

INGENIERIA METABOLICA PARA INCREMENTAR EL FLUX Y RENDIMIENTO DE ETANOL EN *Escherichia coli* ETANOLOGENICA

METABOLIC ENGINEERING TO INCREASE THE ETHANOL FLUX AND YIELD IN ETHANOLOGENIC *Escherichia coli*

G. Huerta-Beristain, J. Utrilla-Carreri, G. Hernández-Chávez, F. Bolívar, G. Gosset y A. Martínez*

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México

Recibido 16 Junio 2004; Aceptado 16 Noviembre 2004

Resumen

Se estudió el efecto de sobreexpresar genes del metabolismo de carbono sobre la velocidad específica (flux) de formación de etanol, en la cepa de *Escherichia coli* etanológica KO11, la cual tiene integrado en el cromosoma los genes que codifican para las enzimas piruvato decarboxilasa (Pdc_{Zm}) y la alcohol deshidrogenasa ($AdhB_{Zm}$) de *Zymomonas mobilis*. Los resultados muestran que en la cepa KO11, el control del flux de carbono está parcialmente fuera de la glucólisis y existe una actividad limitada de Pdc para canalizar el flux de glucosa o xilosa hacia la formación de etanol. Incrementando la actividad de Pdc_{Zm} se logró aumentar el rendimiento de conversión de glucosa o xilosa en etanol en 27%. Durante la fase estacionaria, el flux de formación de etanol aumentó 42 y 44% y el de formación de ácidos orgánicos disminuyó 46 y 76% para glucosa y xilosa, respectivamente, al incrementar la actividad intracelular de Pdc (6.1 veces) en KO11. Por otro lado, probablemente como una respuesta a efectos de regulación alostérica y de actividad limitada de Pdc, los incrementos en la actividad enzimática de fosfofructocinasa o de piruvatocinasa redujeron drásticamente el flux de consumo de glucosa o xilosa y de formación de etanol, incrementando el de formación de ácidos orgánicos.

Palabras clave: control del flux metabólico, flux glucolítico, flux de etanol, piruvato decarboxilasa, xilosa y glucosa.

Abstract

Modification of ethanol flux, using glucose or xylose as carbon source, in ethanologenic *Escherichia coli* KO11 was studied, by increasing the activity of key carbon metabolism enzymes. KO11 strain contains, integrated into the chromosome, genes that code for pyruvate decarboxylase (Pdc_{Zm}) and alcohol dehydrogenase ($AdhB_{Zm}$) from *Zymomonas mobilis*. Results indicate that KO11 has limited Pdc activity to channel carbon flux to ethanol formation from glucose or xylose. Hence, flux control is outside glycolysis and Pdc controls the ethanol flux. When intracellular activity of Pdc was increased 6 fold, the theoretical yield of ethanol on glucose or xylose was increased by 27%, during the stationary phase the ethanol flux was increased 42 and 44%, and the organic acid formation rate was reduced 46 and 76% for glucose or xylose, respectively. Furthermore, as a response to allosteric effects and a limited Pdc activity, an increase in the phosphofructokinase or pyruvatekinase enzymatic activity drastically reduces glucose consumption and ethanol formation flux, with a concomitant increase in organic acid formation.

Keywords: metabolic flux control, glycolytic flux, ethanol flux, pyruvate decarboxylase, xylose, and glucose.

1. Introducción

Existen varias alternativas para obtener combustibles mediante tecnologías renovables. Desde el punto de vista biotecnológico, una de las opciones con mayor viabilidad para sustituir o complementar a la gasolina es el etanol

carburante (Ingram y col., 1999; Mielenz, 2001). El mercado potencial del etanol carburante es enorme. Desafortunadamente, en México no existe una fuente directa de azúcares para obtener etanol en ese orden de magnitud. Por esto se plantea el uso de residuos agroindustriales. Los cuales, son abundantes, contaminan y tienen un costo

*Autor para la correspondencia: E-mail: alfredo@ibt.unam.mx
Tel: (77) 73291601 Fax: (77) 73172388

marginal en el planeta y en nuestro país (Martínez y col., 2002). El bagazo de caña de azúcar, que es uno de los residuos agroindustriales más abundante en México, contiene 30-40% de hemicelulosa y 30-50% de celulosa (Ingram y col., 1999). Específicamente, la hemicelulosa contiene, además de glucosa y manosa, un 85% de pentosas, principalmente xilosa y un pequeño porcentaje de arabinosa (Martínez y col., 2000; Martínez y col., 2001). Los microorganismos etanológicos silvestres como *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria Gram (-) *Zymomonas mobilis*, no poseen la capacidad de metabolizar los azúcares de cinco átomos de carbono (Bothast y col., 1999; Ingram y col., 1999; Aristidou y Penttilä, 2000). Por lo cual la producción de etanol, a partir de xilosa o mezclas conteniendo esta pentosa, usando estos microorganismos, presenta bajos rendimientos. Por otro lado, la ingeniería metabólica (IM) se define como la modificación o la introducción de nuevas reacciones bioquímicas para el mejoramiento específico de propiedades celulares mediante tecnología de ADN recombinante (Bailey 1991; Stephanopoulos 1999; Nielsen 2001). La IM se emplea para reestructurar o crear nuevas redes metabólicas, alterar la distribución de flujos de carbono, mejorar rendimientos de formación de productos, extender el intervalo de sustratos metabolizables, complementar vías, obtener productos nuevos en la célula huésped, dirigir o reducir el flujo hacia una ramificación deseada y mejorar productividades. Las cepas silvestres de *E. coli* en condiciones anaeróbicas presentan un sistema de fermentación ácido-mixta, obteniéndose las siguientes fracciones de productos (mmoles de carbono de producto / mmol carbono de glucosa consumida): lactato 0.40, etanol 0.17, CO₂ 0.15, acetato 0.12, succinato 0.07 y

formato 0.004 (Fig. 1). Como se observa, el 60% del carbono es canalizado a la formación de ácidos orgánicos y el rendimiento de conversión de glucosa en etanol es de 0.127 g_{Et-OH}/g_{Glc}, es decir tan solo del 25% respecto al teórico máximo (0.51 g_{Et-OH}/g_{Glc}). Mediante técnicas de IM con *E. coli* se han construido varias cepas etanológicas (Ohta y col., 1991; Bothast y col., 1999; Ingram y col., 1999; Aristidou y Penttilä, 2000). Entre ellas, la más promisorias con fines de aplicación industrial es la denominada KO11. Esta cepa se obtuvo integrando en su cromosoma al operón *pet*. El cual contiene los genes que codifican para las enzimas piruvato decarboxilasa (*pdh*) y alcohol deshidrogenasa (*adhB*) de *Z. mobilis* bajo el control de la región de regulación de la piruvato formato-liasa (*pfl*; Ohta y col., 1991; Ingram y col., 1999). La cepa KO11 convierte eficientemente glucosa, manosa, xilosa, arabinosa, o sus mezclas en etanol. Obteniéndose en medios ricos rendimientos de conversión de azúcar(es) en etanol, cercano a los teóricos (> 90%) (Ohta y col., 1991; González y col., 2002). Sin embargo, utilizando hidrolizados de la fracción hemicelulósica del bagazo de caña (ricos en xilosa) o medios minerales suplementados con glucosa o xilosa, con la cepa KO11 solo se alcanzan rendimientos menores al 70% del teórico (Martínez y col., 1999; Huerta-Beristain 2004). No obstante, al parecer no existen limitaciones fisiológicas para incrementar el rendimiento de conversión de glucosa o xilosa en etanol en medio mineral (Martínez y col., 1999; Tao y col., 2001; González y col., 2002). Por tal razón, en el presente proyecto se presentan los resultados de incrementar este parámetro en KO11, utilizando medio mineral con glucosa o xilosa, mediante la manipulación del nivel de actividad de varias enzimas del metabolismo central del carbono.

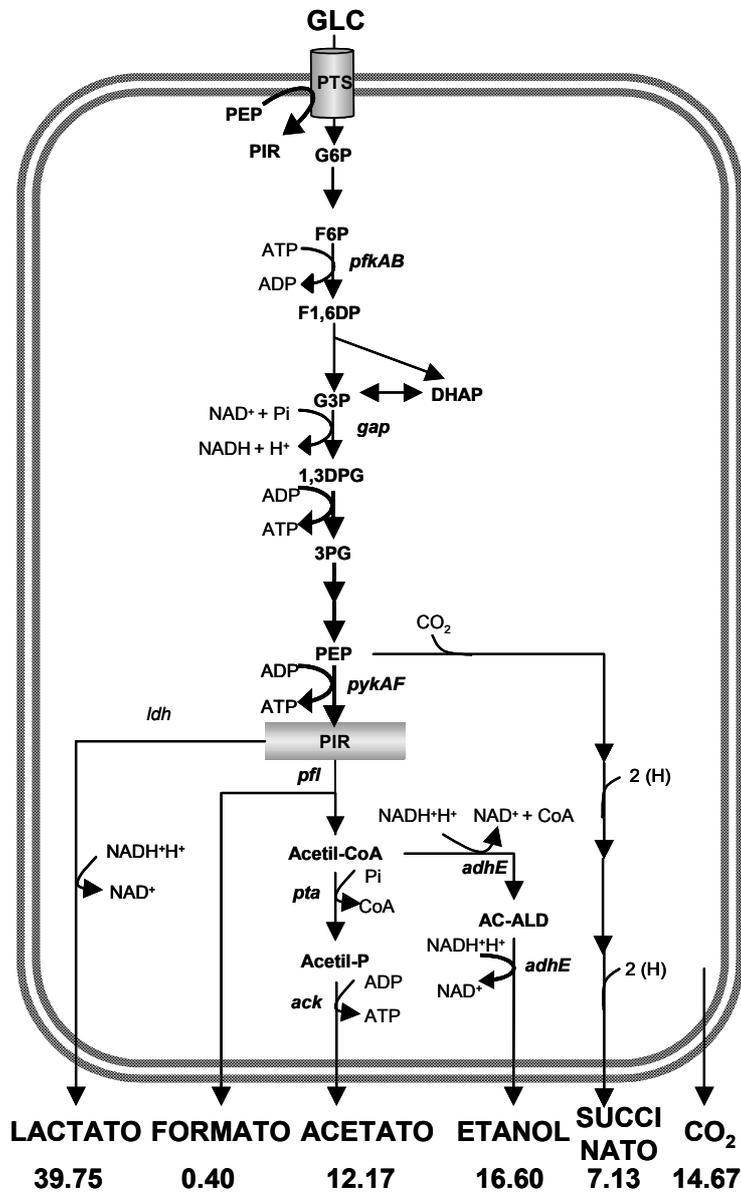


Fig. 1. Productos de fermentación obtenidos con *Escherichia coli* silvestre creciendo en glucosa (Böck y Sawers, 1996). Los valores en la parte inferior indican el porcentaje de conversión de glucosa en los productos indicados en $\text{mmol}_{\text{PRODUCTO}}/\text{mmol}_{\text{GLC}}$.

Abreviaturas: GLC, Glucosa; G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, Fructosa-6-fosfato; F1,6DP Fructosa-1,6-Difosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; G3P, gliceraldehído-3-fosfato; Pi, pirofosfato; 1,3DPG, 1,3 difosfoglicerato; 3PG, 3 fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; Acetil-CoA, acetil coenzima A; CoA, coenzima A; AC-ALD, acetaldehído. Genes u operones que codifican para enzimas o complejos enzimáticos: *pts*, Sistema de fosfotransferasa para transporte de glucosa; *pfk*, fosfofructocinasa; *gap*, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; *pyk*, piruvatocinasa; *pfl*, piruvato formato liasa; *ldh*, lactato deshidrogenasa; *adhE* acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa; *pta*, fosfotransacetilasa; *ack*, acetato cinasa.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas, medio de cultivo y desarrollo de inóculos

La cepa etanológica KO11 (*E. coli* B Δ frd pfl::pdc_{Zm}-adhB_{Zm} cat; Ohta y col 1991) fue transformada con diferentes plásmidos (Tabla 1), derivados de un vector de mediano número de copias (pTrc99A; Pharmacia Biotech^{MR}), que contiene el promotor fuerte *trc* inducible por IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosido) y el gen represor *lacI^f*. Las actividades enzimáticas, homólogas o heterólogas, que se incrementaron fueron: galactosa permeasa (GalP_{Ec}); fosfofructocinasa (Pfk_{Ec}); fosfogliceratocinasa (Pkg_{Ec}); piruvatocinasa (Pyk_{Bs}); y piruvato decarboxilasa (Pdc_{Zm}). Los subíndices *Ec*, *Bs* y *Zm* indican el microorganismo del cual procede el gen: *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* y *Zymomonas mobilis*, respectivamente. La composición del medio mínimo M9

(Sambrook y col., 1989) por litro es de: 6 g Na₂HPO₄; 3 g KH₂PO₄; 1 g NH₄Cl; 0.5 g NaCl; 2 ml de MgSO₄·7H₂O 1M; 0.1 ml de CaCl₂ 0.1M; 0.1 ml de Tiamina 1 mg/ml (esterilizada por filtración); 40 g de glucosa o xilosa como fuente de carbono y ampicilina (para mantener la presión de selección de los plásmidos usados) 50 mg/l. La relación C/N fue de 71, tanto para glucosa como xilosa, debido a que se decidió evaluar la producción de etanol durante el crecimiento exponencial y la fase estacionaria de los cultivos, y por tanto se requería de un exceso de azúcar. El crecimiento del inóculo se realizó en matraces de 500 ml (200 ml de M9 con 20 g/l de glucosa o xilosa, 35° C, 120 rpm), incubados 14 h, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 1.3. Todos los cultivos fueron inoculados centrifugando (2,500 x g, 10 min y temperatura ambiente) la cantidad suficiente de inóculo para obtener una DO₆₀₀ inicial aproximada de 0.1 (0.037 g_{DCW}/l).

Tabla 1. Plásmidos empleados.

Plásmido	Características	Referencia
pTrc99A	Derivado del vector de expresión pKK233-2, tiene el promotor híbrido <i>trc</i> río arriba del sitio de clonación múltiple (MCS) de pUC18, los terminadores de transcripción <i>rrnB</i> y resistencia a ampicilina.	Pharmacia Biotech ^{MR}
pTrc99A-pgk _{Ec}	Derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>pgk</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Huerta-Beristain 2004
pTrc99A-pfk _{Ec}	Derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>pfk</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Emmerling y col. 1999
pTrc99A-pyk _{Bs}	Derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>pyk</i> de <i>B. stearothermophilus</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Emmerling y col. 1999
pTrc99A-galP _{Ec}	Derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>galP</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Hernández-Montalvo y col. 2003
pTrc99A-pdc _{Zm}	Derivado de pTrc99A que contiene el gen <i>pdc</i> de <i>Z. mobilis</i> bajo el promotor <i>trc</i> .	Huerta-Beristain 2004

2.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos anaeróbicos se realizaron en sistemas de mini-fermentadores o mini-fleakers (Beall y col., 1991), con un volumen de trabajo de 200 ml y velocidad de agitación a 100 rpm. La temperatura se controló a 35°C y el pH a 7.0 mediante la adición automática de KOH 2N. Los experimentos aquí reportados se realizaron por duplicado y en los resultados se muestran valores promedio y el error estándar de la media. Para evaluar si existía una diferencia estadísticamente significativa, se llevó a cabo un análisis de datos aplicando una prueba, *t*, de Student no apareada y considerando una distribución de una cola. En la sección de resultados se indican únicamente los valores de variables que fueron significativamente diferentes a un nivel de confianza del 95%

2.3. Métodos analíticos

La densidad óptica fue medida a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU-70) y convertida a peso seco de células (DCW: dry cellular weight), de acuerdo a una curva de calibración ($1 \text{ DO}_{600} = 0.37 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{l}$). Todas las muestras fueron centrifugadas (1,400 x g, 5 minutos y temperatura ambiente); el paquete celular se desechó y el sobrenadante se congeló (-20°C) para su análisis posterior. La glucosa, xilosa y ácidos orgánicos fueron determinadas por HPLC usando métodos previamente desarrollados (Martínez y col., 2000). La determinación de etanol se realizó por cromatografía de gases (Cromatógrafo de Gases Agilent, Serie 6850, Wilmington, D.E.) utilizando como estándar interno 1-butanol. Se utilizó He como fase móvil (5.0 ml/min, 19.05 psi y 65 cm/s) a través de una columna capilar (Innowax 19091N-133E, de 30 m de longitud 0.25 mm de diámetro interno y con un espesor de película de 0.25 μm , J&W Scientific), y 0.2 μl de sobrenadante inyectados automáticamente. La temperatura del horno fue ajustada con rampas de 80 hasta 200°C. La

detección de los compuestos separados, se llevó a cabo con un detector de ionización de llama (FID-1A) a 250°C. El análisis y procesamiento de datos se realizó con el programa Agilent Cerity QA/QC. La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry. Las actividades enzimáticas fueron verificadas en extractos celulares cosechados durante el crecimiento exponencial (a las 6 h de haber sido inoculados) mediante métodos conocidos (Maitra y Lobo, 1971; Bergmeyer y Gawehn, 1974; Hoppner y Doelle, 1983; Sakai y col., 1986; Martínez y col., 1999), con reacciones acopladas a otras enzimas, monitoreando la oxidación o reducción de NAD^+ a 340 nm durante 3 min a 30°C.

3. Resultados y discusión

3.1 Posibles pasos que limitan el flux de formación de etanol en *E. coli* etanológica

Con el fin de aumentar algunas actividades enzimáticas y aclarar si limitan el flux de formación de etanol en la cepa de *E. coli* etanológica, se incrementó mediante técnicas de ingeniería metabólica, el nivel de las actividades enzimáticas de cinco pasos del metabolismo central de carbono que se consideraron claves en la canalización de glucosa o xilosa hacia la formación de productos de fermentación. Se evaluó la probable limitación del transporte de glucosa y xilosa mediante la sobreexpresión constitutiva de la permeasa de galactosa GalP_{Ec} , la cual transporta inespecíficamente glucosa, xilosa y galactosa (Hernández-Montalvo y col., 2003). Por otro lado, se incrementó el nivel de actividad enzimática, por separado, de tres enzimas que están involucradas en la formación o consumo de ATP, con los mayores valores absolutos de $\Delta G'^{\circ}$ en la glucólisis, y que en los casos de la fosfofructocinasa y la piruvatocinasa constituyen etapas con regulación alostérica en esta vía (Stryer, 1999). La primera es la fosfofructocinasa (Pfk_{Ec}), que cataliza la

fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato, mediante una reacción irreversible. Esta enzima es activada por AMP, ADP y fructosa 6 fosfato, e inhibida por ATP y PEP. La segunda enzima es la fosfogliceratocinasa (Pfk_{Ec}) que cataliza la primera reacción de formación de ATP, mediante la conversión de glicerato 1,3 difosfato en 3 fosfoglicerato y ATP, reacción parcialmente reversible. La tercera es la piruvatoquinasa heteróloga de *Bacillus stearothermophilus* (Pyk_{Bs}) que cataliza la formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato y ADP. Esta enzima es activada alostéricamente por AMP y ribosa-5-P, pero no es activada por fructosa-1,6-difosfato, ni inhibida por ATP y PEP como la Pyk homóloga de *E. coli* (Emmerling y col., 1999; Chassagnole y col., 2002). Adicionalmente, se evaluó el incremento en la actividad de las enzimas que desvían el flujo del piruvato hacia la formación de etanol en *E. coli* etanologénica, particularmente mediante el incremento de la piruvato descarboxilasa heteróloga de *Zymomonas mobilis* (Pdc_{Zm} ; Martínez y col., 1999).

3.2 Estrategia para incrementar la actividad enzimática de posibles pasos limitantes

Con el propósito de evitar un efecto de carga metabólica por la sobreexpresión de genes, el cual generalmente ocasiona problemas de crecimiento (Snoep y col., 1995; Martínez y col., 1999), se utilizó un promotor inducible por IPTG, con el cual se puede modular el nivel de expresión y consecuentemente la actividad enzimática y así reducir esos problemas. El nivel de actividad específica de las enzimas analizadas incrementó entre 2 y 30 veces respecto a los niveles basales de la cepa control KO11/pTrc99A. El efecto de la sobreexpresión se evaluó durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria de los cultivos.

3.3 Efecto de los incrementos de actividad enzimática en los flujos de consumo de sustrato y de producción de etanol

3.3.1 En presencia de glucosa

En comparación con la cepa control (KO11 transformada con el vector pTrc99A sin inserto), para la fase exponencial se encontró lo siguiente (datos no mostrados): A) en todos los casos no se afectó la velocidad específica de crecimiento; B) el flux de consumo de glucosa se redujo 63.4% y 67.8% al incrementarse las actividades específicas de Pfk_{Ec} y Pyk_{Bs} , respectivamente y en los otros casos no se afectó; C) en consecuencia, el flux de etanol disminuyó 35.9% y 50.7% cuando se sobreexpresó pfk_{Ec} y pyk_{Bs} , respectivamente, sin afectarse en los otros casos; y D) la velocidad específica de adición de base utilizada para neutralizar la producción de ácidos fue similar para todos los casos. Estos resultados muestran que al incrementar la actividad de Pfk_{Ec} o Pyk_{Bs} en la cepa KO11 se reduce drásticamente el flujo glucolítico (flux de consumo de glucosa) y el flux de etanol. Pero la velocidad de consumo de base no se reduce, lo cual sugiere que hay un flux mayor de formación de ácidos orgánicos. Además, estos resultados indican una respuesta a los efectos de regulación alostérica, debido a una mayor velocidad de formación y acumulación de fosfoenolpiruvato y ATP (inhibidores de la fosfofructocinasa), y asociado a una posible actividad limitada de Pdc_{Zm} para canalizar el flux hacia la formación de etanol. Para la fase estacionaria se encontró, comparando con la cepa KO11/pTrc99A, que (Figs. 2 y 3): A) el flux de consumo de glucosa se redujo 43 y 11% al incrementar la actividad de Pfk_{Ec} y Pyk_{Bs} , respectivamente, y se incrementó 13% al aumentar 6 veces la actividad enzimática de Pdc_{Zm} , en los otros casos no se afectó; B) la velocidad específica de adición de base para neutralizar la producción de ácidos orgánicos se redujo 46% cuando se

sobreexpresó *pdz_{Zm}* y se incrementó 56% y 83.0% con *pgk_{Ec}* y *pyk_{Bs}*, respectivamente; C) congruentemente, el flux de etanol disminuyó 49 y 33% sobreexpresando *pfk_{Ec}* y *pyk_{Bs}*, respectivamente, y se incrementó 42% al sobreexpresar *pdz_{Zm}*, sin afectarse para los casos de *galP_{Ec}* y *pgk_{Ec}*; y D) de forma relevante, en comparación con la cepa control el porcentaje de rendimiento teórico de conversión de glucosa en etanol se incrementó de 67 a 85% al sobreexpresar *pdz_{Zm}* (Tabla 2). Estos resultados confirman que incrementos en la actividad de Pfk_{Ec} y Pyk_{Bs} en KO11 reducen drásticamente los flujos en el consumo de glucosa y en la formación de etanol, incrementando el flux de formación de ácidos orgánicos. Los datos de sobreexpresión de *pdz_{Zm}* también corroboran que en KO11 hay una actividad limitada de Pdc_{Zm} para canalizar el flux hacia la formación de etanol. Asimismo, se sabe que el piruvato inhibe alostéricamente al sistema de transporte de glucosa (sistema PTS, ver Fig. 3), por consiguiente al incrementarse el flujo de carbono hacia la formación de etanol, se reduce la concentración intracelular de piruvato y se estimula el consumo de glucosa. Además, como se observa en las Figs. 1 y 3, el NADH+H⁺ generado a partir de la glucosa o xilosa en la reacción catalizada por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PD), debe ser oxidado para que los esqueletos de carbono fluyan a través de la glucólisis. Esta regeneración de NAD⁺ se lleva a cabo por las deshidrogenasas formadoras de lactato, acetaldehído y etanol en cepas silvestres de *E. coli* (Fig. 1), y además por la alcohol deshidrogenasa de *Z. mobilis* en la cepa KO11 (Fig. 3). Dicho proceso permite balancear la relación NAD⁺/NADH+H⁺ en la cepa KO11 cuando se sobreexpresó *pdz_{Zm}* y favoreció un mayor flujo de formación de etanol, ya que por cada mol de NADH+H⁺ generado por la G3PD se regenera un mol de NAD⁺ en la vía heteróloga de conversión de acetaldehído en

etanol. Sin embargo, al incrementarse la actividad de Pfk_{Ec} o Pyk_{Bs} en la cepa KO11 no se reduce la formación de ácidos orgánicos, no se favorece la oxidación del NAD⁺ y por tanto no se estimula el flux de formación de etanol. En resumen, el aumento en la conversión de glucosa en etanol cuando se incrementa la actividad de Pdc_{Zm}, se da a expensas de una redistribución de los flujos en las reacciones finales del metabolismo central, disminuyendo la formación de ácidos orgánicos, incrementándose los flujos glucolítico y de formación de etanol.

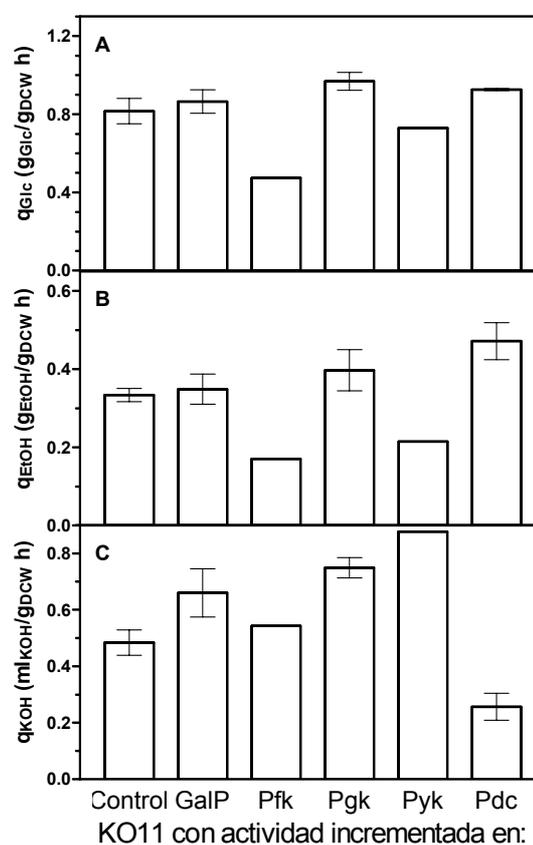


Fig. 2. Efecto sobre el flux de: A) consumo de glucosa; B) producción de etanol; y C) base adicionada para neutralizar la producción de ácidos orgánicos, con la cepa KO11 con actividad enzimática incrementada en GalP_{Ec}, Pfk_{Ec}, Pkg_{Ec}, Pyk_{Bs} o Pdc_{Zm}, durante la fase estacionaria de cultivos con glucosa.

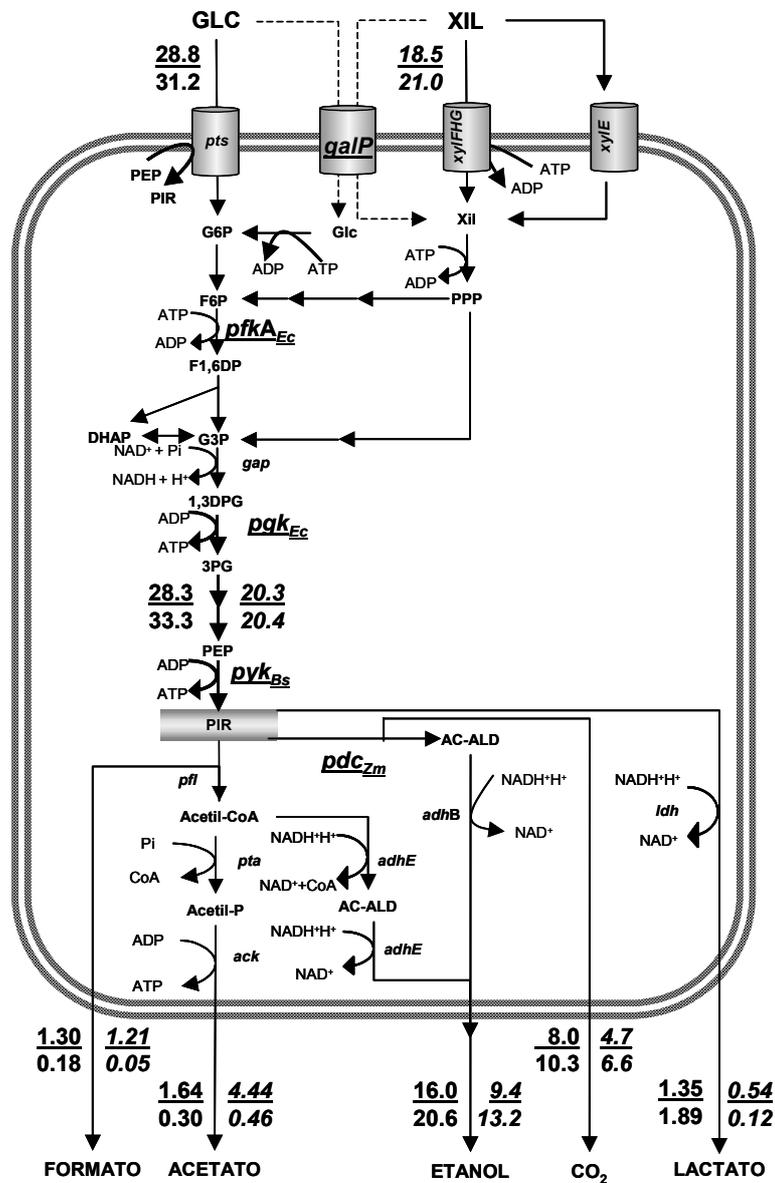


Fig. 3. Distribución de flujos de carbono (mmoles de carbono / g_{DCWH}), en fermentaciones con *Escherichia coli* etanológica KO11 durante la fase estacionaria de cultivos con glucosa o xilosa. Los valores a la izquierda muestran los flujos de carbono en cultivos con glucosa y los de la derecha (en *cursiva*) con xilosa. Los valores de la parte superior corresponden a la cepa KO11 y los de la parte inferior a KO11 sobreexpresando *pdc_{Zm}*.

Abreviaturas (ver Fig. 1) y: XIL, xilosa; PPP, vía de pentosas fosfato. Genes **u** operones que codifican para enzimas o complejos enzimáticos: *galP_{Ec}*, permeasa de galactosa de *E. coli*; *xyIFGH* y *xyIE*, transportadores de xilosa de alta y baja afinidad, respectivamente. Los genes correspondientes a las enzimas cuya sobreexpresión se evaluó en el presente trabajo se muestran en negritas, cursivas y subrayados: *pfkA_{Ec}*, fosfofructocinasa de *E. coli*; *pgk_{Ec}*, fosfogliceratoquinasa de *E. coli*; *pyk_{Bs}*, piruvatoquinasa de *B. stearothermophilus*; *pdc_{Zm}*, piruvato decarboxilasa de *Z. mobilis*; *adhB_{Zm}*, alcohol deshidrogenasa de *Z. mobilis*;

Tabla 2. Rendimientos de conversión de glucosa y xilosa en etanol sobreexpresando diferentes genes del metabolismo de carbono en *E. coli* etanologénica KO11.

Plásmido	^a Rendimiento	
	% respecto al teórico con	
	Glucosa	Xilosa
pTrc99A	67 (2.7)	60 (5.7)
pTrc99A/galP _{Ec}	66 (1.4)	55 (1.0)
pTrc99A/pfk _{Ec}	69 (0.0)	46 (5.1)
pTrc99A/pgk _{Ec}	68 (2.5)	58 (10.1)
pTrc99A/pyk _{Bs}	65 (0.0)	51 (0.7)
pTrc99A/pdc _{Zm}	85 (4.1)	76 (5.2)

^a Los valores en paréntesis indican el coeficiente de variación, en porcentaje, de dos replicas independientes.

3.3.2. En presencia de xilosa

Comparando con los resultados obtenidos con la cepa control (KO11/pTrc99A), para la fase exponencial se encontró que (datos no mostrados): A) el incremento de actividad de Pfk_{Ec} ocasionó un decremento del 23% en la velocidad específica de crecimiento; B) el flux de consumo de xilosa se incrementó 59% al aumentar 6 veces el nivel de actividad enzimática de Pdc_{Zm}, en los demás casos no se afectó; C) en consecuencia, el flux de etanol disminuyó 64 y 26% e incrementó un 31% cuando se sobreexpresaron pfk_{Ec}, pyk_{Bs} o pdc_{Zm}, respectivamente, sin afectarse en los otros casos; y D) la velocidad específica de consumo de álcali, utilizado para neutralizar la producción de ácidos, fue menor cuando se incrementó la actividad de Pfk_{Ec}, Pkg_{Ec}, Pyk_{Bs} o Pdc_{Zm} y similar para los otros casos. Estos resultados demuestran que al incrementar la actividad de Pfk_{Ec} o Pyk_{Bs} se reduce el flux de etanol y la velocidad de síntesis de ácidos orgánicos, sugiriendo una respuesta a efectos de regulación alostérica, debidos a una mayor velocidad de formación y acumulación de fosfoenolpiruvato y ATP. El flux de etanol se incrementó, tal como en el caso de la glucosa, como una respuesta al incremento de una actividad limitada de Pdc_{Zm} y a una mayor

velocidad de reciclamiento de NAD⁺. Para la fase estacionaria, en comparación con la cepa control (KO11/pTrc99A), se encontró que (Figs. 3 y 4): A) el flux de consumo de xilosa se incrementó 35% al sobreexpresar pdc_{Zm}, en los otros casos no se afectó; B) la velocidad específica de consumo de álcali, adicionado para neutralizar la producción de ácidos orgánicos, se redujo 76% cuando se sobreexpresó pdc_{Zm}; C) el flux de etanol disminuyó 38% sobreexpresando pfk_{Ec} y se incrementó 44% al sobreexpresar pdc_{Zm}; y D) de forma apreciable, en comparación con la cepa control, el porcentaje de conversión de xilosa consumida en etanol respecto al teórico se redujo de 60 a 46% con pfk_{Ec}, e incrementó hasta 76% cuando se sobreexpresó pdc_{Zm} (Tabla 2).

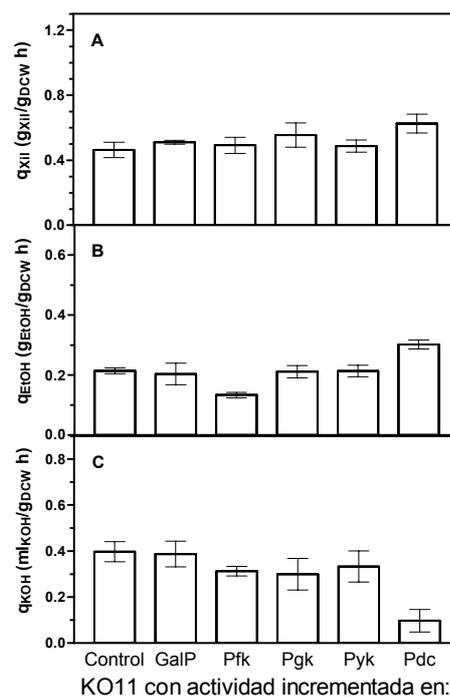


Fig. 4. Efecto sobre el flux de: A) consumo de xilosa; B) producción de etanol; y C) base adicionada para neutralizar la producción de ácidos orgánicos, con la cepa KO11 con actividad enzimática incrementada en GalP_{Ec}, Pfk_{Ec}, Pkg_{Ec}, Pyk_{Bs} o Pdc_{Zm}, durante la fase estacionaria de cultivos con xilosa.

Estos resultados ratifican el efecto observado con glucosa. Es decir que, los incrementos en la actividad de Pfk_{Ec} en KO11 reducen el flujo de formación de etanol. Así mismo, los datos de incremento en la actividad enzimática de Pdc_{Zm} corroboran que en la cepa KO11 hay una actividad limitada de Pdc_{Zm} para canalizar el flux hacia la formación de etanol, el incremento ocasiona una redistribución de flujos en las reacciones finales del metabolismo central, reduce la formación de ácidos orgánicos y la disponibilidad de piruvato, se incrementa el flujo glucolítico y, consecuentemente, se logra acrecentar el rendimiento de conversión de sustrato en etanol.

Conclusiones

En conjunto, los resultados obtenidos indican que en la cepa de *E. coli* etanológica KO11, cuando esta utilizando glucosa o xilosa, el flux en la glucólisis no se encuentra controlado individualmente por el transporte de la fuente de carbono, ni por Pfk. No obstante Pfk y Pyk controlan de manera negativa el flujo glucolítico. No se descarta la posibilidad de que el control positivo de la glucólisis se localice en alguna de las enzimas no analizadas en este trabajo o que dependa de la sobreexpresión de un conjunto de enzimas, por ejemplo: a través del incremento simultáneo de Pfk o Pyk con Pdc. Los resultados indican que el control del flux glucolítico en *E. coli* KO11 esta parcialmente fuera de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y se demostró que la actividad enzimática de Pdc limita el flux de piruvato hacia la formación de etanol. En consecuencia la sobreexpresión de *pdc_{Zm}* permitió incrementar los flujos de consumo del sustrato y el de producción de etanol durante la fase estacionaria, cuando se utiliza como fuente de carbono glucosa o xilosa, con una concomitante disminución del flux de carbono hacia la formación de ácidos orgánicos. Finalmente, incrementando la

actividad de Pdc se logró aumentar sustancialmente el rendimiento teórico de conversión de glucosa o xilosa en etanol (27% en promedio) en medio mineral. Estos resultados demuestran que los esfuerzos enfocados hacia el mejoramiento de cepas etanológicas de *E. coli* deben considerar como uno de sus principales objetivos la optimización de la expresión del gen *pdc_{Zm}*, así como la búsqueda o generación de versiones más activas de Pdc.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por CONACyT a través de los proyecto Z-003 y NC-230. Se agradece el apoyo técnico de Mercedes Enzaldo y Verónica Hernández.

Referencias

- Aristidou, A. y Penttilä, M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 187-198.
- Bailey, E. J. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252, 1668-1674
- Beall, D. S., Ohta, K. e Ingram, L. O. (1991). Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 296-303.
- Bergmeyer, J. y Gawehn, K. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. VCH. Weinheim, Alemania.
- Böck. A. y Sawers, G. 1996. Fermentation. En: *Escherichia coli and Salmonella, Celular and molecular biology*, Capítulo 18, (Neidhardt *et al.*, eds.), Pp. 262-282. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.
- Bothast R. J., Nichols, N. N. y Dien, B. S. (1999). Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnology Progress* 15, 867-875.
- Chassagnole, C., Noisommil-Rizzi, N., Schmid, J.W., Mauch, K. y Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*.

- Biotechnology and Bioengineering* 79, 53-73.
- Emmerling, M., Bailey, J. E. y Sauer, U. (1999). Glucose catabolism of *Escherichia coli* strains with increased activity and altered regulation of key glycolytic enzymes. *Metabolic Engineering* 1, 117-127.
- Gonzalez R., Tao, H., Shanmugam K. T., York, S. W. e Ingram, L. O. (2002). Global gene expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xylose. *Biotechnology Progress* 18, 6-20.
- Hernández-Montalvo, V., Martínez, A., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Valle, F. y Gosset, G. (2003). Expression of *galP* and *glk* in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 687-694.
- Hoppner, T.C. y Doelle, H.W. (1983). Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 17, 152-157.
- Huerta-Beristain, G. (2004). Manipulación del metabolismo central de *Escherichia coli* para incrementar la productividad de etanol. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM, México.
- Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C.C., Causey, T.B., Martínez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yomano, L.P., York, S.W., Zaldivar, J. y Zhou, S. (1999). Enteric bacterial catalyst for fuel ethanol production. *Biotechnology Progress* 15, 855-866.
- Maitra, P. K. y Lobo, Z. (1971). Control of glycolytic enzyme synthesis in yeast by products of the hexokinase reaction. *Journal of Biological Chemistry* 246, 489-99.
- Martínez, A., York, S.W., Yomano, L.P., Pineda, V.L., Davis, F.C., Shelton, J.C. e Ingram, L.O. (1999). Biosynthetic burden and plasmid burden limit expression of chromosomally integrated heterologous genes (*pdg*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 15, 891-897.
- Martínez, A., Rodríguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F. e Ingram, L.O. (2000). Effects of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysate. *Biotechnology Bioengineering* 69, 526-536.
- Martínez, A., Rodríguez, M.E., Wells, M.L., York, S.W., Preston, J.F. e Ingram, L.O. (2001). Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnology Progress* 17, 287-293.
- Martínez, A., Bolívar, F. y Gosset, G. (2002). Biotecnología energética sustentable: etanol carburante para el transporte. *Revista Universidad de México* 617, páginas centrales.
- Mielenz, J.R. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion Microbiology* 4, 324-329.
- Nielsen, J. (2001). Metabolic engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 263-283.
- Ohta, K., Beall, D.S., Shanmugam, K.T. e Ingram, L. O. (1991). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied Environmental Microbiology* 57, 893-900.
- Sakai, H., Susuki, K. e Imahori, K. (1986). Purification and properties of pyruvate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Biochemistry* 99, 1157-1167.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Snoep, J.L., Yomano, L.P., Westerhoff, H.V. e Ingram, L.O. (1995). Protein burden in *Zymomonas mobilis*: Negative flux and growth control due to overproduction of glycolytic enzymes. *Microbiology* 141, 2329-2337.
- Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 1, 1-11.

- Stryer L. (1999). *Biochemistry*. 4^a Ed. W.H. Freeman and Company, Nueva York.
- Tao H., González, R., Martínez, A., Rodríguez, M.E., Ingram, L.O., Preston, J.F. y Shanmugam, K.T. (2001). Engineering a homo-ethanol pathway in *Escherichia coli*: Increased glycolytic flux and levels of expression of glycolytic genes during xylose fermentation. *Journal of Bacteriology* 183, 2979-2988.