



EFFECTO DE LA ELIMINACIÓN DE INHIBICIÓN ALOSTÉRICA POR ATP SOBRE PFK1 EN LA VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE ETANOL EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Víctor Macías, Silvia C. Hernández, Diana I. Arcos, Mariana Achirica, Berenice Pérez, Héctor Quezada. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Departamento de Bioquímica, México D.F. CP 14080.

vykhashsha_shin@hotmail.com

Palabras clave: glicólisis, PFK1, etanol

Introducción. Ante la inminente escasez de petróleo, la obtención de nuevas fuentes de energía se ha tornado un asunto de suma importancia en la sociedad actual. Desde hace algunos años, la vía glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido estudiada debido a su gran importancia como productora de etanol y el uso de éste como una opción viable de combustible alternativo (1). Sin embargo, no ha sido posible entender completamente los mecanismos que regulan el flujo de dicha vía y la producción de etanol. Se ha propuesto entonces, que el principal control ejercido en el flujo de la glicólisis, se encuentra modulado por tres enzimas: hexocinasa (HXK), fructosa 6-fosfato cinasa tipo 1 (PFK1) y piruvato cinasa (PK). Si lo anterior es cierto, cepas recombinantes con mecanismos de inhibición disminuidos, en este caso sobre *PFK1*, deberán tener un mayor flujo glicolítico. Es sabido que la enzima fosfofructocinasa tiene un importante papel en la glucólisis y por tanto sobre la velocidad de producción de etanol. Esa enzima tiene una compleja regulación alostérica por diversos activadores e inhibidores. Induciendo un cambio de prolina por leucina en el aminoácido 728 de dicha enzima, se logra eliminar tanto la inhibición por ATP como la activación por AMP y fructosa 2,6 bifosfato (2).

El objetivo del presente trabajo es determinar si dichas inhibiciones limitan la velocidad de producción de etanol en condiciones normales y de alto consumo de ATP inducido por la presencia de benzoato.

Metodología. Una vez obtenida la secuencia del gen codificante para *PFK1* en *Saccharomyces cerevisiae*, se indujo una mutación *in vitro* en el codón del aminoácido 728 cambiando prolina por leucina, incorporando este gen mutante a un plásmido y transformándolo a la cepa *BY4741*. Una vez obtenida la cepa que sobre-exprese dicha enzima, se cultivará con y sin benzoato sodio 2mM, para finalmente comparar las velocidades de producción de etanol.

Resultados.

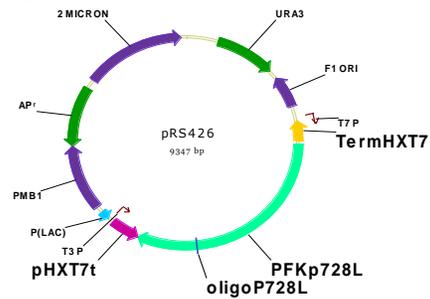


Fig. 1 Plásmido pRS426 conteniendo el gen *PFK1* con la mutación P728L

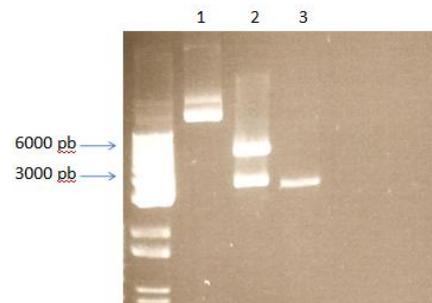


Fig. 2 Electroforesis de DNA mostrando plásmido pRS426 con el inserto *PFKP728L* en el primer carril sin digerir, y cortado con *NheI* (carril 2). En el carril 3 se muestra un PCR del gen *PFK1P728L*

Conclusiones. Hasta el momento hemos tenido éxito en la obtención del gen *PFK1P728L* el cual presenta la mutación deseada, y estamos en espera de incorporar dicho gen en *Saccharomyces cerevisiae* para obtener los resultados acerca de la velocidad de producción de etanol.

Agradecimiento. Agradecemos a CONACyT (106583) y al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (PICS08-5) por el financiamiento otorgado al presente trabajo

Bibliografía

- http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf
- Rodicio R., Strauß A., Heinisch J. (2000). *Journal of Biological Chemistry*. Vol 275: 40952-40960