

ESTUDIO BIOQUÍMICO Y GENÉTICO DE LAS ENZIMAS MÁLICAS EN EL METABOLISMO DE CARBONO EN CEPAS DE *Escherichia coli* PTS⁻GLC⁺ Y EN LA CEPA SILVESTRE JM101.

Juan Carlos Sigala, Salvador Flores, Francisco Bolívar.

Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca Morelos, 62250 México.

Fax 56-22-76-01, E-mail: jcsigala@ibt.unam.mx

Palabras clave: E. coli, sistema PTS, enzimas málicas.

Introducción. Una de las estrategias para incrementar la disponibilidad metabólica de fosfoenol piruvato para direccionar mayor flujo de carbono hacia ciertas rutas biosintéticas consiste en generar cepas con el sistema de fosfotransferasa (PTS) inactivo pero con la capacidad de consumir glucosa. Cepas de *E. coli* PTS⁻GLC⁺ (PB12 y PB13) han sido caracterizadas y empleadas en nuestro laboratorio con el propósito de incrementar la síntesis de compuestos aromáticos (1, 2). Recientemente en nuestro grupo se han efectuado estudios de flujo de carbono por RMN (3) y entre otros resultados se encontró que las cepas PB12 y PB13 presentan un flujo de malato a piruvato de 4 y 10 % respectivamente, mientras que en la cepa silvestre este flujo no existe; *E. coli* cuenta con un par de enzimas llamadas málicas que pudieran ser responsables de este flujo, una dependiente de NAD⁺ (Mez-NAD, gen *sfcA*) y otra dependiente de NADP⁺ (Mez-NADP, gen *maeB*). El presente trabajo tiene como objetivo principal estudiar bioquímica y genéticamente a estas enzimas málicas para dilucidar el papel que cumplen en el metabolismo de carbono en cepas *E. coli* PTS⁻GLC⁺ en comparación con la cepa progenitora JM101.

Metodología. Realizar fermentaciones de *E. coli* JM101 y sus derivadas PTS⁻GLC⁺ (cepas PB12 y PB13) para corroborar la velocidad específica de crecimiento (μ), la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) y el rendimiento biomasa sustrato ($Y_{X/S}$). Determinar las actividades enzimáticas de Mez-NAD y Mez-NADP. Clonar los genes *sfcA* y *maeB* de *E. coli* e interrumpirlos por inserción de un cassette de resistencia a antibiótico. Sustituir los genes silvestres *sfcA* y *maeB* por los genes inactivos en la cepa silvestre JM101 y sus derivadas PTS⁻GLC⁺ para obtener las mutantes en las enzimas málicas. Determinar los parámetros cinéticos y las actividades enzimáticas en las mutantes generadas.

Resultados y Discusión.

En el cuadro 1 se presentan los parámetros cinéticos determinados:

	μ (h ⁻¹)?	$Y_{X/S}$ (g _{dlw} /g _s)?	q_s (g _s /g _{dlw} h)?
JM101?	0.75 +/- 0.03?	0.38 +/- 0.01?	1.99 +/- 0.05?
PB12?	0.42 +/- 0.02?	0.34 +/- 0.03?	1.22 +/- 0.17?
PB13?	0.55 +/- 0.04?	0.41 +/- 0.01?	1.34 +/- 0.04?

Cuadro 1. μ , $Y_{X/S}$ y q_s de cepas de *E. coli* JM101, PB12 y PB13.

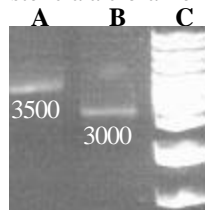
El método para determinar la actividad de las enzimas málicas se basa en la cuantificación del piruvato empleando

la 2,4-dinitrofenilhidracina y midiendo la absorbancia a 445 nm. Los valores de actividad (cuadro 2) se presentan en nmol de sustrato consumido/min/mg de proteína:

	NAD	NADP
JM101	10.10 +/- 2.30	18.60 +/- 2.10
PB12	17.50 +/- 0.81	30.98 +/- 1.48
PB13	9.86 +/- 2.20	19.39 +/- 2.60

Cuadro 2. Actividad de las enzimas málicas de cepas de *E. coli* JM101, PB12 y PB13

Por otro lado, se han clonado los genes de las enzimas málicas (*maeB* y *sfcA*) en el vector pCR-BluntII-Topo y se han interrumpido insertando un cassette que confiere resistencia a cloranfenicol (Fig 1):



- A) *maeB* + lox cat 2.
- B) *sfcA* + lox cat 2.
- C) Marcador de P.M.

Fig. 1. Genes *maeB* y *sfcA* interrumpidos y amplificados por PCR. Finalmente, en el momento en que se generen las mutantes en las enzimas málicas en JM101, PB12 y PB13, se llevarán a cabo estudios cinéticos y de actividad enzimática para compararlos con los resultados obtenidos hasta el momento.

Conclusiones. Se han realizado fermentaciones en reactor de las cepas de *E. coli* JM101, PB12 y PB13 con el fin de corroborar los parámetros cinéticos anteriormente reportados (3). Se han determinado las actividades de las enzimas málicas con NAD y NADP como cofactores en las tres cepas. Se han clonado los genes de las enzimas málicas (*maeB* y *sfcA*) y se han obtenido los PCR's de los genes interrumpidos con un cassette de resistencia a cloranfenicol.

Agradecimientos. A la M.C. Noemí Flores, a Mercedes Enzaldo y al apoyo financiero del CONACyT y la UNAM.

Bibliografía.

- Flores, N. (1995). Construcción y caracterización de cepas de *E. coli* mutantes en el sistema de transporte de carbohidratos PTS, UNAM, IBT. Tesis de maestría.
- Gosset, G., Yong-Xiao, J., y Beery, A. (1996). A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *E. coli*. *J. Ind. Microbiol.* 17:47-52.
- Flores, S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf, A.A., y Bolívar F. (2002). Analysis of carbon metabolism in *E. coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ¹³C labeling and NMR spectroscopy. *Metab. Eng.* 4:124-137.

