level was considered as one and was used as the control to normalize the data. All RT-qPCR data are reported as relative gene transcript levels when compared to values from *B. subtilis* 168 (table 5).

Acknowledgments

We thank Jose Utrilla for his technical assistance in experiments for measuring the glucose rate of transport, Mercedes Enzaldo for her technical assistance and Paul Gaytán, Jorge Yañez and Eugenio López for primer synthesis. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT): 138521, and DGAPA-PAPIIT, UNAM Grants IN214709.

References

- Ali ON, Bignon J, Rapoport G, Debarbouille M: Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 2001;183:2497-2504.
- Báez-Viveros JL, Bolívar F, Gosset G: Determination of 3-deoxy-D-arabino heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. Biotechnol Bioeng 2001;73:530-535.
- Becker J, Klopprogge C, Wittmann C: Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum*. Microb Cell Fact 2008;7:8.
- Blencke HM, Homuth G, Ludwig H, Mader U, Hecker M, Stülke J: Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. Metab Eng 2003;5:133-149.
- Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- Bron S, Meima R, Maarten Van Dijn J, Wipat A, Harwood CR: Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp.; in Demain A (ed): Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, ed 2. Washington, ASM Press, 1999.
- Bustin AS, Benes V, Garson AJ, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl WM, Shipley LG, Vandesompele JO, Wittwer TC: The MIQE guidelines: minimum information for publications of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 2009;55:1-12.
- Curtis JS, Epstein W: Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucose phosphotransferase, mannose phosphotransferase, and glucokinase. J Bacteriol 1975;122:1189-1199.

- Dahl MK, Degenkolb J, Hillen W: Transcription of the *xyl* operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base-pairs. *J Mol Biol* 1994; 243:413–424.
- Dauner M, Storni T, Sauer U: *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and carbon-excess chemostat cultures. *J Bacteriol* 2001;183:7308–7317.
- Diesterhaft M, Freese E: Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 1973;248:6062–6070.
- Doan T, Servant P, Tojo S, Yamaguchi H, Lerondel G, Yoshida K, Fujita Y, Aymerich S: The *Bacillus subtilis ywka* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiol* 2003;149: 2331–2343.
- Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K, Bailey JE, Sauer U: Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002;184:152–164.
- Fiegler H, Bassias J, Jankovic I, Bruckner R: Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *J Bacteriol* 1999;181:4929–4936.
- Flores N, Flores S, Escalante A, de Anda R, Leal L, Malpica R, Georgellis D, Gosset G, Bolívar F: Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and *gal* regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carboxylate phosphotransferase system. *Metab Eng* 2005;7:70–78.
- Flores N, Xiao J, Berry A, Bolívar F, Valle F: Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 1996;14:620–623.
- Fry B, Zhu T, Domach M, Koepsel R, Phalakornkule C, Ataii M: Characterization of growth and acid formation in a *Bacillus subtilis* pyruvate kinase mutant. *App Environ Microbiol* 2000;66:4045–4049.
- Gartner D, Geissendorfer M, Hillen W: Expression of the *Bacillus subtilis xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *J Bacteriol* 1988;170:3102–3109.
- Gonzy-Tréboul G, Zagorec M, Rain-Guion MC, Steinmetz M: Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. *Mol Microbiol* 1989;3:103–112.
- Gottschalk G: *Bacterial Metabolism*, ed 2. New York, Springer, 1986.
- Grundy FJ, Waters DA, Takova TY, Henkin TM: Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 1993a;10:259–271.
- Grundy FJ, Waters DA, Allen GSH, Henkin TM: Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J Bacteriol* 1993b;175: 7348–7355.
- Grundy FJ, Turinsky JA, Henkin MT: Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *J Bacteriol* 1994;176:4527–4533.
- Henkin TM, Grundy FJ, Nicholson WL, Chambliss GH: Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli lacI* and *galR* repressors. *Mol Microbiol* 1991;5:575–584.
- Hueck CJ, Hillen W: Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* 1995;15:395–401.
- Jacob S, Allmansberger R, Gärtner D, Hillen W: Catabolite repression of the operon for xylose utilization from *Bacillus subtilis* W23 is mediated at the level of transcription and depends on a *cis* site in the *xylA* reading frame. *Mol Gen Genet* 1991;229:189–196.
- Jin S, De Jesus-Berrios M, Sonenshein AL: A *Bacillus subtilis* malate dehydrogenase gene. *J Bacteriol* 1996;178:560–563.
- Jin S, Sonenshein AL: Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* 1994a;176:4669–4679.
- Jin S, Sonenshein AL: Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* 1994b;176:4680–4690.
- Jourlin-Castelli C, Mani N, Nakano MM, Sonenshein AL: CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 2000;295:865–878.
- Kim HJ, Jourlin-Castelli C, Kim SI, Sonenshein AL: Regulation of the *Bacillus subtilis ccpC* gene by CcpA and CcpC. *Mol Microbiol* 2002;43:399–410.
- Kunts F, Ogasawara N, Moszer I, et al: The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 1997;390: 249–256.
- Lerondel G, Doan T, Zamboni N, Sauer U, Aymerich S: YtsJ has the major physiological role of the four paralogous malic enzyme isoforms in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2006; 188:4727–4736.
- Livak K, Shmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Method* 2001; 25:402–408.
- Ludwig H, Homuth G, Schmalisch M, Dyka MF, Hecker M, Stülke J: Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol Microbiol* 2001;41:409–422.
- Martínez A, Ramírez TO, Valle F: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;47: 40–45.
- Miller JE, Backman KC, O'Connor MJ, Hatch RT: Production of phenylalanine and organic by phosphoenol pyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 1987;2:143–149.
- Miwa Y, Nakata A, Ogiwara A, Yamamoto M, Fujita Y: Evaluation and characterization of catabolite responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1206–1210.
- Ohné M: Regulation of aconitase synthesis in *Bacillus subtilis*: induction, feedback repression, and catabolite repression. *J Bacteriol* 1974;117:1295–1305.
- Pan Z, Zhu T, Domagalski N, Khan S, Koepsel RR, Domach MM, Ataii MM: Regulating expression of pyruvate kinase in *Bacillus subtilis* for control of growth rate and formation of acidic byproducts. *Biotechnol Prog* 2006;22:1451–1455.
- Patnaik R, Liao JC: Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3903–3908.
- Paulsen LI, Chauvaux S, Choi P, Saier MH Jr: Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. *J Bacteriol* 1998;180:498–504.
- Pittard AJ: Biosynthesis of the aromatic amino acids; in Neidhardt C (ed): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, ed 2. Washington, ASM Press, 1996, vol 1, pp 458–484.
- Presecan-Siedel E, Galinier A, Longin R, Deutscher J, Danchin A, Glaser P, Martin-Verstraete I: Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1999;181:6889–6897.
- Renna MC, Najimudin N, Winik LR, Zahler SA: Regulation of the *Bacillus subtilis alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* 1993; 175:3863–3875.
- Rosenkrantz MS, Dingman DW, Sonenshein AL: The *citB* gene of *Bacillus subtilis* is regulated synergistically by glucose and glutamine. *J Bacteriol* 1985;164:155–164.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed 2. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sauer U, Eikmanns BJ: The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:765–794.
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP: Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 2004;50:1–17.
- Schmiedel D, Hillen W: A *Bacillus subtilis* 168 mutant with increased xylose uptake can utilize xylose as sole carbon source. *FEMS Microbiol Lett* 1996;135:175–178.

- Servant P, Le Coq D, Aymerich S: CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA independent catabolite repression of *Bacillus subtilis* gluconeogenic genes. *Mol Microbiol* 2005;55:1435–1451.
- Shin BS, Choi SK, Park SH: Regulation of the *Bacillus subtilis* phosphotransacetylase gene. *J Biochem* 1999;126:333–339.
- Skarlatos P, Dahl KM: The glucose kinase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1998;10:3222–3226.
- Speck EL, Freese E: Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 1973;78:261–227.
- Srinivasan PR, Sprinson DB: 2-Keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7 phosphate synthase. *J Biol Chem* 1958;234:716–722.
- Stülke J, Hillen W: Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Op Microbiol* 1999;2:195–201.
- Torsten K, Weibezahn J, Berhardt J, Homuth G, Hecker M: Genome-wide mRNA profiling in glucose starved *Bacillus subtilis* cells. *Molec Genet Genom* 2005;274:1–12.
- Weickert MJ, Adhya S: Isorepressor of the *gal* regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1992;226:69–83.
- Wolfgang K, Marahiel MA: Structure-function relationship and regulation of two *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, HBSu and AbrB. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2002;4:323–329.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985;33:103–119.
- Yoshida K, Kobayashi K, Miwa Y, Kang CM, Matsunaga M, Yamaguchi H, Tojo S, Yamamoto M, Nishi R, Ogasawara N, Nakayama T, Fujita Y: Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 2001;29:683–692.
- Zalieckas JM, Wray VL Jr, Fisher HS: Expression of the *Bacillus subtilis* *acsA* gene: position and sequence context affect CRE-mediated carbon catabolite repression. *J Bacteriol* 1998;180:6649–6654.
- Zamboni N, Fischer E, Laudert D, Aymerich S, Hohmann HP, Sauer U: The *Bacillus subtilis* *yqjI* gene encodes the NADP-dependent 6-P-gluconate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway. *J Bacteriol* 2004;186:4528–4534.
- Zhu T, Pan Z, Domagalski N, Koepsel R, Ataa MM, Domach MM: Engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced total synthesis of folic acid. *Appl Environm Microbiol* 2005;71:7122–7129.
- Zhu T, Phalakornkule C, Koepsel R, Domach MM, Ataa MM: Cell growth and by-product formation in a pyruvate kinase mutant of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 2001;17:624–628.

Inactivation of Pyruvate Kinase or the Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System Increases Shikimic and Dehydroshikimic Acid Yields from Glucose in *Bacillus subtilis*

Cuauhtemoc Licona-Cassani^a Alvaro R. Lara^b Natividad Cabrera-Valladares^c
Adelfo Escalante^c Georgina Hernández-Chávez^c Alfredo Martínez^c
Francisco Bolívar^c Guillermo Gosset^c

^aAustralian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Brisbane, Qld., Australia;

^bDepartamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, México, D.F. and

^cDepartamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Key Words

Shikimic acid · Dehydroshikimic acid · *Bacillus subtilis* ·
Metabolic engineering · Pyruvate kinase ·
Phosphoenolpyruvate

Abstract

The glycolytic intermediate phosphoenolpyruvate (PEP) is a precursor of several cellular components, including various aromatic compounds. Modifications to the PEP node such as PEP:sugar phosphotransferase system (PTS) or pyruvate kinase inactivation have been shown to have a positive effect on aromatics production capacity in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In this study, pyruvate kinase and PTS-deficient *B. subtilis* strains were employed for the construction of derivatives lacking shikimate kinase activity that accumulate two industrially valuable chemicals, the intermediates of the common aromatic pathway, shikimic and dehydroshikimic acids. The pyruvate kinase-deficient strain (CLC6-PYKA) showed the best production parameters under resting-cell conditions. Compared to the PTS-deficient strain, the shikimic and dehydroshikimic acids specific production rates for CLC6-PYKA were 1.8- and 1.7-fold higher, respectively. A batch fermentor culture using complex media supplement-

ed with 83 g/l of glucose was developed with strain CLC6-PYKA, where final titers of 4.67 g/l (shikimic acid) and 6.2 g/l (dehydroshikimic acid) were produced after 42 h.

© 2013 S. Karger AG, Basel

Introduction

The hydroaromatic compounds 3-dehydroshikimate (DHS) and shikimate (SHIK) are metabolic intermediates used as precursors for the synthesis of several pharmaceuticals, including the anti-influenza neuraminidase inhibitor oseltamivir phosphate [Chand, 2005; Gong and Xu, 2008]. SHIK can be extracted from different plant tissues such as the fruit of *Illicium* spp. [Bochkov et al., 2012]; however, on an industrial scale the process is costly and the raw material is not abundant. Novel approaches designed to increase SHIK and DHS availability as chemical precursors are based on fermentative processes using genetically modified microbial strains. Metabolic engineering of the bacterium *Escherichia coli* has shown so far the most promising results for the production of SHIK and DHS at large scale [Escalante et al., 2010; Johansson et al., 2005; Kramer et al., 2003; Li et al., 1999; Yi et al., 2003].

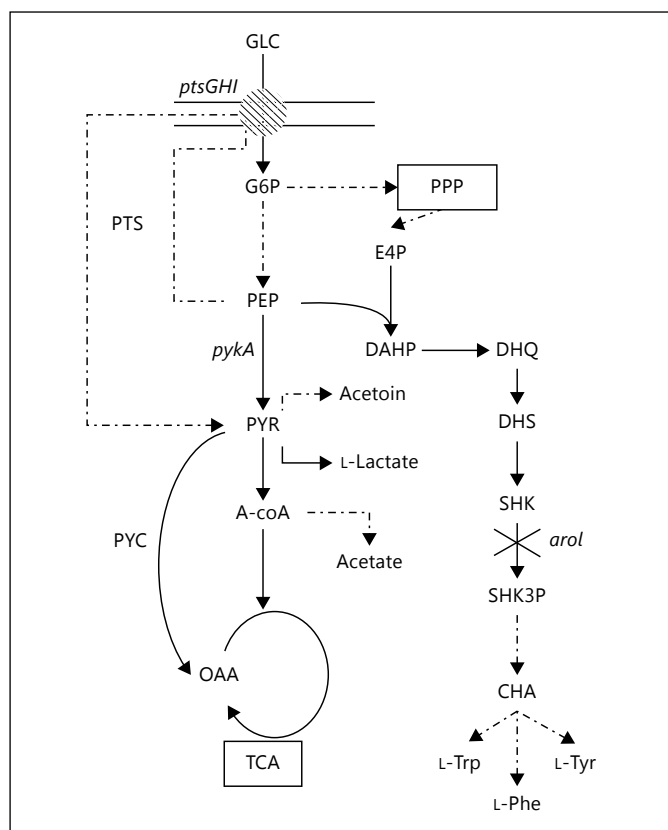


Fig. 1. Central metabolism and aromatic biosynthesis pathways in *B. subtilis*. Single biochemical reactions are shown with continuous lines and grouped reactions with dashed lines. Gene knockout is represented with a single cross. A-CoA = Acetyl-coenzyme-A; CHA = chorismate; DAHP = 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate; DHQ = 5-dehydroquininate; DHS = 3-dehydroshikimate; E4P = erythrose 4-phosphate; GLC = glucose; G6P = glucose-6-phosphate; OAA = oxaloacetate; L-Phe = L-phenylalanine; PEP = phosphoenolpyruvate; PPP = pentose phosphate pathway; PTS = PEP:sugar phosphotransferase system; PYC = pyruvate carboxylase; PYR = pyruvate; SHIK = shikimate; SHK3P = shikimate 3-phosphate; TCA = tricarboxylic acid cycle; L-Trp = L-tryptophan; L-Tyr = L-tyrosine.

The compounds DHS and SHIK are metabolic intermediates of the common aromatic pathway, also known as SHIK pathway, found in plants and most bacteria (fig. 1). This pathway starts with the condensation of D-erythrose 4-phosphate (E4P) and phosphoenolpyruvate (PEP) to yield 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP), a reaction catalyzed by the enzyme DAHP synthase. In the second step, DAHP is converted to 3-dehydroquininate (DHQ) by the enzyme DHQ synthase. The enzyme DHQ dehydratase catalyzes the synthesis of DHS from DHQ and finally, the enzyme SHIK dehydrogenase

converts DHS into SHIK. Three more enzymes catalyze the subsequent steps to generate chorismate (CHA), which is the branching point leading to the synthesis of the aromatic amino acids L-tryptophan, L-tyrosine and L-phenylalanine [Sprenger, 2007].

Strain design strategies for the production of SHIK pathway intermediates involve inactivation of the gene(s) coding for the enzyme downstream of the metabolite of interest. This strategy is usually complemented with modifications that cause redirection of the carbon flow from central metabolism into the common aromatic pathway. The expression of feedback inhibition-resistant versions of DAHP synthase is commonly used as a strategy to increase carbon flow through the common pathway [Draths et al., 1999; Kramer et al., 2003]. Additionally, it has been shown that overexpression of genes encoding transketolase (*tktA*), PEP synthase (*pps*), DHQ synthase (*aroB*) and SHIK dehydrogenase (*aroD*) increase SHIK synthesis capacity in *E. coli* strains [Chandran et al., 2003; Draths et al., 1999; Iomantas et al., 2002; Knop et al., 2001; Patnaik et al., 1995].

The generation of SHIK-producing strains involves reducing or completely abolishing SHIK kinase activity, thus causing partial or total blockage of the common aromatic pathway. This modification causes the accumulation of SHIK, however other intermediates upstream of the pathway such as DHS and quinic acid (QA) also accumulate as a consequence of hydroaromatic equilibration. This phenomenon has been observed in *E. coli* SHIK producer strains and it is explained by the reversibility of the enzymes in the SHIK pathway [Draths et al., 1999; Knop et al., 2001].

The glycolytic intermediate PEP is a compound having various roles in metabolism. It is the precursor of important compounds, e.g. aromatics, and, given its high-energy phosphate bond, it is also involved in energetic reactions [Ogawa et al., 2007]. In *E. coli* and *B. subtilis*, PEP is the initial phosphate donor used by the PEP:sugar phosphotransferase system (PTS) for glucose uptake, consuming 1 mol PEP/mol glucose imported. Additionally, PEP is the substrate of the enzyme pyruvate kinase, which catalyzes the ATP-producing conversion of PEP to pyruvate. Several studies have demonstrated that carbon flux distribution at the PEP node is the major determinant for aromatic compounds yield from glucose [Báez et al., 2001; Chandran et al., 2003]. Considering that PTS and pyruvate kinase are the major PEP-consuming reactions in *E. coli*, these activities have been chosen as inactivation targets to increase PEP availability for aromatics biosynthesis. For example, *E. coli* strains lacking PTS and/or

Table 1. Strains, plasmids and primers used in this study

Strain	Features	Source
<i>E. coli</i> XL1Blue	F':Tn10 proA+B+lacIq Δ(lacZ)M15/recA1endA1 gyrA96(Nalr)thi hsdR17 (rk – mk+)glnV44relA1lac	Sambrook and Russell, 2001
<i>B. subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Simone Seror
CVPYK	<i>trpC2 pykA::loxP</i>	Cabrera-Valladares et al., 2012
CVPTSGHI	<i>trpC2 ptsGHI::loxP</i>	Cabrera-Valladares et al., 2012
CLC58–168	<i>trpC2 aroI::loxPspc</i>	this work
CLC6-PYKA	CVPYK <i>aroI::loxPspc</i>	this work
CLC2-PTS	CVPTSGHI <i>aroI::loxPspc</i>	this work
Plasmid	Features	Source
pLoxSpec_Walt	<i>E. coli</i> plasmid Apr, <i>aadA</i> gene flanked by <i>loxP</i> sites	Cabrera-Valladares et al., 2012
pLoxSpec_IR_IL	pLox_Spec_Walt with <i>aroI</i> regions IR/IL	this work
Primer name	Sequence (5 → 3)	Restriction site
5aroIR	CCTTTCATGGAAGAGGTTGCCG	NcoI
3SKBSR	GGGGGAAGAGAATTCGTTTCGTTGATG	NcoI
5aroIL	CTCTGCCACTAGTTGAATCGACAGG	SpeI
3aroIL	ACTGGGCTCGAGCGTTTAGCGTTC	XhoI
Sc_aroI_fwd	TTCGGCTCTCGCGCAATGTT	–
Sc_aroI_rwd	CTCAGCCTCCATAGGTTGAACCTG	–

pyruvate kinase activities have shown a significant yield increase in aromatics production capacity [Escalante et al., 2010].

B. subtilis is a Gram-positive soil bacterium considered by the Food and Drug Administration as a GRAS (generally recognized as safe) microorganism. Given its natural capacity to secrete proteins, this bacterium has been used for a long time as an industrial producer of enzymes and metabolites [Schallmeyer et al., 2004]. The topology of the central metabolic network around the PEP and pyruvate nodes in *B. subtilis* and *E. coli* displays significant differences. For instance, *E. coli* has two pyruvate kinases isozymes and the enzyme PEP carboxylase feeds oxaloacetate (OAA) to the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) [Sauer and Eikmanns, 2005]. On the other hand, *B. subtilis* has only one pyruvate kinase enzyme and the anapleurotic reaction leading to OAA synthesis is catalyzed by pyruvate carboxylase (PYC). It has been demonstrated that inactivation of pyruvate kinase in *B. subtilis* causes a significant accumulation of PEP, whereas a much smaller amount is detected in isogenic *E. coli* strains [Zhu et al., 2001]. In fact, it has been demonstrated that synthesis of a compound derived from the SHIK pathway, folic acid, can be enhanced by reducing pyruvate kinase activity in *B. subtilis* [Zhu et al., 2005].

We have previously reported a study on the physiological consequences of PTS and pyruvate kinase inactivation in *B. subtilis* [Cabrera-Valladares et al., 2012]. In this study, we assessed the SHIK and DHS production potential of these PTS and pyruvate kinase mutants by generating isogenic strains lacking SHIK kinase activity (AroI⁻). Resting-cell experiments showed a positive effect on SHIK and DHS yields from glucose for both mutant derivatives when compared to the parental strain. The strain lacking pyruvate kinase activity displayed the best production parameters and was employed in batch bioreactor cultures where final titers of 4.67 and 6.2 g/l for SHIK and DHS, respectively, were produced after 42 h.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Plasmids

Strain *B. subtilis* 168 was a generous gift from Dr. Simone Seror, Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie. Strains CVPYK (*B. subtilis pykA::loxP*) and CVPTSGHI (*B. subtilis ptsGHI::loxP*) were previously generated in our group and used as hosts for inactivation of the *aroI* gene [Cabrera-Valladares et al., 2012]. *E. coli* XL1 Blue was used as host for plasmid pLoxSpec_IR_IL construction [Sambrook and Russell, 2001]. All bacterial strains and plasmids used in this study are listed in table 1.

Media Composition and Culture Conditions

TBI medium contains 5% glucose; 0.02% casamino acids; L-tryptophan, 50 µg/ml; and per 100 ml: MgSO₄, 0.06 g; K₂HPO₄, 1.4 g; KH₂PO₄, 0.6 g; (NH₄)₂SO₄, 0.2 g; sodium citrate, 0.1 g. TBII medium is similar as TBI except for 0.01% casamino acids; tryptophan, 5 µg/ml. The biomass production capacity of the *aroI* mutants was increased by supplementing the LB medium with either glucose or L-arabinose. LB with 4 g/l of glucose (LB-glc) was used for CLC6-PYKA and CLC58–168 cultures and, given its very low capacity to uptake glucose; medium for CLC2-PTS cultures was supplemented with 4 g/l L-arabinose (LB-ara). Resting-cell experiments were performed as follows: 20 µl of frozen glycerol stock was used to inoculate a 100-ml shake flask with 10 ml of LB-glc or LB-ara as required (seed culture 1). After 12–36 h (OD_{600nm} = 2), an aliquot of this seed culture was used to inoculate 250-ml shake flasks with 50 ml of medium to an initial OD_{600nm} = 0.1 (seed culture 2). The medium used for seed culture 2 (MMG [Martinez et al., 1997]) was supplemented (per liter) with 2,3-dihydroxybenzoic acid, 6.7 mg; *p*-hydroxybenzoic acid, 12 mg; *p*-aminobenzoic acid, 12 mg; L-tryptophan, 4 mg; tyrosine, 8 mg; phenylalanine, 8 mg; yeast extract, 15 g. Seed culture 2 was harvested once the OD_{600nm} = 3.8 cells were pelleted (4,000 rpm, 15 min, 15°C), washed twice and resuspended at a final OD_{600nm} = 3.4 in 50 ml of MMG medium with 8 g/l of glucose. All shake flask experiments were incubated at 37°C and 300 rpm in a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA). Spectinomycin 100 µg/ml and ampicillin 200 µg/ml were used to supplement media when required. Bioreactor fermentations with CLC6-PYKA strain were carried out in a 1-liter BioFlo 110 Modular Fermentor System (New Brunswick Scientific). Operation parameters were controlled online with AFS-BioCommand Bioprocessing Software (New Brunswick Scientific). Culture conditions were as follows: working volume 0.6 liter; temperature 37°C; air flow rate 0.6 l/min; dissolved oxygen was maintained above 30% air saturation by increasing stirrer speed (500–1,200 rpm) and by mixing air with pure oxygen; pH was maintained at 7.0 with the addition of 15% NH₄OH or 15% H₃PO₄. Fermentation media was the same as seed culture 2 with the following modifications (per liter): (NH₄)₂SO₄ 4 g; K₂HPO₄ 4.8 g; KH₂PO₄ 6.5 g; yeast extract 30 g without aromatic supplementation. Two glucose concentrations, 45 and 83 g/l, were evaluated. The initial seed culture (5 ml) was inoculated with 20 µl of the frozen glycerol stock. After 16–24 h (OD_{600nm} = 2) a second seed culture (two 500-ml baffled shake flasks with 115 ml of MMG, 30 g/l of D-glucose and 15 g/l of yeast extract) was inoculated (initial OD_{600nm} = 0.1) and incubated for 22 h, 37°C at 300 rpm. Prior to bioreactor inoculation, cells were pelleted, washed and resuspended in 10 ml of fermentation media (initial OD_{600nm} = 0.1).

Construction of Plasmid pLoxSpec_IR_IL

Plasmid pLoxSpec_IR_IL was constructed for the inactivation of the *aroI* gene in the different *B. subtilis* strains. The *aroI* up- and downstream flanking regions were cloned in the plasmid pLoxSpec-Walt. Primers 5aroIL/3aroIL were used for the PCR amplification of the 790 bp-IL upstream region, and primers 5aroIR and 3SKBSR for the 796 bp-IR downstream region (table 1). Both IL and IR inserts were appropriately cloned flanking the spectinomycin-resistant gene in pLoxSpec-Walt, using *E. coli* XL1 Blue as host and standard molecular biology techniques [Sambrook and Russell, 2001]. All polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed using Elongase DNA polymerase (Invitrogen,

Baltimore, Md., USA) and Gene Amp PCR system thermocycler (Perkin-Elmer Cetus, Inc., Waltham, Mass., USA). *B. subtilis* chromosomal DNA was extracted using DNA chromosomal extraction kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, Calif., USA).

Construction of *aroI* Mutants

The *B. subtilis aroI* mutants were generated by double-cross-over integration of the spectinomycin-resistant gene into the *aroI* locus. Plasmid pLoxSpec_IR_IL was transformed into *B. subtilis* 168, CVPYK and CVPTSGHI competent strains as follows: Strains were plated overnight (37°C) in LB-ara (CVPTSGHI) and LB-glc (*B. subtilis* 168 and CVPYK). One colony was used to inoculate 3 ml of TBI medium. After 4–7 h (37°C, 300 rpm), cellular competence state was reached and an aliquot of 1.5 ml of this culture was diluted 1:2 with TBII medium. From this dilution, 600 µl were incubated with 1 µg of pLoxSpec_IR_IL (1 h, 37°C, 300 rpm) and plated in LB-ara or LB-glc using spectinomycin for selection. After 3 days, transformants were verified by PCR amplification of a 2.8-kb fragment using Sc_aroI_fwd/Sc_aroI_rwd screening primers (table 1). Additionally, transformants were verified by determining growth recuperation from the auxotrophic condition on minimal media supplemented with L-tryptophan, L-tyrosine and L-phenylalanine.

Analytical Procedures

Cell growth was monitored by measuring optical density at 600 nm (OD_{600nm}) using a DU-70 spectrophotometer (Beckman, Palo Alto, Calif., USA). Dry cell weight determinations (DCW) were performed as described in Martínez et al. [1997]. The concentration of glucose, acetic acid, acetoin, lactic acid, DHS and SHIK were determined with a HPLC system (600E quaternary pump, 717 automatic injector, 410 refraction index, and 996 photodiode array detectors; Waters, Milford, Mass., USA) using an Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm; 9 µm; Bio-Rad, Hercules, Calif., USA). Running conditions were: mobile phase (5 mM H₂SO₄) and 0.5 ml/min flow rate at 50°C. DAHP concentration in culture supernatants was determined by the thiobarbituric acid assay which does not distinguish between DAH and DAHP, therefore, DAHP-reported amounts account for both compounds [Cabrera-Valdadares et al., 2012].

Results and Discussion

Construction and Characterization of Isogenic *B. subtilis* Strains Devoid of SHIK Kinase Derived from Pyruvate Kinase or PTS System-Deficient Mutants

Isogenic *B. subtilis* strains lacking SHIK kinase activity were constructed by deleting the *aroI* gene. This genetic modification was performed in wild-type strain *B. subtilis* 168, a pyruvate kinase-deficient mutant (CVPYK) and a PTS-deficient mutant (CVPTSGHI), to generate strains CLC58–168, CLC6-PYKA and CLC2-PTS, respectively (table 1). Characterization of *B. subtilis* 168, CVPYK and CVPTSGHI in liquid cultures showed, as expected, no accumulation of SHIK, therefore they were not further char-

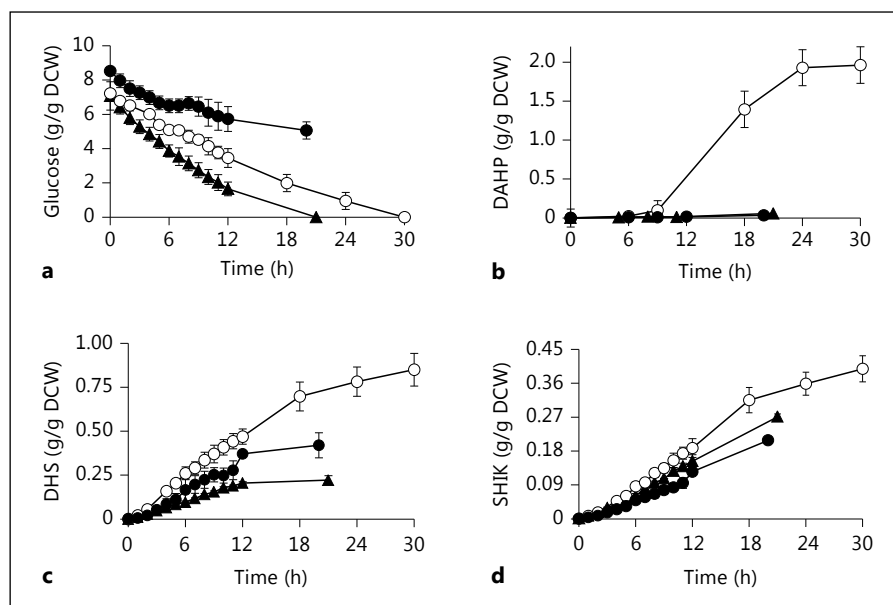


Fig. 2. Production of intermediates from the common aromatic pathway in resting-cell experiments by strains CLC58-168 (▲), CLC6-PYKA (○) and CLC2-PTS (●). Plots show production or consumption values normalized by biomass concentration for glucose (a), 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP, b), dehydroshikimate (DHS, c) and shikimate (SHIK, d). Data shown is the average of three independent experiments.

acterized in this study. Resting-cell cultures with strains CLC58-168, CLC6-PYKA and CLC2-PTS were performed in order to quantify the accumulation of intermediates from the common aromatic pathway caused by the inactivation of *aroI*. We found this type of culture adequate for this analysis since it minimizes undesired effects caused by differences in specific growth rates among strains and also reduces the demand for precursors from competing pathways for the synthesis of biomass [Patnaik and Liao, 1994]. Since the inactivation of *aroI* causes multiple auxotrophies, including the requirement for the aromatic amino acids, growth arrest was observed when transferring cultures from rich medium to the MMG minimal medium.

Resting-cell experiments results are shown in figure 2 and table 2. Under these conditions, no cell growth was detected for any of the strains; biomass concentration remained constant across the time-course (see table 2). Strains CLC6-PYKA and CLC2-PTS displayed a specific glucose consumption rate (q_{Glc}) corresponding to 80 and 50%, respectively, when compared to the reference strain CLC58-168 (fig. 2a; table 2). In addition, due to its low q_{Glc} , strain CLC2-PTS did not completely consume the glucose in the medium. Strain CLC2-PTS, as expected, displayed a lower q_{Glc} due to inactivation of PTS; similar results have been observed in other *B. subtilis* PTS⁻ derivatives [Reizer et al., 1999]. Deletion of *ptsGHI* genes in strain CLC2-PTS completely abolishes PTS activity by eliminating the phosphor transfer relay carried out by enzyme I and Hpr proteins. Thus, in this strain residual glu-

Table 2. Comparison of specific glucose consumption rates (q_{Glc}), SHIK-specific production rates (q_{SHIK}), DHS-specific production rates (q_{DHS}), SHIK yields ($Y_{SHIK/s}$) and DHS ($Y_{DHS/s}$) yields from glucose for *B. subtilis aroI*⁻, *B. subtilis pykA*⁻ *aroI*⁻ and *B. subtilis* PTS⁻ *aroI*⁻ in resting-cell cultures

	CLC58-168	CLC6-PYKA	CLC2-PTS
q_{Glc} , g _{Glc} /g _{DCW} /h	0.377±0.001	0.302±0.001	0.153±0.033
q_{SHIK} , g _{SHIK} /g _{DCW} /h	0.013±0.001	0.018±0.002	0.010±0.002
q_{DHS} , g _{DHS} /g _{DCW} /h	0.012±0.005	0.041±0.003	0.023±0.006
$Y_{SHIK/s}$, g/g	0.035±0.001	0.069±0.007	0.066±0.003
$Y_{DHS/s}$, g/g	0.033±0.004	0.140±0.012	0.152±0.005
Biomass, g/l	1.447±0.033	1.138±0.018	0.984±0.017

Data shown is the average of at least three biological replicates ± SD. Specific rates (q_{DHS} , q_{Glc} and q_{SHIK}) were calculated as the slope of the plots in figure 2.

cose transport capacity is non-PTS-dependent and could be carried out by permeases such as GlcP or GlcU [Fiegler et al., 1999; Paulsen et al., 1998]. It has been reported that pyruvate kinase inactivation has a negative impact on growth capacity, however the cause for this impairment has not been completely determined [Fry et al., 2000].

The potential for producing aromatic compounds was determined based on the production of intermediates of the SHIK pathway (i.e. DAHP, DHS and SHIK). As shown in figure 2b, the first metabolite of the SHIK pathway,

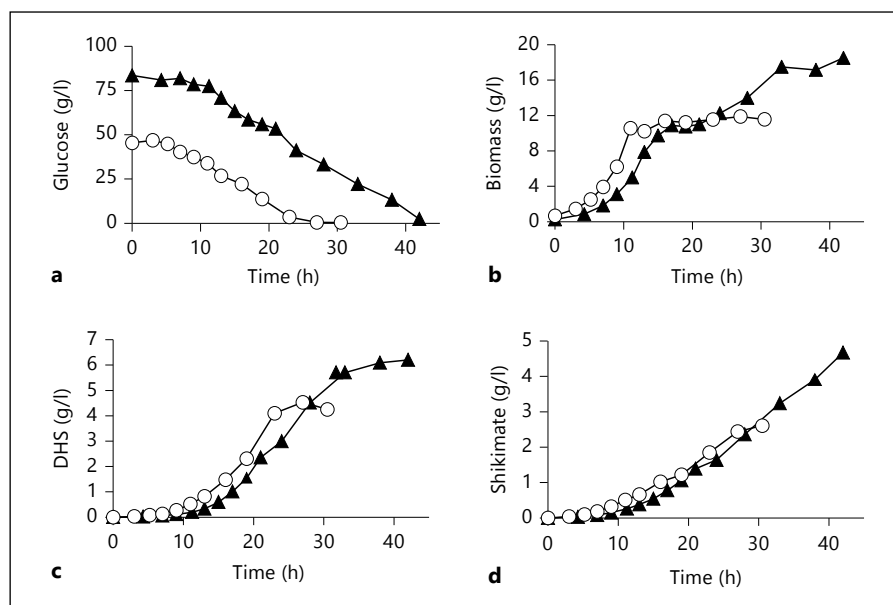


Fig. 3. Batch bioreactor cultures with *B. subtilis* strain CLC6-PYKA devoid of pyruvate kinase and SHIK kinase activities under two different initial glucose concentrations (\blacktriangle 83 g/l, \circ 45 g/l) in rich medium. Residual glucose concentration (**a**), biomass concentration (**b**), DHS concentration (**c**), SHIK concentration (**d**). Data shown represents results from single experiments.

DAHP, is accumulated only in strain CLC6-PYKA. In this strain, the specific SHIK production rate (q_{SHIK}) increased 38 and 80% when compared to CLC58-168 and CLC2-PTS, respectively, as a consequence of pyruvate kinase inactivation. In addition, the specific DHS production rates (q_{DHS}) in strains CLC6-PYKA and CLC2-PTS were 4- and 2-fold higher, respectively, when compared to CLC58-168 (table 2). Regarding SHIK and DHS yields from glucose ($Y_{SHIK/s}$ and $Y_{DHS/s}$), strains CLC6-PYKA and CLC2-PTS displayed a 2- and 4-fold increase, respectively, compared to strain CLC58-168.

These results show that inactivation of pyruvate kinase or PTS has a positive effect on SHIK and DHS yields from glucose. However, the strain lacking pyruvate kinase activity displayed the highest specific production rates amongst all the strains tested. An increased level of the PEP intracellular pool is likely the cause of such effect. Similar results have been observed in *B. subtilis* and *E. coli* DAHP-producer strains lacking pyruvate kinase and 3-DHQ activities [Gosset et al., 1996]. While pyruvate kinase inactivation in *B. subtilis* clearly causes the best production strain performance, in *E. coli*, either PTS or pyruvate kinase inactivation result in similar aromatics production performance [Gosset et al., 1996]. These results can be attributed to the differences in the metabolic network topology around the PEP and pyruvate nodes in *E. coli* and *B. subtilis*, mainly the lack of PEP carboxylase activity in the latter.

The fermentation products acetic acid, lactic acid and acetoin were detected in the resting-cell culture superna-

tants (data not shown). These organic acids were mainly found in CLC58-168 cultures, being lactic acid the main fermentation product (1.5 g/l). As for CLC6-PYKA cultures, no lactic acid was detected and the amount of acetoin was much lower compared to the reference strain (CLC58-168). In cultures with CLC2-PTS, no fermentation products were detected. All differences in by-product formation correlate with the q_{Glc} calculated for each strain (table 2). Similar results have been reported for *E. coli*, where a low glucose uptake rate causes a reduction of carbon flux through glycolysis, hence, decreased overflow in central carbon metabolism is observed [De Anda et al., 2006; Flores et al., 2002].

Bioreactor Cultures with a B. subtilis Strain Devoid of Pyruvate Kinase and SHIK Kinase Activities

Resting-cell experiments showed that CLC6-PYKA displays the best DHS and SHIK production parameters among the studied strains (table 2). To determine the performance of this strain under conditions similar to those used in industrial production processes, batch cultures in a 1-liter bioreactor were carried out with two different initial glucose concentrations (45 and 83 g/l). Culture kinetics under both conditions are shown in figure 3. The cultures did not display exponential growth kinetics through the period when glucose was present (fig. 3a, b). For the batch cultures with 45 g/l of glucose, cells stopped growing after 16 h when the medium still contained approximately 27 g/l of glucose, reaching a final biomass

concentration of 11.7 ± 0.25 g/l. As for the culture with 83 g/l of glucose, a reduction in growth rate was observed at 15 h, followed by a restart of growth 6 h later, until glucose was exhausted. A final biomass concentration of 18.5 ± 0.33 g/l was reached in this culture. The observed kinetic pattern in both cultures displayed a diauxic-like growth behavior, presumably due to depletion of a micro-nutrient from the complex medium (fig. 3b), however further characterization is required in order to determine the cause of such behavior and possibly optimize the production process.

Accumulation kinetics for DHS are shown in figure 3c. A specific DHS production rate of 0.02 g/g/h was observed for both culture conditions. For the batch culture with 83 g/l of glucose, the final DHS titer was 6.2 g/l, 47% higher when compared to cultures with 45 g/l of glucose. The SHIK accumulation profile is shown in figure 3d. Under both batch conditions, a specific productivity of 0.011 g/g/h was observed. For cultures with 83 g/l of glucose, the final SHIK titer was 4.67 g/l, 86% higher when compared to results with cultures supplemented with 45 g/l of glucose. These data show that SHIK and DHS titers can be increased linearly by augmenting the initial glucose concentration (at least up to 83 g/l) without causing a detrimental effect on productivity. It remains to be determined if higher glucose concentrations or a fed-batch strategy could result in higher final SHIK and DHS titers.

This study constitutes the first report comparing the effects of PTS or pyruvate kinase inactivation as a strategy to increase PEP availability for the synthesis of DHS and SHIK in *B. subtilis*. The results presented here show that inactivation of PYKA or PTS can be successful strategies for improving DHS and SHIK productivity and yield from glucose in *B. subtilis*. However, strain CLC6-PYKA displayed better growth and production capacities when compared to CLC2-PTS. Therefore, under the studied conditions, pyruvate kinase inactivation is clearly a better strategy to improve DHS and SHIK production capacity in *B. subtilis*. Further improvement of CLC6-PYKA as a production strain could be achieved by following metabolic engineering strategies such as the high-level expression of genes encoding DAHP synthase and SHIK dehydrogenase [Iomantas et al., 2002].

The strains generated here lack SHIK kinase activity, therefore it is expected that SHIK would be the sole compound overproduced from the common aromatic pathway. However, we detected both DHS and SHIK in all of our experiments. The production of DHS in addition to SHIK has been reported in *E. coli* and *B. subtilis* strains with inactive SHIK kinase [Escalante et al., 2010; Ioman-

tas et al., 2002; Johansson et al., 2005; Knop et al., 2001]. Therefore, the isolation of pure SHIK requires the implementation of downstream processing purification methods, hence an increase in overall production process cost. In *E. coli*, hydroaromatic equilibration has been proposed as the explanation for DHS, DHQ and QA by-product formation during SHIK production. Intracellular accumulation of SHIK during culture production conditions drives its enzymatic conversion to DHS by YdiB, an enzyme paralog of SHIK dehydrogenase (AroE). The intracellular accumulation of SHIK has been explained by two possible mechanisms. It is proposed that during SHIK production, resultant accumulation in culture supernatant favors its transport back into the microbial cytoplasm followed by enzyme-catalyzed equilibration. A second explanation proposes limited SHIK export capacity resulting in its high intracellular accumulation, a condition that drives the equilibration in reverse direction to synthesis, thus causing increased undesired by-products formation. Both mechanisms are not exclusive and are dependent on SHIK transport, which is mediated by protein ShiA (encoded by *shiA* in *E. coli*) [Johansson et al., 2005; Kramer et al., 2003; Whipp et al., 1998].

In *E. coli*, the reduction of SHIK uptake activity has been studied as a strategy for minimizing QA production by disrupting gene *shiA*, using a glucose analogue or by using substrate channeling [Draths et al., 1999; Knop et al., 2001]. It has been observed that carbon-limited growth conditions aggravate by-product formation, whereas growth under carbon excess conditions (e.g. phosphate limitation) favors SHIK production over by-products formation [Chandran et al., 2003; Johansson and Liden, 2006; Knop et al., 2001]. In *E. coli*, the replacement of *ydiB* by its paralog *aroE* resulted in a drastic reduction in QA, DHQ and DHS production, restoring the carbon flow to the synthesis of SHIK in an L-tyrosine production strain [Juminaga et al., 2012].

In *B. subtilis*, the simultaneous production of DHS and SHIK has been explained as the result of partial inhibition of SHIK dehydrogenase by SHIK [Iomantas et al., 2002]. The strategies discussed above for reducing by-product formation in *E. coli* have not yet been evaluated in *B. subtilis*. However, strategies to increase SHIK production in *B. subtilis* have included increasing SHIK dehydrogenase activity by overexpressing the gene *aroD* coding for SHIK dehydrogenase from *Bacillus amyloliquefaciens*. This modification resulted in the improvement of SHIK production to a titer of 14 g/l with 6.8 g/l of DHS and also reducing the DHS/SHIK ratio from 1.1 to 0.48. The expression of a plasmid carrying an extra

copy of *aroA* in the former strain increased SHIK titer up to 19.7 and 9.8 g/l of DHS. However, the DHS/SHIK ratio was not further reduced [Iomantas et al., 2002; Kramer et al., 2003].

The generation of high-performance microbial strains for the production of intermediates or final products of the aromatic pathways requires a combination of strategies to increase carbon flow from central metabolism towards the desired biosynthetic pathway. As shown in this report, the inactivation of pyruvate kinase or PTS in *B. subtilis* resulted in an increase in the yield from glucose for SHIK and DHS synthesis. Either one of these central metabolism modifications could be employed to improve a production strain. However, when considering factors such as the specific rate of glucose consumption and productivity, inactivation of pyruvate kinase was found to be the best approach for strain improvement. It is noteworthy that strain CLC6-PYKA displayed good growth and

production parameters in culture conditions employing medium with 83 g/l glucose, indicating that this strain retains an acceptable level of robustness in spite of having a severe metabolic modification. However, it remains to be determined if further improvement of the PTS-deficient strain could be achieved by applying strategies to increase glucose import capacity as it has been reported with similar *E. coli* mutant strains [Gosset, 2005; Hernández-Montalvo et al., 2003].

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the financial support of Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)/Universidad Nacional Autónoma de México IN203007-2 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) D43243-Z and 83039. We would like to acknowledge Mercedes Enzaldo for technical assistance.

References

- Báez JL, Bolívar F, Gosset G: Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:530–535.
- Bochkov D, Sysolyatin S, Kalashnikov A, Surmacheva I: Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. *J Chem Biol* 2012;5:5–17.
- Cabrera-Valladares N, Martínez LM, Flores N, Hernández-Chávez G, Martínez A, Bolívar F, Gosset G: Physiologic consequences of glucose transport and phosphoenolpyruvate node modifications in *Bacillus subtilis* 168. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2012;22:177–197.
- Chand P: Recent advances in the discovery and synthesis of neuraminidase inhibitors. *Expert Opin Ther Patents* 2005;15:1009–1025.
- Chandran SS, Yi J, Draths KM, Daeniken RV, Weber W, Frost JW: Phosphoenolpyruvate availability and the biosynthesis of shikimic acid. *Biotechnol Prog* 2003;19:808–814.
- De Anda R, Lara AR, Hernandez V, Hernandez-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, Ramirez OT: Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. *Metab Eng* 2006;8:281–290.
- Draths KM, Knop DR, Frost JW: Shikimic acid and quinic acid: replacing isolation from plant sources with recombinant microbial biocatalysis. *J Am Chem Soc* 1999;121:1603–1604.
- Escalante A, Calderon R, Valdivia A, de Anda R, Hernandez G, Ramirez O, Gosset G, Bolívar F: Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 2010;9:21.
- Fiegler H, Bassias J, Jankovic I, Bruckner R: Identification of a gene in *Staphylococcus xyloso* encoding a novel glucose uptake protein. *J Bacteriol* 1999;181:4929–4936.
- 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 ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab Eng* 2002;4:124–137.
- Fry B, Zhu T, Domach MM, Koepsel RR, Phalakornkule C, Ataa MM: Characterization of growth and acid formation in a *Bacillus subtilis* pyruvate kinase mutant. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4045–4049.
- Gong J, Xu W: Different synthetic strategies of oseltamivir phosphate: a potent influenza neuraminidase inhibitor. *Curr Med Chem* 2008;15:3145–3159.
- Gosset G: Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* 2005;4:1–11.
- Gosset G, Yong-Xiao J, Berry A: A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* 1996;17:47–52.
- Hernández-Montalvo V, Martínez A, Hernández-Chavez 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.
- Iomantas Y, Abalakina E, Polanuer B, Yampolskaya T, Bachina T, Kozlov Y: Method for producing shikimic acid. US patent 6436664. 2002.
- Johansson L, Liden G: Transcriptome analysis of a shikimic acid producing strain of *Escherichia coli* W3110 grown under carbon- and phosphate-limited conditions. *J Biotechnol* 2006;126:528–545.
- Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF, Lidén G: Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110.Shik1) under phosphate-limited and carbon-limited conditions. *Biotechnol Bioeng* 2005;92:541–552.
- Juminaga D, Baidoo EEK, Redding-Johanson AM, Bath TS, Burd H, Mukhopadhyay A, Petzold CJ, Keasling JD: Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:89–98.
- Knop DR, Draths KM, Chandran SS, Barker JL, von Daeniken R, Weber W, Frost JW: Hydroaromatic equilibration during biosynthesis of shikimic acid. *J Am Chem Soc* 2001;123:10173–10182.
- Kramer M, Bongaerts J, Bovenberg R, Kremer S, Muller U, Orf S, Wubbolts M, Raeven L: Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng* 2003;5:277–283.
- Li K, Mikola MR, Draths KM, Worden RM, Frost JW: Fed-batch fermentor synthesis of 3-dehydroshikimic acid using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 1999;64:61–73.

- Martinez A, Ramírez OT, Valle F: Improvement of culture conditions to overproduce β -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997; 47:40–45.
- Ogawa T, Mori H, Tomita M, Yoshino M: Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 2007;158:159–163.
- Patnaik R, Liao JC: Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:3903–3908.
- Patnaik R, Spitzer RG, Liao JC: Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of Arog, Tkta, and Pps activities. *Biotechnol Bioeng* 1995;46: 361–370.
- Paulsen IT, Chauvaux S, Choi P, Saier MH: Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. *J Bacteriol* 1998;180:498–504.
- Reizer J, Bachem S, Reizer A, Arnaud M, Saier MH Jr, Stulke J: Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis – the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 1999;145:3419–3429.
- Sambrook J, Russell D: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sauer U, Eikmanns BJ: The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:765–794.
- Schallmey M, Singh A, Ward OP: Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 2004;50:1–17.
- Sprenger G: Aromatic amino acids: amino acid biosynthesis pathways, regulation and metabolic engineering; in *Microbiology Monographs*. Berlin, Springer 2007, vol 5, pp 93–127.
- Whipp MJ, Camakaris H, Pittard AJ: Cloning and analysis of the shiA gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 1998;209:185–192.
- Yi J, Draths KM, Li K, Frost JW: Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2003;19: 1450–1459.
- Zhu T, Pan Z, Domagalski N, Koepsel R, Ataa MM, Domach MM: Engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced total synthesis of folic acid. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:7122–7129.
- Zhu T, Phalakornkule C, Koepsel RR, Domach MM, Ataa MM: Cell growth and by-product formation in a pyruvate kinase mutant of *E. coli*. *Biotechnol Prog* 2001;17:624–628.