



CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN EL NODO DE PEP DE *Bacillus subtilis* 168 PyKA⁻ Y PTSGHI⁻ : EFECTO SOBRE EL RENDIMIENTO DE DAHP A PARTIR DE GLUCOSA.

Natividad Cabrera-Valladares, Alfredo Martínez J, Francisco Bolívar Z y Guillermo Gosset L.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. Tel. 01(777) 3291601,

Fax 01(777) 3291648. gosset@bt.unam.mx

Palabras clave: *Bacillus subtilis* 168, fosfoenolpiruvato, DAHP.

Introducción. La bacteria *Bacillus subtilis* es usado como organismo modelo de las bacterias Gram positivas. En la industria, es una fuente importante de enzimas para detergentes así como de metabolitos para la industria alimentaria por ser considerado un organismo GRAS (generally regarded as safe) (1). *B. subtilis* podría ser una buena candidata para la producción de compuestos aromáticos, actualmente estos compuestos tienen diversas aplicaciones en la industria (2). El fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-P (E4P) son precursores biosintéticos de estos compuestos (2). El objetivo del presente estudio, fue la construcción de cepas mutantes en los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* de *B. subtilis* 168 que codifican enzimas que utilizan a PEP como sustrato y la caracterización fisiológica de estas mutantes con glucosa como fuente de carbono.

Metodología. La construcción de las mutantes CVPYKSp, CVPTSGSp y CVPTSGHISp se llevó a cabo por doble recombinación homóloga entre los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* de *B. subtilis* y el gen *aadA* que codifica para el antibiótico espectinomina (Sp), el gen *aadA* está flanqueado por sitios *loxP*. Se escindió el cassette de Sp en las mutantes generadas y se inactivó el gen *aroB* que codifica la enzima dehidroquinato sintasa (DHQS). Las cepas obtenidas se denominaron 168B, CVPYKB, CVPTSGB y CVPTSGHIB (mutantes dobles). Estas cepas acumularon el intermediario aromático DAHP (Figura 1), el cual se cuantificó por un método colorimétrico (2). Los ensayos de transporte se llevaron a cabo in vitro con células en crecimiento exponencial y utilizando [¹⁴C]-glucosa.

Resultados y discusión. Las cepas mutantes de *B. subtilis* se caracterizaron en matraces usando medio mineral con 44.4 mmol/L de glucosa (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las velocidades específicas de crecimiento, consumo y transporte de glucosa (μ , q_{Glc} , σ_{Glc}).

cepas	μ (h ⁻¹)	q_{Glc} (g _{Glc} g _{DCW} ⁻¹ h ⁻¹)	σ_{Glc} (nmol _{Glc} min ⁻¹ mg _{proteína} ⁻¹)
<i>B. subtilis</i> 168	0.52	0.97	33.973
CVPYKSp	0.07	0.41	4.64
CVPTSGSp	0.19	0.63	0.1
CVPTSGHISp	0.09	0.37	No determinado

Se llevaron a cabo cultivos de células en reposo para cuantificar el flujo de carbono dirigido hacia la síntesis de

compuestos aromáticos en las cepas derivativas AroB⁻ (Figura 1, Tabla 2).

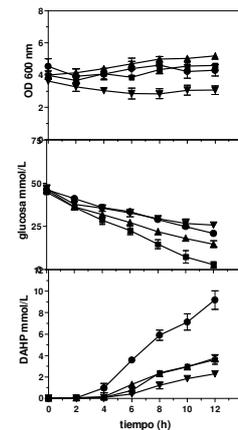


Figura 1. Promedio de 3 experimentos independientes de células en reposo para cuantificar DAHP de las cepas 168B (■), CVPYKB (●), CVPTSGB (▲) y CVPTSGHIB (▼).

Tabla 2. Comparación de q_{Glc} , q_{DAHP} , $Y_{DAHP/Glc}$ en cepas derivativas AroB⁻ en cultivos de células en reposo.

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	0.19	0.07
CVPYKB	1.55	0.53	0.37
CVPTSGB	1.65	0.19	0.10
CVPTSGHIB	1.67	0.17	0.11

Conclusiones.

-La inactivación de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* disminuyeron significativamente el crecimiento y la velocidad inicial de transporte de glucosa en las mutantes generadas.

-La inactivación de la enzima PykA dio como resultado una redirección del flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos aromáticos. El $Y_{DAHP/Glc}$ y la q_{DAHP} para la cepa CVPYKB se incrementaron 5.2 y 2.8 veces, respectivamente en comparación de la cepa 168B.

Agradecimiento. Se agradece el apoyo financiero de la beca de CONACyT a Natividad Cabrera Valladares

Bibliografía. 1.- Bron S Meima, R Maarten Van Dijn, J Wipat A and Harwood C R. (1999). Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* spp. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain A. 2^a ed. ASM Press. E.U.A.

2.- Baez-Viveros JL, Bolívar F and Gosset G. (2000). Determination of 3-deoxy-D-arabino heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucosa in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase system. *Biotechnol Bioeng.* 73: 530-535