



## MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE LAS ENZIMAS GLICOLÍTICAS COMO MECANISMO PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN LEVADURA

Héctor Quezada, Carolina Hernández, Víctor F Macías, Mariana Achirica, Berenice Pérez. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Departamento de Bioquímica. México D.F. CP 14080. hquezada23@gmail.com

*Palabras clave: etanol, glicólisis, control metabólico*

**Introducción.** Debido a su importancia comercial e industrial, diversos estudios se han enfocado en entender la regulación de la vía glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo hasta la fecha no se han entendido a fondo los mecanismos que regulan el flujo glicolítico y la producción de etanol. Actualmente se sabe que el incremento en la transcripción de los genes que codifican para las enzimas de la glicólisis no provoca un aumento en la producción de etanol (1). Se considera que el principal mecanismo de control del flujo es la modulación de la actividad enzimática mediada por sustratos, productos o metabolitos efectores (2). Sin embargo no se han identificado las enzimas particulares que limitan el flujo de la vía *in vivo*. El entendimiento de la regulación de esta vía permitirá la construcción de cepas modificadas genéticamente con mayor velocidad de producción de etanol.

El objetivo del presente trabajo es entender el efecto que tienen sobre la velocidad de producción de etanol, la alteración de la regulación por metabolitos efectores (activadores e inhibidores) de las enzimas hexocinasa (Hxk2) y fructosa 6-fosfato cinasa tipo 1 (Pfk1), así como el aumento de la capacidad de transporte de glucosa y de la demanda de ATP.

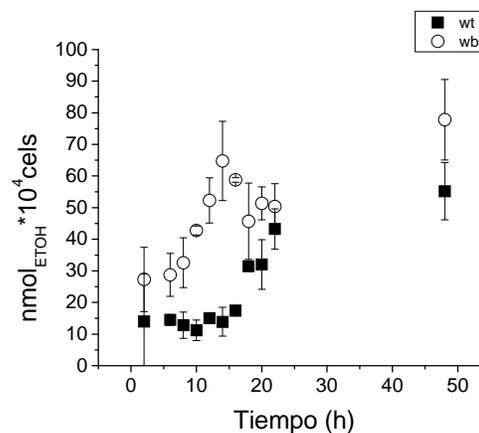
**Metodología.** En una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* se expresarán de forma simultánea, una forma de Hxk2 insensible a inhibición por trehalosa 6-fosfato (3), una forma de Pfk1 insensible a inhibición por ATP (4) y se sobre-expresará el transportador de glucosa Hxt1. Se comparará la velocidad de producción de etanol con una cepa silvestre bajo condiciones de alta demanda de ATP inducida por benzoato de sodio en el medio.

**Resultados.** Hasta el momento hemos expresado el gen *SpHxk2* de *Schizosaccharomyces pombe* el cual codifica para una forma de Hxk2 insensible a inhibición por trehalosa 6-fosfato en un plásmido de sobre-expresión en la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*. A pesar de que se detectó el correspondiente mRNA, no se detectó aumento en la actividad enzimática, lo que sugiere que existe un mecanismo de regulación post-transcripcional que limita la actividad de la proteína heteróloga.

En relación al transporte de glucosa, se sobre-expresó el gen *HXT1* y la velocidad de transporte de glucosa aumentó solamente al doble, sin que ello alterara la velocidad de producción de etanol.

En relación la Pfk1, hemos clonado en un vector de sobre-expresión el gen mutante *PFK1P728L* el cual codifica para una forma de la enzima insensible a inhibición por ATP y aún no hemos determinado la velocidad de producción de etanol en la cepa transformada con dicho plásmido.

Hasta el momento la única alteración que ha tenido un efecto significativo sobre la producción de etanol ha sido el aumento en la demanda de ATP con el uso de 2 mM de benzoato de sodio en el medio (Fig.1).



**Fig. 1.** Efecto del benzoato de sodio (2mM) sobre la velocidad de producción de etanol. WT sin benzoato (■), con benzoato(○).

**Conclusiones.** Hasta el momento la única alteración que ha aumentado la velocidad de producción de etanol ha sido el aumento en la demanda metabólica de energía.

**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.

1. Schaaff I, Heinisch J, Zimmermann FK (1989) *Yeast*. 5(4):285-90.
2. Daran-Lapujade P, Rossell S, van Gulik WM, Luttik MA, de Groot MJ, Slijper M, Heck AJ, Daran JM, de Winde JH, Westerhoff HV, Pronk JT, Bakker BM. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(40):15753-8.
3. Bonini BM, Van Dijck P, Thevelein JM. (2003) *Biochim Biophys Acta*. 1606(1-3):83-93.
4. Rodicio R, Strauss A, Heinisch JJ. (2000) *J Biol Chem*. 2000, 275(52):40952-60.