



GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MUTANTES EN EL METABOLISMO CENTRAL DE *Bacillus subtilis*.

Natividad Cabrera, Alfredo Martínez, Francisco Bolívar y Guillermo Gosset. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. Chamilpa, Cuernavaca Mor., CP 62210 México. Fax (777) 3 29 16 01. gosset@ibt.unam.mx

Palabras clave: metabolismo central, fosfoenolpiruvato, ingeniería metabólica.

Introducción. La bacteria *Bacillus subtilis* es un microorganismo del suelo gram positivo, generalmente considerado seguro (GRAS, “generally regarded as safe”). Como organismo de producción *B. subtilis* es una fuente importante de enzimas y metabolitos para uso industrial (1). Sin embargo, esta bacteria también pudiera ser una fuente importante de compuestos aromáticos, para que esto suceda, es necesario conocer con más detalle algunos aspectos de su metabolismo central (2). En nuestro laboratorio estamos interesados, en estudiar el efecto de la inactivación de las enzimas relacionadas al nodo de fosfoenolpiruvato (PEP) sobre la distribución de carbono en el metabolismo central y sobre la síntesis de aminoácidos aromáticos.

El objetivo del presente trabajo es la generación y caracterización de mutantes en los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* que codifican para la enzima piruvato cinasa y las enzimas que integran el sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) en *B. subtilis*.

Metodología. Las cepas *Pyk⁻*, *PTSG⁻* y *PTSGHI⁻* se construyeron por un proceso de 4 etapas: 1. Clonación de los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* de *B. subtilis* en el vector de clonación pUC19; 2. Interrupción de los genes de interés con un casete de *Sp*; 3. Intercambio alélico entre *pykA::Sp*, *ptsG::Sp* y *ptsGHI::Sp* y el cromosoma de *B. subtilis* 168; 4. Confirmación de la interrupción por PCR.

Las cepas mutantes en los genes *pykA*, *ptsG* y *ptsGHI* se denominaron CV1PYK, CV4PTS y CV8PTS respectivamente. La caracterización cinética de estas cepas se llevó a cabo en matraces bafleados de 250 ml con un volumen de 50 ml de medio de cultivo mineral a 37°C y 300 rpm; como fuente de carbono y energía se utilizó glucosa a una concentración de 8 g/l. La concentración celular fue cuantificada espectrofotométricamente a 600 nm ($1.0 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 0.35 \text{ g/l}$ de células en peso seco); de cada lectura se almacenó 1 ml de sobrenadante a -20 °C, el cual se utilizó para cuantificar el consumo de glucosa y producción de ácidos orgánicos por HPLC.

Resultados y discusión. Mediante la caracterización cinética de las cepas CV1PYK, CV4PTS y CV8PTS se determinó el efecto de la inactivación de las enzimas PYKA, PTSG y PTSGHI sobre su velocidad de crecimiento (μ), velocidad de consumo de glucosa (q_s) y producción de metabolitos extracelulares (ácidos orgánicos). En la tabla 1 se muestran los valores obtenidos para la cepa silvestre y sus cepas mutantes.

TABLA 1. parámetros cinéticos de la cepa *B. subtilis* 168 y sus cepas mutantes.

Cepas	μ (h^{-1})	q_s ($\text{g}_{\text{gluc}}/\text{g}_{\text{biomasa}} \text{h}^{-1}$)
<i>B. subtilis</i> 168	0.54	0.97
CV1PYK	0.07	0.41
CV4PTS	0.19	0.63
CV8PTS	0.09	0.37

En la cepa silvestre se observó una velocidad de crecimiento específica de 0.54 h^{-1} ; mientras que las cepas mutantes afectadas en su metabolismo central tuvieron una reducción significativa en su velocidad de crecimiento así como en su velocidad específica de consumo de glucosa. En cuanto a la producción de ácidos orgánicos la cepa silvestre produjo 0.8 g/l de ácido acético y 0.5 g/l de acetoína. La cepa *Pyk⁻* disminuyó en un 50% su producción de ácido acético sin embargo, produjo 3 veces más acetoína con respecto a la cepa silvestre. La cepa *PTSG⁻* produjo un 74% de ácido acético y 25% más de acetoína con respecto a la cepa silvestre. La cepa *PTSGHI⁻* no produjo ácido acético y produjo una concentración similar de acetoína con respecto a la cepa silvestre. Estos datos nos indican que las modificaciones realizadas causan una redistribución significativa en el flujo de carbono al nivel del metabolismo central.

Conclusiones. En este trabajo se generaron cepas de *B. subtilis* con alteraciones en las actividades de las enzimas del nodo de PEP. La caracterización de estas cepas nos indica un papel muy importante que desempeñan estas enzimas en su metabolismo central.

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

Bibliografía.

1. Stülke, J. y Hillen W. 2000. Regulation of carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:849-880.
2. Gosset, G, Yong-Xiao, J y Berry, A. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol.* 17: 47-52.