

CARACTERIZACIÓN DEL GEN *HEXR1* COMO POSIBLE REGULADOR DE LA VÍA ENTNER-DOUDOROFF Y SU PAPEL EN LA SÍNTESIS DE ALGINATO EN *AZOTOBACTER VINELANDII*

Claudia Velázquez¹, Cinthia Nuñez¹, Miguel Castañeda², Guadalupe Espín¹

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Mor. CP 62250 Fax (777) 3172388; clauvs@ibt.unam.mx

²Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, BUAP, Ciudad Universitaria, Puebla, Pue. CP 72570

Palabras clave: alginatos, vía Entner-Doudoroff, regulación.

Introducción. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria de suelo, fijadora de nitrógeno que posee un metabolismo bastante versátil, ya que es capaz de producir metabolitos secundarios de uso industrial como el polisacárido extracelular alginato, el cual, gracias a sus propiedades, se utiliza como espesante y viscosificante. El metabolismo de carbono en *A. vinelandii* se lleva a cabo vía Entner-Doudoroff (ED) como vía glucolítica, la cual provee de precursores para la biosíntesis de alginato (1). No obstante, poco o nada se sabe acerca de la genética molecular de esta vía ni de su regulación, algo decisivo cuando se desea aumentar el rendimiento en la producción de este polímero. Mediante mutagénesis al azar se creó una colección de 12 mutantes que exhiben una sobreproducción de alginato. Una de ellas, la cepa GG88, tiene interrumpido un gen ortólogo a *hexR* de *Pseudomonas aeruginosa*, un represor de la familia RpiR que regula la expresión de genes de la vía ED (2). El presente trabajo se enfoca en la caracterización del regulador HexR, tanto en la vía ED como en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*

Metodología. Las técnicas de cuantificación de proteína y alginato se llevaron a cabo mediante protocolos descritos previamente en la literatura (3). Los análisis *in silico* se basaron en la secuencia del genoma de *A. vinelandii* (<http://img.jgi.doe.gov>).

Resultados y discusión. Después de analizar la secuencia del genoma de *A. vinelandii*, se identificó al gen *hexR1*, el cual se encuentra contenido dentro de un grupo de genes de la vía ED. HexR de *A. vinelandii* es una proteína de 348 aminoácidos con un motivo Hélice-Vuelta-Hélice que posee un 87% de identidad con su homólogo en *P. aeruginosa*. Por otra parte, es muy común que cepas productoras de cantidades elevadas de alginato presenten un pobre crecimiento celular. Aunque el crecimiento en la cepa GG88 parecía no estar comprometido, se realizó una cinética de crecimiento a 72 horas para comparar el crecimiento de la cepa GG88 contra el fondo silvestre AEIV (fig. 1). Asimismo, con el propósito de evaluar la capacidad de producción de alginato de la cepa mutante GG88, se realizaron ensayos de cuantificación de alginato en diferentes fuentes de carbono (fig. 2)

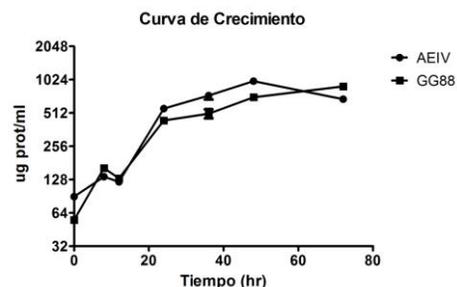


Fig. 1. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre AEIV y de su derivada GG88 (*hexR1::mTn5*)

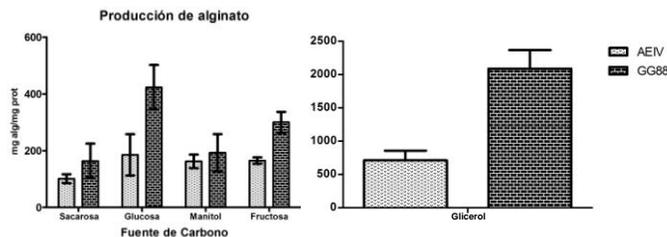


Fig. 2. Producción de alginato en la cepa silvestre AEIV y su derivada GG88 en diferentes fuentes de carbono

Conclusiones. Por el contexto genético en el que se encuentra el gen *hexR1* y por la sobreproducción de alginato en la cepa GG88, es muy posible que HexR actúe como un represor de la vía ED, lo cual concordaría con datos obtenidos en pseudomonáceas. Por otro lado, la producción elevada de alginato se conserva en diferentes fuentes de carbono y el crecimiento celular no está comprometido.

Bibliografía.

- Galindo, E., Peña, C., Nuñez, C., Segura, D., Espín, G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* 6, 7.
- Hager, P. W., Calfee, M. W., Phibbs, P. V. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa devB/SOL* homolog, *pgl*, is a member of the hex regulon and encodes 6-phosphogluconolactonase. *J Bacteriol* 182: 3934-3941.
- Mejía-Ruiz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G., Espín, G. 1997. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii algK* mutant. *FEMS Microbiol Lett* 156:101-6.