

MANIPULACIÓN DEL TRANSPORTE Y FOSFORILACIÓN DE GLUCOSA EN CEPAS DE *Escherichia coli*.

Verónica Hernández*, Fernando Valle[†], Francisco Bolívar* y Guillermo Gosset*. Genencor International[‡]. Depto. de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. 62210 Cuernavaca, Morelos. México. Fax: 01 73 17 23 88. vhm@ibt.unam.mx

Palabras clave: PTS, asimilación de glucosa

Introducción. PTS es el mecanismo de transporte de azúcares más importante para un gran número de bacterias, incluyendo a *Escherichia coli*(1). Es por ello que varios grupos han enfocado su esfuerzo al desarrollo de mutantes que sean capaces de utilizar glucosa a través de sistemas alternos (2,3), nuestro grupo uno de ellos. Este interés se basa en la necesidad de incrementar la disponibilidad de PEP, debido a que ésta molécula es el precursor directo o indirecto de una gran variedad de metabolitos de interés comercial. Nuestro laboratorio ha reportado el aislamiento de mutantes de *E. coli* capaces de transportar glucosa y crecer de forma similar a la cepa silvestre parental a pesar de no contar con PTS funcional (4). Sin embargo, no se sabe con exactitud que mutaciones se llevaron a cabo para reconstituir el fenotipo Glc⁺, lo que impide reproducir este fenotipo en todas las cepas de *E. coli*. Por otro lado, al no conocer completamente el fondo genético de las mutantes PTS⁻Glc⁺, es muy difícil poder explicar o predecir el comportamiento que presentarán. El presente trabajo establece las bases de un nuevo método de obtención de cepas (PTS⁻Glc⁺) con fondo genético conocido capaces de asimilar glucosa a pesar de no contar con el sistema PTS activo, en el que la modulación de la expresión de los genes *glk* y *galP* permitió encontrar los niveles de expresión adecuados para reconstituir el fenotipo Glc⁺ y desarrollar una velocidad de crecimiento similar a la μ_{max} de cepa silvestre parental.

Metodología. Se construyó una librería de 5 promotores de diferente fuerza, los cuáles fueron fusionados a los genes *glk* y *galP*. Dichas fusiones fueron clonadas en un vector de bajo número de copias, los cuáles se transformaron en un fondo PTS⁻. Para evaluar la reconstitución del genotipo Glc⁺ se llevaron a cabo cultivos en matraces de 250 ml con 50 ml de medio M9-Glc ajustando a densidad óptica de 0.05 aproximadamente, incubados en una agitadora orbital (G25, New Brunswick Inc., NJ) a 270 rpm y 37 °C. Además las mutantes con fenotipo más relevante se caracterizaron en fermentadores de 1 l de volumen operacional.

Resultados y Discusión. Para realizar los cultivos que permitieron demostrar la reconstitución del fenotipo Glc⁺ mediante el uso del sistema GalP-Glk, una cepa PTS⁻ (VH32) fue transformada con la familia de vectores pvGlcGalP, los cuales contienen fusiones de *glk* y *galP* a una librería de promotores. En total se caracterizaron 14 mutantes, con las cuales se obtuvieron resultados de velocidad de crecimiento muy similares, pero 2 de ellas fueron más eficientes. Estas dos mutantes y los controles

más importantes se utilizaron para hacer una caracterización más a fondo, midiendo actividad enzimática de Glk y realizando mediciones de transporte de glucosa. Resultados preliminares, obtenidos con otro tipo de cepas, sugieren que los niveles de expresión requeridos para obtener velocidades de crecimiento similares a las desarrolladas por las cepas silvestres parentales, dependen del genotipo de cada una de ellas. Por otro lado, cultivos en fermentador nos permitieron verificar que las mutantes PTS⁻Glc⁺ presentan menor rendimiento biomasa-sustrato porque producen más ácido acético que la cepa silvestre, debido a un exceso en el flujo de la vía glicolítica. Cabe mencionar que las cepas PTS⁻Glc⁺ poseen un considerable interés industrial, debido a su capacidad de asimilar simultáneamente mezclas de fuentes de carbono de forma eficiente y a su mayor disponibilidad de PEP (precursor de la vía de compuestos aromáticos y algunos otros metabolitos de interés comercial).

Conclusiones. La librería de promotores construida en este trabajo, permite la modulación de la expresión de genes eficientemente. Por otro lado, la expresión de *galP* y *glk* bajo ésta librería de promotores en vectores de bajo número de copias permite reconstituir el fenotipo Glc⁺ en cepas de *E. coli* PTS⁻ desarrollando velocidades de crecimiento similares a la μ_{max} de la cepa parental. Además, se generó un método reproducible para la obtención de cepas con genotipo conocido capaces de transportar glucosa a pesar de no contar con un sistema PTS funcional (fenotipo PTS⁻Glc⁺).

Agradecimiento. A Mercedes Enzaldo por su ayuda técnica. Este trabajo fue soportado por CONACYT (25375N) y parcialmente por Genencor Int.

Bibliografía

1. Postma PW, Lengeler JW. (1993) Phosphoenolpyruvate. Carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol Rev.* 57:543-594.
2. Snoep, J.L., Arifan, N., Yomano, L.P., Fliege, R.K., Conway, T., Ingram, L.O. 1994. reconstitution of glucose uptake and phosphorylation in a glucose negative mutant of *Escherichia coli* by using *Zymomonas mobilis* genes encoding the glucose facilitator protein and glucokinase. *J. Bacteriol.* 176:2133-2135.
3. Saier, M. H. Jr, Bromberg, F. G. y Roseman, S. 1973. Characterization of constitutive galactose permease mutants in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 113:512-5142.
4. Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature* 4:620-623.