



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUIMICO-BIOLÓGICAS

**“Obtención y caracterización de mutantes  
del gen *hscA* de cepas de *Escherichia coli*  
etanológicas”**

**TESIS**

**Para obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Especialidad en:**

**Biología Experimental**

**Presenta:**

**QFB. Ma. Consuelo Reséndiz Tamayo**

**Asesor: D.C. Jesús Campos García**

Morelia Mich.

Noviembre, 2006

## RESUMEN

En la actualidad el uso de la biotecnología para la producción de bienes y servicios por medio del uso de organismos manipulados genéticamente, uno de los cuales es la producción de etanol. Sin embargo, el etanol es tóxico a ciertas concentraciones para el organismo que lo produce, afectando su producción. Ante lo cual los organismos han creado sistemas de protección al etanol, entre los que se encuentran las proteínas conocidas como chaperonas moleculares, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos tal es el caso de la chaperona molecular HscA de *E. coli*. En *P. aeruginosa*, para el que se ha sugerido que esta involucrado en el mecanismo de tolerancia a etanol. Por lo que nuestro objetivo fue evaluar el efecto del gen *hscA* en cepas etanológicas de *E. coli*. En este trabajo sugerimos que el papel de esta chaperona en *E. coli* participa no solo en el ensamble de grupos Fe-S sino que también brinda tolerancia a etanol, lo que se observó en curvas de crecimiento, en la producción de etanol, donde los resultados nos muestran que la cepa mutante transformada con el plásmido pJC10 produjo más etanol que la cepa parental; posteriormente se realizaron pruebas de actividad enzimática, que confirmo los resultados de la fermentación y para terminar se realizaron geles de proteínas de dos dimensiones, donde se observó el efecto de la mutación del gen *hscBA* y su complementación, observándose diferencia en el nivel de expresión de varias proteínas, esto determinado por la intensidad de las bandas obtenidas en los geles. Todo lo anterior nos llevó a concluir que la mutación del gen *hscA* disminuyó el nivel de tolerancia a etanol y la velocidad de crecimiento en la cepa etanológica LY01, la mutación del gen *hscA* disminuyó la actividad enzimática y la estabilidad de la ADHII en la cepa etanológica LY01 y que el producto del gen *hscA* tuvo efecto sobre el nivel de expresión de proteínas en las cepas recombinantes.

# INDICE

<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
1. Generalidades.....	1
1.1 Los alcoholes .....	1
1.2 El etanol.....	1
2. Procesos de producción de etanol.....	2
2.1 Producción de etanol.....	2
2.2 Sustratos utilizados en la producción de etanol.....	3
2.3 Organismos fermentadores.....	4
2.4 Fermentación por levaduras.....	6
2.5 Fermentación por bacterias.....	7
3. La biotecnología en la producción de etanol.....	11
3.1 Uso de microorganismos manipulados genéticamente.....	11
3.2 Aspectos considerados en el mejoramiento de organismos productores de etanol.....	12
3.3 Expresión de genes involucrados en la síntesis de etanol.....	13
3.4 Aumento del rango de sustratos metabolizables.....	15
3.4.1 Modificación de vías metabólicas.....	16
3.4.2 Expresión de genes involucrados en la síntesis de etanol.....	16
3.5. Incremento de la tolerancia a diversas condiciones del proceso de fermentación.....	18
4. Efectos tóxicos del etanol sobre los organismos.....	19
5. Tolerancia a etanol.....	19
6. Proteínas de respuesta a condiciones de estrés y la tolerancia a etanol.....	22
6.1 Chaperonas moleculares.....	24
6.2 Familia Hsp70.....	25
6.3 Homólogos de DnaK.....	26
7. Caracterización del sistema HscA/HscB en <i>P. aeruginosa</i> .....	27
8. Genes involucrados en el ensamblaje de grupos Fe-S.....	28
9. Antecedentes experimentales.....	32
<b>II. JUSTIFICACION</b> .....	34
<b>III. HIPOTESIS</b> .....	35

<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	35
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
A) Cepas y medios.....	36
B) Medios de cultivo.. ..	39
C) Métodos.....	40
1. Mutagénesis por recombinación homóloga .....	40
2. Aislamiento de plásmidos.....	42
2.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina.....	42
3. Electroforesis en geles de agarosa.....	43
4. Tratamientos enzimáticos de moléculas de ADN.....	44
5. Transformación.....	44
5.1 Transformación de <i>E. coli</i> .....	44
5.1.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	44
5.1.2 Transformación de las células competentes de <i>E. coli</i> .....	45
6. Pruebas de tolerancia a etanol.....	45
7. Crecimiento en presencia de etanol.....	45
8. Pruebas de fermentación.....	46
9. Cuantificación de glucosa.....	47
10. Cuantificación de etanol.....	48
11. Actividad enzimática de ADHII.....	50
11.1 Obtención de los extractos celulares.....	50
11.2 Determinación de la concentración de proteína.....	51
11.3 Determinación de la actividad específica.....	52
12. Análisis de proteínas por doble dimensión.....	53
12.1 Preparación de geles de IEF (isoelectroenfoque).....	53
12.2 Precorrida .....	54
12.3 Corrida de las muestras.....	54
12.4 Equilibrio de los geles de IEF.....	55
12.5 Segunda dimensión.....	55
12.6 Tinción del gel.....	56
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	58
1.1 Obtención de mutantes de la cepa de <i>E. coli</i> LY01 por recombinación homóloga.....	58

1.2 Caracterización de mutantes de la cepa de <i>E. coli</i> LY01 por recombinación homóloga .....	58
2. Transformación de las cepas en estudio con el operón <i>hscBA</i> .....	60
3. Pruebas de tolerancia a etanol.....	60
4. Curvas de crecimiento.....	63
4.1 Tiempo de duplicación.....	65
5. Pruebas de fermentación por lotes.....	67
5.1 Crecimiento (densidad óptica).....	67
5.2 Consumo de glucosa.....	68
5.3 Consumo de KOH.....	68
5.4 Producción de etanol.....	72
6. Determinación de la actividad enzimática de la alcohol deshidrogenasa II (ADHII).....	77
7. Pruebas de estabilidad de la ADHII.....	79
8. Diferencia en el nivel de expresión de proteínas por el método de electroforesis en dos dimensiones (IEF-PAGE/SDS).....	81
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>94</b>



## I. INTRODUCCION

### 1. GENERALIDADES

#### 1.1 Los alcoholes

La palabra alcohol es un término aplicado a los miembros de un grupo de compuestos químicos del carbono que contienen el grupo OH. Proviene de la palabra árabe al-kuhl, o kohl, con el que los alquimistas de la Europa medieval nombraban a las esencias obtenidas por destilación, estableciendo así su significado actual. Los alcoholes tienen uno, dos o tres grupos hidróxido (-OH) enlazados a sus moléculas, por lo que se clasifican en monohidroxílicos, dihidroxílicos y trihidroxílicos respectivamente (Encarta 2002). Los alcoholes también se pueden clasificar en primarios, secundarios y terciarios, dependiendo de que tengan uno, dos o tres átomos de carbono enlazados con el átomo de carbono al que se encuentra unido el grupo hidroxilo. Con los alcoholes se pueden sintetizar casi todos los tipos de compuestos alifáticos como: halogenuros de alquilo, alquenos, éteres, aldehidos, cetonas, ácidos, ésteres y muchos otros (Morrison y Boyd, 1996). Las propiedades físicas de un alcohol se comprenden mejor si reconocemos este hecho simple: estructuralmente, el alcohol es compuesto de un alcano y agua. Contiene un grupo lipófilo del tipo de un alcano, y un grupo hidroxilo que es un grupo hidrófilo similar al agua. De estas dos unidades estructurales, el grupo -OH da a los alcoholes sus propiedades físicas y químicas características, y el alquilo es el que las modifica, dependiendo de su tamaño y forma (Morrison y Boyd, 1996).

#### 1.2 El etanol

La fabricación de las bebidas alcohólicas es tan antigua quizás como la civilización. La producción de etanol como disolvente comenzó aparentemente

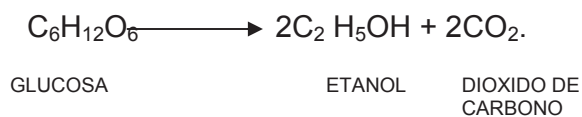
entre los siglos XII y XIV con el mejoramiento de la destilación permitiendo la condensación de los vapores con bajo punto de ebullición (Kosaric y col., 2001).

El alcohol etílico, o etanol, es clasificado como un alcohol primario monohídrico, cuyas propiedades físicas son: líquido incoloro de sabor quemante y olor agradable característico, es soluble en agua y en la mayoría de los líquidos orgánicos, tiene un punto de fusión de  $-115\text{ }^{\circ}\text{C}$ , un punto de ebullición de  $78.3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una densidad relativa de 0.789 a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Morrison y Boyd, 1996). Entre las propiedades químicas del etanol encontramos que: la oxidación del etanol produce etanal que a su vez se oxida a ácido etanóico. Al deshidratarse, el etanol forma dietiléter. El butadieno, utilizado en la fabricación de caucho sintético, y el cloroetano, un anestésico local, son otros de los numerosos productos químicos que se obtienen del etanol (Encarta, 2002).

## 2. PROCESO DE PRODUCCION DE ETANOL

### 2.1 Producción de etanol

Desde la antigüedad el etanol se ha obtenido por fermentación de azúcares. Todas las bebidas con etanol y casi la mitad del etanol industrial se fabrican mediante este proceso. El almidón de papa, del maíz y de otros cereales constituye una excelente materia prima. La reacción de la fermentación, está representada por la siguiente ecuación:



El líquido fermentado, que contiene de un 7 a un 12% de etanol, se concentra hasta llegar a un 95% mediante una serie de destilaciones. En la elaboración de ciertas bebidas, como el whisky y el brandy, algunas de sus impurezas son las encargadas de darle el característico sabor final.

La mayoría del etanol no destinado al consumo humano se prepara sintéticamente, tanto a partir del etanal (acetaldehído) procedente del etino

(acetileno), como del eteno del petróleo. También se elabora en pequeñas cantidades a partir de la pulpa de madera (Encarta, 2002).

## **2.2. Sustratos utilizados en la producción industrial de etanol**

El etanol puede ser producido de diferentes tipos de materias primas las cuales son agrupadas de acuerdo al tipo de carbohidratos que contienen:

a) Materias primas azucaradas: éstas generalmente contienen una mezcla de sacarosa ( $\alpha$ -glucosa-1,2- $\beta$ -fructosa), glucosa y fructosa; como ejemplo están el jugo de caña, las mieles y las melazas (Glazer y Hirochi, 1993).

b) Materias primas ricas en almidón: Estas consisten de una fracción soluble en agua llamada amilosa (20%) y una fracción de alto peso molecular llamada amilopectina (80%). Como ejemplo están los almidones procedentes de la yuca, la papa y los cereales. Este tipo de materias primas deben recibir un tratamiento previo para convertir los polímeros de almidón en glucosa (Glazer y Hirochi, 1993).

c) Materias primas celulósicas: la celulosa es obtenida de la lignocelulosa. La longitud de la macromolécula varía de acuerdo a su fuente y al grado de procesamiento que ha sufrido. La hidrólisis de este tipo de polímeros libera una mezcla que incluye: glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa. En este grupo está comprendido el bagazo de maderas, los restos de plantas, basura orgánica, etc. (Kosaric y col., 2001).

Las tecnologías fermentativas consolidadas para la producción de etanol como energético utilizan como fuente de carbono sacarosa, glucosa y almidón de maíz. No obstante, existen problemas de disponibilidad dado que estos mismos sustratos son utilizados en la alimentación humana. México no es un país autosuficiente en maíz y en consecuencia éste no es un sustrato viable. La sacarosa tampoco lo es, pues la producción actual no satisface los altos volúmenes requeridos de etanol como energético; lo que nos lleva a que la producción de etanol a nivel industrial para propósitos distintos al del consumo es elevado. El uso de los azúcares presentes en la lignocelulosa ayudarían a reducir los costos de producción del etanol, debido a que es una materia prima renovable y de bajo costo, por estar presentes en residuos agrícolas. Sin embargo, existen dificultades para utilizar estos sustratos en

procesos biotecnológicos. Una de las más importantes es la incapacidad fisiológica de los microorganismos empleados en la fermentación alcohólica tradicional para utilizar azúcares de 5 carbonos (xilosa o arabinosa), que están presentes abundantemente en este polímero (Martínez y col., 2000).

### 2.3 Organismos fermentadores

El microorganismo a utilizar es una parte esencial en el proceso de fermentación. La elección del microorganismo no sólo se limita a que pueda efectuar la reacción deseada, sino a que pueda efectuar el cambio bioquímico necesario en poco tiempo y que produzca el rendimiento máximo posible con un mínimo de atención (Rodríguez, 1992).

La conversión de glucosa a alcohol es realizada comúnmente por levaduras, pero en el caso de bacterias sólo algunas son capaces de realizar este proceso (Tabla 1). En procesos industriales se usan principalmente las levaduras del género *Saccharomyces*. Aunque las levaduras presentan muchas de las características de un productor de etanol ideal, éstas tienen limitantes importantes tales como un estrecho rango de sustratos y una tolerancia limitada al alcohol (Glazer y Hirochi, 1993).

Las especificaciones que tendrían los organismos fermentadores ideales podrían incluir las siguientes características importantes:

- ❖ La capacidad para fermentar un amplio rango de sustratos con rapidez.
- ❖ Tolerancia a etanol y la capacidad para producir altas concentraciones de etanol.
- ❖ Bajos niveles de subproductos, tales como ácidos y glicerol.
- ❖ Osmotolerancia (capacidad para resistir la alta presión osmótica provocada por las altas concentraciones de azúcares).
- ❖ Alta viabilidad celular.

**Tabla 1:** Levaduras y bacterias que producen cantidades significativas de etanol y los carbohidratos utilizados como sustratos (Glazer y Hiroshi, 1993).

<b>ORGANISMOS</b>	<b>SUSTRATOS</b>
<p style="text-align: center;"><b>LEVADURAS</b></p> <p><i>Saccharomyces spp.</i></p> <p><i>S. cerevisiae</i></p> <p><i>S. carlsbergensis</i></p> <p><i>S. rouxii</i> (osmofílico)</p> <p><i>Kluyveromyces spp.</i></p> <p><i>K. fragilis</i></p> <p><i>K. lactis</i></p> <p><i>Candida spp.</i></p> <p><i>C. pseudotropicalis</i></p> <p><i>C. tropicales</i></p>	<p>Glucosa, fructosa, galactosa, maltosa maltotriosa y xilulosa.</p> <p>Glucosa, fructosa, galactosa, maltosa maltotriosa y xilulosa.</p> <p>Glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa.</p> <p>Glucosa, galactosa y lactosa.</p> <p>Glucosa, galactosa y lactosa.</p> <p>Glucosa, galactosa y lactosa.</p> <p>Glucosa, xilosa y xilulosa.</p>
<p style="text-align: center;"><b>BACTERIAS</b></p> <p><i>Zymomonas mobilis</i></p> <p><i>Clostridium spp.</i></p> <p><i>C. thermocellum</i></p> <p><i>C. thermohydrosulfuricum</i></p> <p><i>Thermoanaerobium brockii</i></p> <p><i>Thermobacteroides acetoethylicus</i></p>	<p>Glucosa, fructosa y sacarosa.</p> <p>Glucosa, celobiosa y celulosa</p> <p>Glucosa, xilosa, sacarosa, celobiosa y almidon.</p> <p>Glucosa, sacarosa y celobiosa.</p> <p>Glucosa, sacarosa y celobiosa.</p>

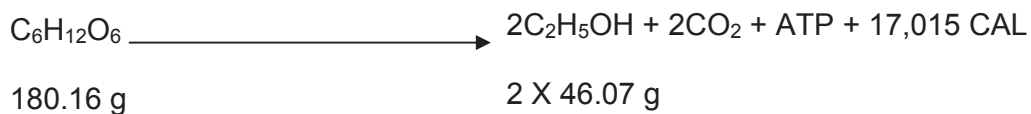
## 2.4 Fermentación por levaduras

Las cepas de *Saccharomyces* son responsables de casi toda la producción industrial de alcohol por fermentación. Estas convierten la glucosa por la ruta glicolítica en etanol y dióxido de carbono (Figura 1).

*Saccharomyces cerevisiae* fermenta cierto número de sustratos, entre los cuales se encuentran los disacáridos sacarosa y maltosa. La captación y el metabolismo de varios sustratos en una mezcla ocurre en un orden determinado por un mecanismo regulatorio al nivel de la expresión de genes.

Cuando el sustrato para las levaduras proviene de la hidrólisis del almidón nos encontramos con que la mayor parte de los oligosacáridos, formados de la hidrólisis, no son fermentados por las levaduras. Además las levaduras no pueden utilizar celulosa, hemicelulosa o gran parte de las pentosas. Su capacidad de fermentar sustratos disponibles y más baratos es el principal obstáculo para reducir los costos de producción de etanol (Glazer y Hirochi, 1993).

Las levaduras en condiciones anaeróbicas convierten azúcares en alcohol por la vía Embden-Meyerhof (figura 1). La reacción neta global involucra la producción de 2 moles de etanol,  $2\text{CO}_2$  y ATP por cada mol de glucosa fermentada; en peso, significa que cada gramo de glucosa produce teóricamente 0.51 gramos de etanol, de acuerdo con la siguiente ecuación global:



$$\text{RENDIMIENTO} = \frac{92.14}{180.16} = 0.51$$

El rendimiento obtenido en la práctica, generalmente se encuentra entre el 90 y 95% del teórico; esto se debe al requerimiento del 4 a 5% de sustrato para el mantenimiento y formación de nuevas células; generalmente involucra reacciones, de las cuales puede haber generación de glicerol y succinato (Glazer y Hiroshi, 1993).

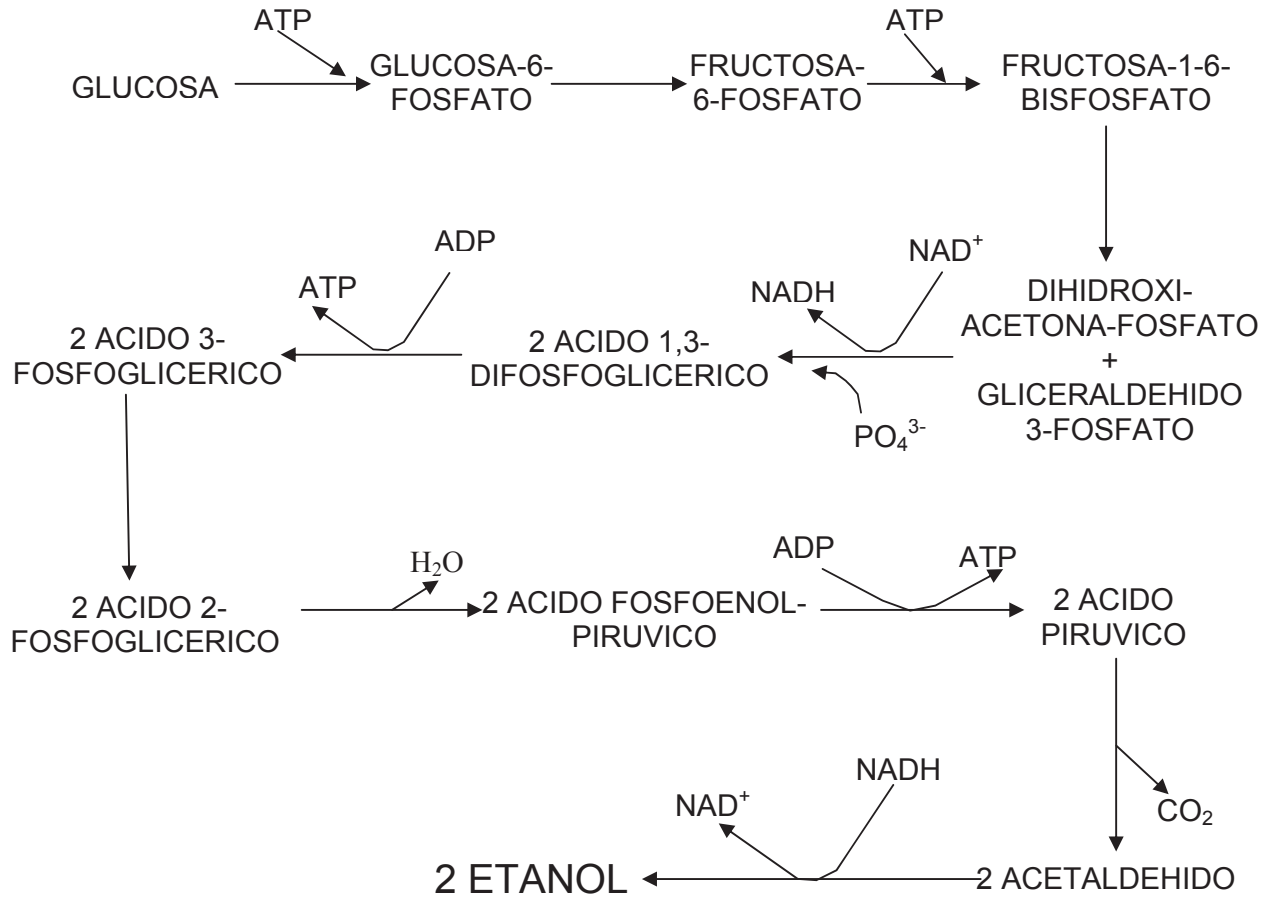
En la primera etapa de la biosíntesis del etanol, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y  $\text{CO}_2$  por medio de la enzima **piruvato descarboxilasa**. La descarboxilación del piruvato para formar acetaldehído y  $\text{CO}_2$  es esencialmente irreversible; además de que la piruvato descarboxilasa requiere de  $\text{Mg}^{+2}$  y posee una coenzima unida íntimamente: la **pirofosfato de tiamina**. Por otro lado, la descarboxilación del piruvato se produce a través de una serie de intermediarios unidos covalentemente al pirofosfato de tiamina; en la etapa final de la fermentación alcohólica, el acetaldehído se reduce a etanol y además el  $\text{NADH}_2$  aporta el potencial reductor en la acción catalizada por la enzima **alcohol deshidrogenasa**. Por lo tanto tenemos que el etanol y el  $\text{CO}_2$  son los productos finales de la fermentación alcohólica en donde se generan dos moléculas de etanol por molécula de glucosa fermentada (Rodríguez, 1992).

Para llevar a cabo la fermentación utilizando levaduras debe añadirse al medio una concentración de oxígeno debido a que es un componente necesario en la biosíntesis de lípidos y ácidos grasos poli-insaturados, además deben de agregarse una serie de nutrientes esenciales tales como nitrógeno y fósforo. El nitrógeno suele ser proporcionado en forma de sales de amonio, urea, aminoácidos, etc.; el fósforo es añadido en forma de fosfato de amonio o fosfatos alcalinos.

La adición de elementos traza como magnesio, fierro, cobalto, calcio, níquel, zinc y cobre es necesaria en la síntesis de enzimas y de factores de crecimiento. También se requiere la adición de inositol y de vitaminas como biotina, ácido pantoténico, tiamina, ácido nicotínico y ácido fólico (Kosaric y col., 2001).

## **2.5 Fermentación por bacterias.**

Existe un gran número de bacterias capaces de producir etanol. Sin embargo, muchas de ellas generan múltiples productos de fermentación además del etanol. Los productos de fermentación pueden dividirse en dos, los productos ácidos y los productos neutros; entre los productos ácidos tenemos el lactato, acetato, succinato y butirato; de los productos neutros tenemos al etanol, butanol, acetona y butanediol, entre los más abundantes (Ingram y col.,



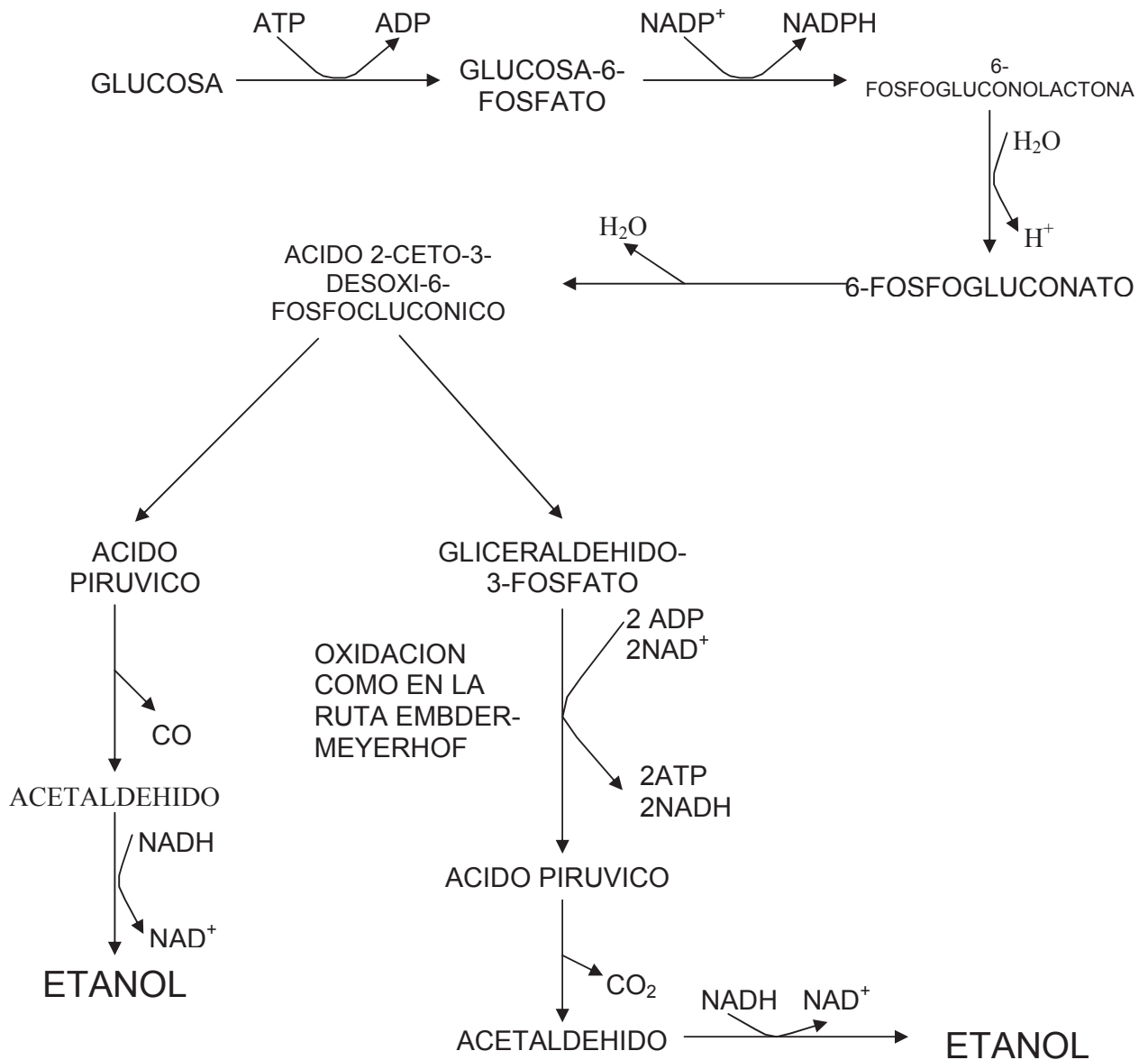
**FIGURA 1:** Formación de etanol y dióxido de carbono a partir de glucosa por la ruta glicolítica de EMBDEN-MEYERHOF (Glazer y Hiroshi, 1993).

1989).

Las enterobacterias, al igual que las levaduras, metabolizan glucosa por la ruta Embden-Meyerhof (Figura 1).

La ruta Entner-Doudoroff es una vía adicional de consumo de glucosa en otras bacterias, un ejemplo es *Zymomonas mobilis* (Figura 2). Por esta ruta la glucosa primero es fosforilada y después oxidada a 6-fosfogluconato. La enzima 6-fosfogluconato-deshidratasa convierte el 6-fosfogluconato en 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, el único intermediario de esta ruta. Este compuesto es sustrato de una aldolasa específica para dar como producto piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, este último es convertido a una segunda molécula de piruvato por una serie de reacciones comunes con la ruta glicolítica. La producción neta es de 2 moles de piruvato por mol de glucosa y la generación de un mol de ATP (Figura 2).

Un gran número de bacterias son capaces de producir altas concentraciones de etanol, como algunas cepas de *Clostridium*, pero solo *Z. mobilis* puede ser considerada como una estricta productora de etanol (Ingram y col. 1989; Kosaric y col., 2001). Esta bacteria ha recibido bastante atención en los últimos años debido a sus características de fermentación entre las que se encuentran su velocidad de fermentación mayor que el de las levaduras (2 a 3 veces), produce alrededor del 97% teórico de etanol, no requiere oxígeno para su crecimiento, crece en medio mínimo sin requerimientos de otros compuestos orgánicos, tiene alta osmotolerancia y alta tolerancia a etanol, de aproximadamente 13%. Sin embargo, y a pesar de sus características favorables no ha desplazado a las levaduras en la producción a gran escala, debido a que *Z. mobilis* puede utilizar solo tres carbohidratos: glucosa, fructosa y sacarosa (Ingram y col. 1991; Glazer y col. 1993); además, el uso de la sacarosa causa la formación de una gran cantidad de subproductos no deseados durante la fermentación (ácido láctico, ácido acético, etc.) (Kosaric y col., 2001)



**Figura 2:** Producción de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de glucosa mediante la ruta de ENTNER-DOUDOROFF (Glazer y Hiroshi, 1993).

### 3. LA BIOTECNOLOGIA EN LA PRODUCCION DE ETANOL.

La biotecnología se ha caracterizado recientemente debido al desarrollo de procesos novedosos, además de optimizar los ya existentes, con lo que se logra un aumento en la productividad, eficiencia y rentabilidad del proceso. Una de las técnicas utilizadas en la biotecnología es la del ADN recombinante, lo que permite que genes procedentes de otros organismos sean expresados o manipulados de tal manera que se construyen o modifican organismos huéspedes que adquieren, en consecuencia, nuevas ventajas, algunas de las cuales pueden ser el tener niveles de actividad enzimática elevados, lo que es clave en la conversión de sustratos a productos de interés, los cuales son obtenidos en mayor cantidad (Ingram y col., 1987; 1989).

Actualmente resulta provechoso para las industrias utilizar a organismos recombinantes para obtener compuestos químicos tales como el etanol, ácido láctico, 1,3-propanediol y ácido adípico (Ingram y col., 2003), con lo que se reducen los costos del proceso, además de que se pueden usar desechos orgánicos, con lo que también se reduce la contaminación ambiental.

#### 3.1 Uso de microorganismos manipulados genéticamente

El uso de microorganismos manipulados genéticamente (genetically engineered microorganisms, GEMs) para el proceso fermentativo es considerado una buena alternativa para la obtención de combustibles que suplan las demandas energéticas. Se pretende que con estos GEMs el proceso fermentativo, y por consiguiente la producción de etanol, sea más eficiente y que reduzca de forma significativa los costos de producción. Una de las herramientas para obtener organismos más eficientes en la producción de etanol es el uso de técnicas de ADN recombinante. Un ejemplo de esta técnica es la transferencia de los genes de la ruta de síntesis de etanol provenientes de *Z. mobilis*, una bacteria productora de etanol, a una bacteria entérica, *E. coli*, que tiene la capacidad de metabolizar todas las pentosas y hexosas, con lo cual se obtiene un organismo capaz de sintetizar etanol a partir de azúcares que no son usados por organismos que de manera natural producen etanol,

además de que presenta la ventaja de producir mayores cantidades de etanol (Ingram y col. ,1989; Ingram y col., 1998).

Desde que en 1973 se clonó el primer gen, y en 1977 se produjo la primera proteína proveniente de ADN recombinante *E. coli* ha sido uno de los organismos más intensamente estudiados, por lo que es una de las bacterias más utilizada como vehículo para la clonación, manipulación y la modificación de genes, lo que lo hace el más importante huésped en la obtención de productos de origen recombinante; aunque en años recientes el número de huéspedes para el uso de ADN recombinante se ha ampliado al uso de una gran variedad de bacterias, levaduras, hongos, plantas y otras células eucariontes (Ingram y col., 1989). Sin embargo, *E. coli* sigue siendo el huésped preferido debido a que posee ventajas entre las que podemos mencionar que es uno de los organismos de los cuales se tiene mayor información acerca de su genética, biología molecular, bioquímica, fisiología y biología general. Entre otras ventajas están: la rápida velocidad de crecimiento, la facilidad con la que pueden ser aisladas poblaciones genéticamente distintas (Glick y Pasternak, 1998), es una bacteria con capacidad nativa para metabolizar diferentes azúcares y es un microorganismo versátil que puede crecer en condiciones aerobias o anaerobias (Kosaric y col. 2001).

### **3.2 Aspectos considerados en el mejoramiento de organismos productores de etanol**

Entre los aspectos considerados en el mejoramiento de organismos productores de etanol que harían el proceso más rentable económicamente se encuentran:

- a) Expresión de genes involucrados en la biosíntesis de etanol procedente de organismos con altas cualidades fermentativas.
- b) Aumento del rango de sustratos metabolizables mediante la introducción de genes externos involucrados en su catabolismo.

- c) Aumento en la tolerancia a las distintas condiciones del proceso, como por ejemplo: tolerancia a altas concentraciones de etanol, tolerancia a variaciones en pH, salinidad, alta carga de sustratos, calor, etc.
- d) Estabilidad genética de las cepas etanológicas mejoradas (estabilidad de plásmidos y/o modificaciones genéticas).
- e) Escalamiento industrial.

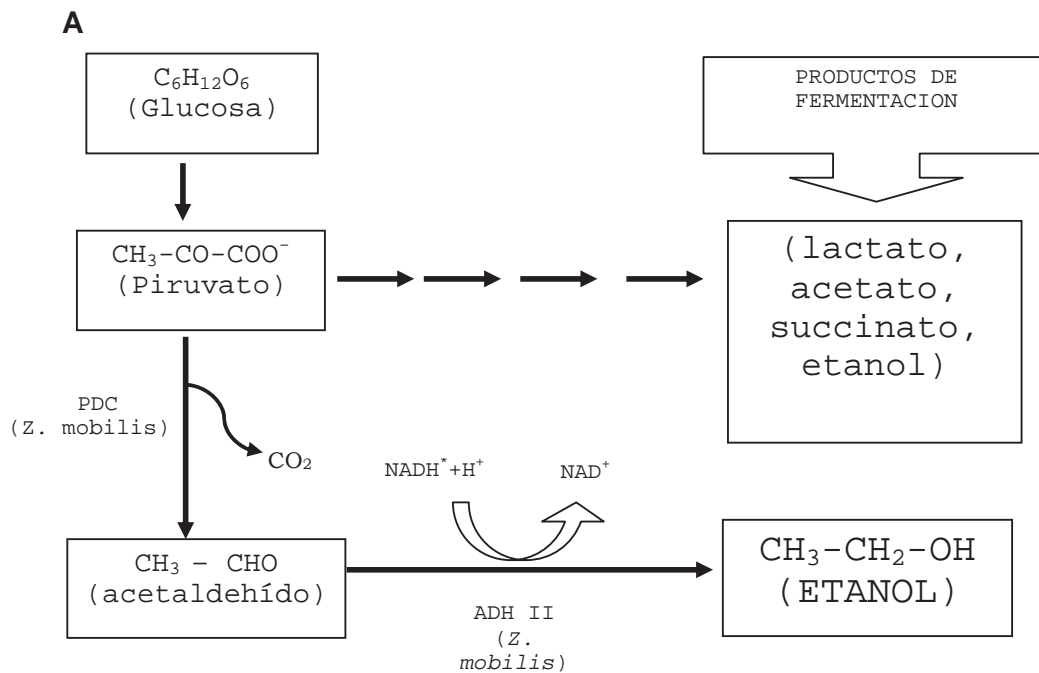
El objetivo es lograr un proceso de fermentación más barato que pueda competir con el costo de los combustibles derivados del petróleo.

### 3.3 Expresión de genes involucrados en la síntesis de etanol

Una de las ventajas que presenta *E. coli* es su capacidad para metabolizar hidrolizados de celulosa, entre los cuales se encuentra la xilosa. Aprovechando estas características, los genes *pdh* y *adh* de *Z. mobilis* fueron utilizados para transformar una cepa de *E. coli* obteniéndose una nueva bacteria etanológica capaz de usar otro tipo de sustratos.

En *Z. mobilis* (bacteria fermentadora del pulque) la ruta para la producción de etanol requiere de la piruvato descarboxilasa (PDC) y de dos isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (ADH); estas tres enzimas se expresan en altos niveles en *Z. mobilis*. La ADHII y la PDC de *Z. mobilis*, bajo el control de un promotor común, fueron expresadas en altos niveles en *E. coli* B resultando en un incremento en el crecimiento y producción de etanol como principal producto de fermentación a partir de la glucosa (Ingram y col., 1987; Ingram y col., 1989) (Figura 3).

La PDC de *Z. mobilis* se puede diferenciar de la que se encuentra en las levaduras, debido a que no requiere del cofactor pirofosfato de tiamina para su actividad catalítica (Glazer y Hirochi, 1993), además de que ésta tiene una mayor afinidad por el piruvato que otras enzimas, por lo que promueve la formación de etanol a partir de azúcares tales como la xilosa y la glucosa (Martínez y col., 2000). En cuanto a la ADHII se sabe que es una de las dos isoenzimas presentes en *Z. mobilis*, se ha reportado que es un tetrámero y que cada monómero pesa entre 31 y 38 kDa (Ingram y col., 1987). La ADHII pertenece a la familia de las ADHs activadas por hierro, es homóloga a la

**B**

MICROORGANISMO	ETANOL PRODUCIDO (%) (GLUCOSA 12%)	CRECIMIENTO EN ETANOL	
		5 %	7.5%
<i>E. coli</i> (silvestre)	< 0.1	+	-
<i>E. coli</i> (GEMs)	7.2	++	+
<i>S. cerevisiae</i>	5.2	++	-

**Figura 3:** Mejoramiento genético de *E. coli*. A) Desviación del flujo de carbono de piruvato por producción de PDC y ADHII de *Z. mobilis* para la generación de etanol como principal producto de fermentación. B) Producción y crecimiento en presencia de etanol de la cepa mejorada de *E. coli*. Datos tomados de Patente No. 5000000 U.S. (Ingram y col., 1989).

ADHIV presente en *S. cerevisiae* (Biosca y col., 2002). La actividad de la isoenzima ADHII es la más abundante en *Z. mobilis* y tiene un alto grado de especificidad por el acetaldehído como sustrato (Ingram y col., 1987). Una característica importante para esta enzima, y que le da ventaja sobre otras ADHs, es que su velocidad de reducción de acetaldehído es favorecida con altas concentraciones de etanol (Mackenzie y col., 1989).

Uno de los aspectos considerados para el mejoramiento de cepas etanológicas es la estabilidad genética de éstas, por lo que los genes de la piruvato descarboxilasa (*pdc*) y la alcohol deshidrogenasa (*adhB*), de *Z. mobilis*, fueron integrados en el cromosoma de *E. coli* B (Ohta y col., 1991) dando origen a la cepa denominada KO11, la cual produce etanol con eficiencia a partir de hexosas y pentosas presentes en los hidrolizados de la hemicelulosa (Ingram y col., 1999). También se ha comprobado que la velocidad de crecimiento y el flujo glicolítico de KO11 son superiores con respecto a la cepa silvestre (Tao y col., 2001). Esta cepa mejorada y la estrategia están patentadas y su uso con fines comerciales o de producción están protegidos (Ingram y col., 1989).

### **3.4 Aumento del rango de sustratos metabolizables**

Otro de los aspectos que se desean mejorar es el aumento en el rango de sustratos metabolizables, esto con la finalidad de que los organismos fermentadores tengan la capacidad de utilizar una mayor variedad de azúcares.

Gran parte de los organismos utilizan glucosa para llevar a cabo su actividad metabólica. No obstante, existen microorganismos capaces de usar pentosas y hexosas. Sin embargo, los organismos silvestres productores de etanol no son capaces de utilizar pentosas, específicamente *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* son los organismos con mayor capacidad de fermentar azúcares, como glucosa, fructosa y sacarosa, a etanol; pero no son capaces de metabolizar pentosas como la xilosa y la arabinosa, las cuales se encuentran presentes en altas proporciones en los hidrolizados de la hemicelulosa y la lignocelulosa (Martínez y col., 2000).

Una de las herramientas más utilizadas para el mejoramiento de organismos, es la biotecnología; ésta permite modificar, modular y diseñar vías

metabólicas en una amplia variedad de microorganismos. De esta forma existen dos alternativas a seguir: a) modificar las vías metabólicas de los organismos productores de etanol para desarrollar la capacidad de metabolizar y asimilar de igual forma las hexosas y las pentosas; o bien b) que aquellos microorganismos sean capaces de asimilar y metabolizar ambos azúcares para producir etanol.

### **3.4.1 Modificación de vías metabólicas**

La finalidad con la cual se aplica esta estrategia es incrementar la capacidad metabólica de los organismos para que sean capaces de utilizar de igual forma las hexosas y pentosas. Ejemplos del uso de esta estrategia es lo realizado en *Z. mobilis* y *S. cerevisiae*. Los resultados que se han obtenido, hasta la fecha, con *S. cerevisiae* no han sido muy alentadores, sin embargo, se ha logrado que pueda consumir y asimilar xilosa, aunque su eficiencia en la producción de etanol no ha sido incrementada, además de que se forman productos no deseados, como el xilitol; esto da como consecuencia que el rendimiento obtenido de la conversión de xilosa a etanol sea menor del 40% con respecto al teórico. En lo que respecta a *Z. mobilis* los resultados han sido más alentadores; después de un extenso trabajo en el área de la ingeniería de las vías metabólicas de este microorganismo, se concluyó que es necesario la expresión de genes provenientes de *E. coli* para facilitar el transporte de xilosa y construir de manera artificial la vía metabólica de las pentosas para convertir dicho azúcar a etanol de forma eficiente (Martínez y col., 2000).

### **3.4.2 Expresión de genes involucrados en la síntesis de etanol**

Esta es la estrategia que mejores resultados ha dado, esto debido al amplio rango de azúcares metabolizables por *E. coli* acoplada con la ruta de producción de etanol proveniente de *Z. mobilis* resultando en un organismo único, capaz de producir etanol a partir de los azúcares encontrados como constituyentes de la lignocelulosa (Alterthum e Ingram, 1989; Beall y col., 1991).

En este caso se ha logrado transformar un proceso poco rentable en uno altamente sustentable económicamente, esto sin que se considere el carácter renovable de la materia prima y la innovación de una tecnología más limpia comparada con los energéticos derivados del petróleo (Ingram y col., 1998).

El etanol es producido por un proceso de producción bien establecido a partir del jugo de caña de azúcar y almidón de maíz, sin embargo, el uso de lignocelulosa como sustrato es complejo difiriendo en muchos aspectos a la de los sustratos tradicionales (Zaldivar y col., 2001). La hemicelulosa está compuesta por una mezcla de azúcares, siendo la xilosa la más abundante en los residuos de plantas (Beall y col., 1991).

Sin embargo, aunque ya se pueden utilizar como sustratos los azúcares contenidos de la lignocelulosa, el siguiente reto es eliminar el paso previo de hidrólisis ya que la baja actividad de celulasas y por lo tanto el costo resultante de la hidrólisis resultan una barrera para el uso de la lignocelulosa como materia prima en la elaboración de etanol. La hidrólisis resulta de una acción combinada de al menos tres clases de actividades del tipo  $\beta$ -1,4-glucanasa: endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas que completan la hidrólisis de los productos solubles (de dos a seis residuos glucosídicos) a glucosa monomérica (Zhou y col., 2001).

Una de las estrategias para reducir los costos derivados del procesamiento es el desarrollo de microorganismos productores de etanol que posean las actividades celulolíticas. Esto se está realizando con varios organismos etanologénicos tales como *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* y *E. coli*. Esto se ha dado principalmente en bacterias entéricas como son el caso de *E. coli* y *Klebsiella oxytoca*, las cuales han sido transformadas con los genes *pdC* y *adhII* de *Z. mobilis*, donde los avances obtenidos han sido los mejores. En el caso de *K. oxytoca* M51A, tiene una actividad nativa de fosfotransferasa (PTS) y fosfo- $\beta$ -glucosidasa, de tal manera que se elimina la necesidad de adicionar la  $\beta$ -glucosidasa extracelular, por lo que sólo se introdujeron los genes *celZ* y *celY* provenientes de *Erwinia chrysanthemi*, las cuales codifican endoglucanasas (Zhou y col., 2001).

Para el caso de *E. coli*, específicamente en la cepa KO11, le fueron introducidos los genes *casAB* de *K. oxytoca*, que codifican las enzimas celobiasa y fosfo- $\beta$ -glucosidasa, las cuales se expresaron pobremente, sin

embargo, de esta cepa surgieron mutantes espontáneas que exhibieron una alta actividad específica para metabolizar celobiosa (Moniruzzaman y col., 1997).

A pesar de los avances logrados hasta el momento, en lo que se refiere a la conversión de materia prima renovable en etanol, aún no se ha podido desarrollar un biocatalizador recombinante que posea todas las actividades enzimáticas requeridas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa y la producción de etanol por sí mismo; lo que nos da la pauta para realizar el ensamblaje de estos procesos, siendo que estos permanecen en espera para que de esta manera el proceso de fermentación sea abaratado (Ingram y col., 1998).

### **3.5. Incremento de la tolerancia a diversas condiciones del proceso de fermentación**

Otro de los aspectos considerados para el mejoramiento de las cepas etanologénicas es el aumento en el nivel de tolerancia a diferentes condiciones del proceso de fermentación, tales como la tolerancia a concentraciones tóxicas de etanol, tolerancia a cargas elevadas de azúcares, tolerancia a sales, tolerancia a pH extremos, tolerancia térmica, por mencionar las más importantes; pero la falta de conocimiento acerca de los mecanismos de tolerancia es un obstáculo que evita que se mejore la producción de etanol.

Otro de los aspectos a mejorar es la tolerancia a etanol, ya que éste resulta tóxico para los organismos y sólo pequeñas concentraciones de éste pueden ser acumuladas en el proceso fermentativo. La limitante se encuentra en la toxicidad que representa para el microorganismo la acumulación de etanol en el medio de fermentación. Se ha inferido que el etanol producido por el organismo fermentador se encuentra en íntima dependencia con el nivel de tolerancia de la cepa al alcohol (Osman e Ingram, 1985). Por lo tanto, la tolerancia a etanol es uno de los principales aspectos a explorar en las cepas etanologénicas y la investigación de nuevos mecanismos para el mejoramiento de la tolerancia a etanol, lo que resulta de gran importancia para la optimización del proceso de fermentación (Martínez y col., 2000)

#### **4. Efectos tóxicos del etanol sobre los organismos**

Es conocido que el etanol ejerce efectos inhibitorios sobre los organismos, los cuales van desde la inhibición de la multiplicación celular hasta un efecto letal generalizado en las células. El alcohol provoca una disminución del crecimiento de tipo no competitivo de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten impidiendo al sustrato unirse al centro activo (Stryer, 1993); sin embargo, existen estudios que indican que los efectos tóxicos del etanol son más complejos. Se observó que la cepa de *E. coli* E102 presenta disminución del crecimiento, inhibición de la división celular y muerte de células en presencia de etanol; la adición de etanol en la fase exponencial de un cultivo de E102 causó una disminución inmediata del crecimiento, pero este efecto fue revertido al eliminar el etanol del medio de cultivo (Fried y col., 1973). En cuanto a microorganismos fermentadores, existen hipótesis que proponen que el mecanismo de inhibición de la fermentación es debida a inhibición por retroalimentación o por inactivación de enzimas involucradas en la producción de etanol (Yehia y col., 1985), sin embargo, esto no ha quedado completamente probado.

El etanol puede intercalarse en la fase acuosa de la membrana, alterando de esta manera la organización en la interfase acuosa-fosfolípidos de la membrana, además también puede intercalarse entre las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos o de los componentes de las proteínas o ambas (Fried y col., 1973), lo que causa que la barrera se debilite en lo que respecta al intercambio libre de moléculas polares. Como efecto final hay una pérdida de la integridad de la membrana plasmática afectando la capacidad de las células para mantener un gradiente de concentración y afectando además los sistemas involucrados en el transporte de solutos (Rodríguez, 1992).

#### **5. Tolerancia a etanol**

Todo organismo vivo tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones del ambiente, los microorganismos no son la excepción, pues han desarrollado diversas estrategias, tanto para metabolizar diferentes fuentes de

nutrientes como para resistir a los diversos factores que pueden causarles daños, para de esta manera asegurar su sobrevivencia.

La extrema toxicidad que ejercen los solventes orgánicos en los microorganismos impone un serio problema en la producción biotecnológica, tal es el caso del etanol, que tras su acumulación en el medio de fermentación, causa efectos adversos en el crecimiento del microorganismos y en su propia biosíntesis (Ingram, 1980).

Entre los mecanismos de tolerancia a solventes orgánicos en bacterias se encuentran:

- a. Cambios en la membrana citoplásmica.** La membrana citoplásmica posee una estructura lipídica, es responsable de muchas funciones atribuibles a los organelos de los eucariontes, entre estas tareas destacan el transporte y la producción de energía, además la membrana contiene proteínas de transporte que permiten la captación de metabolitos y la liberación de otras sustancias, así como bombas de iones (para mantener un potencial de membrana) y enzimas (Murray, 2002). Aunque la bicapa de lípidos de la membrana citoplásmica es una barrera eficiente para discriminar la entrada de moléculas hidrofílicas, permite que pequeñas moléculas anfifílicas tales como el etanol pasen libremente sin necesidad de una permeasa específica. Han sido observados varios mecanismos de respuesta a nivel de membrana para contrarrestar los efectos tóxicos debidos a la acumulación de solventes orgánicos. Estos cambios incluyen: la modificación del grado de saturación de lípidos de la membrana, cambios en la composición de lípidos, el recambio y la isomerización *cis-trans* de los lípidos insaturados. La isomerización de los lípidos de la membrana juega un papel muy importante en la tolerancia a solventes orgánicos, permitiendo a la célula sobrevivir al daño inicial; sin embargo, se ha observado que la isomerización *cis-trans* de ácidos grasos no es el único mecanismo de tolerancia a solventes (Yura y col., 2000). En 1976 Ingram mostró que *E. coli* alteraba su composición de ácidos grasos cuando se crecía en presencia de etanol, sugiriendo que este cambio puede ser una respuesta adaptativa a las interacciones fisicoquímicas de este alcohol con los lípidos de la membrana. Con la adición de etanol a los cultivos

bacterianos, éstos se inhiben y permanecen sin crecer hasta que las células modifican su composición de ácidos grasos. Esto fuertemente sugiere que las alteraciones en la composición de los ácidos grasos son esenciales para la función de muchas enzimas asociadas a la membrana. De esta forma es posible que las diferencias en el nivel de tolerancia a etanol entre diferentes microorganismos sean atribuidas a su respectiva composición de la membrana citoplásmica y a la capacidad de variar esta composición en respuesta a un incremento en la concentración de etanol (Ingram y col., 1976). Existen también microorganismos con alta tolerancia natural a etanol y que poseen características poco usuales en la composición de su membrana, tal es el caso de *Z. mobilis*, este microorganismo aunque posee una composición característica de fosfolípidos, la fosfatidiletanolamina es el fosfolípido más abundante (más del 70%); además, el promedio de longitud de la cadena hidrocarbonada es mayor por un carbono que la de otras bacterias gram-negativas. En este microorganismo se encontró al ácido vaccénico como el ácido graso más abundante; se ha observado que el etanol induce la síntesis de este ácido graso (Carey y col., 1983).

- b. Producción de compuestos osmoprotectores.** Las bacterias son capaces de sobrevivir, e incluso en algunos casos crecer, en el seno de ambientes hostiles en los que la presión osmótica extracelular es tan baja que provocaría la lisis de la mayoría de las células eucariotas, o en presencia de temperaturas extremas, tanto frío como calor. Las bacterias han experimentado una evolución en las estructuras y las funciones para adaptarse a estas condiciones adversas (Murray, 2002). Tal es el ejemplo de *Z. mobilis* que saca provecho de compuestos conocidos como hopanoides en la membrana celular, estos triterpenoides pentacíclicos, encontrados en varios procariones, son análogos de los esteroides, es sabido que los esteroides en la membrana celular de levaduras contribuye a la tolerancia a etanol. Los hopanoides, al igual que los esteroides, tienen efecto sobre la fluidez de la membrana, y por lo tanto sobre la tolerancia a etanol (Carey y col., 1983).

En el caso de la cepa de *E. coli* etanológica LY01 la tolerancia parece estar involucrada con el incremento en el metabolismo de glicina y el incremento en la producción de betaína. La adición de glicina incrementa la tolerancia a etanol en la cepa KO11, pero no tiene efecto en la ausencia de etanol; la adición de betaína incrementa dos veces más el nivel de tolerancia a etanol en ambas cepas KO11 y LY01, pero no tienen ningún efecto sobre el crecimiento en ausencia de etanol, por lo que la glicina y la betaína pueden servir como osmoprotectores (González y col., 2003).

- c. Expulsión activa de solventes orgánicos.** Varias cepas de *Pseudomonas putida* poseen resistencia a una amplia variedad de solventes orgánicos que son letales para muchas bacterias gram-negativas; la susceptibilidad de las bacterias a estos solventes es debida a la acumulación de éstos en la membrana plasmática causando efectos adversos sobre sus propiedades fisicoquímicas, además de los cambios en la composición de lípidos en la membrana. *P. putida* cuenta con un sistema de expulsión de solventes con lo que se disminuye la cantidad de solvente dentro de la célula por debajo de su nivel crítico lo que permite la sobrevivencia del microorganismo en presencia de altas concentraciones de solventes orgánico. Dentro de los solventes que son expulsados por esta bomba se encuentra el tolueno y algunos alcoholes, sin embargo, para el etanol no se ha reportado la existencia de alguna bomba de expulsión (Kieboom y col., 1998).
- d. Proteínas de respuesta a condiciones de estrés.** La exposición a etanol causa estrés a la célula, esto puede desencadenar la síntesis de proteínas de respuesta a estrés, las cuales participan en la sobrevivencia de varios microorganismos, tal es el caso de las bacterias. Este tema se describe a continuación dada su importancia.

## **6. Proteínas de respuesta a condiciones de estrés y la tolerancia a etanol**

Las concentraciones altas de etanol, al igual que las temperaturas elevadas, son una forma de estrés microbiano, circunstancia que induce la

síntesis de una gran variedad de proteínas (Farewell y col., 1998). Existen estudios que sugieren que el mecanismo de tolerancia a etanol involucra proteínas de respuesta a estrés en bacterias (Smeds y col., 1998).

En eucariontes se ha observado que algunas de las enzimas glicolíticas como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, enolasa y la fosfoglicerato cinasa son proteínas que responden a condiciones de estrés. Para *Z. mobilis*, la exposición a altas concentraciones de etanol representa una forma de estrés natural (Barbosa y col., 1994). En este microorganismo se encontró que algunas enzimas de la ruta glicolítica y algunas de la ruta fermentativa se incrementan en cantidad en respuesta a algún tipo de estrés, aunque su papel fisiológico con respecto al estrés es desconocido. Además, en *Z. mobilis* se encontraron tres proteínas que responden a estrés por calor y por etanol (SP70, SPS58 y SP18) y corresponden a las proteínas homólogas identificadas en *E. coli* como DnaK, GroEL y GroES (Haejung y col., 1991). Las proteínas de estrés GroES y GroEL son expresadas en *Z. mobilis* cuando es expuesta a concentraciones altas de etanol (alrededor del 10%), sin embargo, se ha observado que sus homólogos en otras bacterias no se acumulan en presencia de etanol (Barbosa y col., 1994).

La proteína HtrA de *E. coli* es una proteína inducible por estrés al calor y a las condiciones que causan desnaturalización de proteínas en general: HtrA la cual interviene en la renaturalización de proteínas (Smeds y col., 1998). HtrA se ha identificado además en otras bacterias y en algunos eucariontes, donde se describe que su papel principal es la degradación de proteínas anormales; también se le ha involucrado en funciones regulatorias (Smeds y col., 1998). En *Lactobacillus helveticus* se ha observado que HtrA es inducida por estrés por etanol, piromicina y cloruro de sodio pero el papel preciso de la proteína y la regulación de su expresión no se conoce con exactitud (Smeds y col., 1998).

Las propiedades físicas de la membrana parecen estar implicadas en la regulación de la expresión de proteínas que responden a estrés, como las proteínas de choque térmico o estrés al calor (Hsp) y muchas chaperonas moleculares como GroEL, las cuales se asocian con la membrana en muchos organismos. En *Leuconostoc oenos*, un análogo de la proteína Hsp18 que puede ser inducida por calor o por etanol, se asocia con la periferia de la membrana. Las Hsp asociadas a la membrana pueden actuar de manera

similar a su contraparte soluble y evitar la desnaturalización de enzimas localizadas en la membrana (Vigh y col., 1998).

Las proteínas de estrés al calor se agrupan en familias, en donde cada familia contiene un subgrupo de proteínas que son clasificadas de acuerdo a su masa molecular. Cada subgrupo puede estar compuesto de: Proteínas que son sintetizadas primariamente en respuesta a un aumento en la temperatura, proteínas que son sintetizadas constitutivamente y proteínas que son sintetizadas constitutivamente pero cuya velocidad de síntesis aumenta además por distintos factores como falta de nutrientes o compuestos tóxicos. Algunas proteínas de respuesta a calor son consideradas como “chaperonas moleculares” las cuales pueden intervenir en diversos procesos de modificación proteica postraducciona (LéJohn y col., 1994)

### **6.1 Chaperonas moleculares**

Uno de los mecanismos que poseen los organismos para tolerar el efecto del estrés ambiental se basa en la síntesis de proteínas protectoras conocidas como chaperonas moleculares. Chaperona molecular es el término que ha sido otorgado a varios miembros de familias de proteínas estructuralmente no relacionadas que comparten la capacidad de interactuar con otras proteínas con conformaciones no nativas a expensas de la hidrólisis de ATP (Frydman y Höhfeld, 1997). Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos, prácticamente han sido encontradas en la mayoría de los organismos estudiados. Su importancia radica en que intervienen en los procesos moleculares tales como el plegamiento de proteínas nacientes, degradación y renaturalización de proteínas desnaturalizadas, transporte de proteínas, termotolerancia, ensamblaje de proteínas estructurales, integración de proteínas membranales, protección de proteínas sobre la acción de compuestos tóxicos, etc. (Herman y D'Ari, 1998).

El ensamblaje y la degradación de proteínas parecen ser procesos opuestos, sin embargo, el hecho de que sean llevados a cabo por la misma proteína revela lo sofisticado del control celular. La decisión de qué proceso

llevar a cabo puede estar determinada por la afinidad de la proteína a la subunidad o al dominio de la chaperona (Suzuki y col., 1997).

Estas proteínas son sintetizadas en los organismos en condiciones fisiológicas normales, sin embargo, se ha observado que su expresión se ve incrementada considerablemente cuando un organismo se encuentra expuesto a algún tipo de estrés ambiental por ejemplo calor, frío, sales, solventes, antibióticos, metales pesados, etc. (Blaszczak y col., 1995; Kedzierska y Matuszewska, 2001).

En *E. coli* las familias Hsp70 y Hsp60 son las principales chaperonas citoplásmicas, pero existen otras chaperonas adicionales como es el caso de SecB, ClpB e IbpAB las cuales son requeridas para el plegamiento, exportación o prevención de la agregación de las proteínas que son aparentemente pobres sustratos para las proteínas Hsp70 y Hsp60 (Blaszczak y col., 1995; Kedzierska y Matuszewska, 2001).

La función de las chaperonas como auxiliares en el plegamiento de proteínas fue demostrada por Gragerov y col. (1992), quienes observaron que en mutantes deficientes para inducir las principales Hsp bloqueadas en el factor sigma ( $\sigma^{32}$ ), las proteínas se agregaban extensamente a temperatura elevada, sugiriendo que una o más chaperonas permiten a las proteínas alcanzar la conformación a la cual son activas. Se ha mostrado la participación de DnaK, DnaJ, GroEL y GroES en el mantenimiento de la solubilidad de algunas proteínas en *E. coli* y su implicación en la regulación de la respuesta a estrés al calor ya que su presencia inhibe la transcripción de genes con promotores dependientes de  $\sigma^{32}$  (Blaszczak y col., 1995; Kedzierska y Matuszewska, 2001).

## 6.2 Familia Hsp70

Las proteínas denominadas Hsp70 forman una familia multigénica de proteínas ubicuas altamente conservadas, las cuales se han encontrado en toda la biota (Gupta y col., 1993; Macario y col., 1999). Estas proteínas actúan como chaperonas moleculares dependientes de ATP. Originalmente descubiertas como proteínas inducidas por estrés al calor, es ahora conocido que muchos miembros de esta familia son expresados constitutivamente y

participan en funciones celulares normales como la estabilización o el plegamiento, el procesamiento y transporte de proteínas (Parsell y col. 1991). En organismos eucariontes se han encontrado múltiples miembros de la familia Hsp70, mientras que en bacterias solamente han sido reportados dos y de éstos DnaK ha sido la más ampliamente estudiada como chaperona molecular (Wild y col., 1992). La actividad de chaperona de la DnaK y otras chaperonas de la familia Hsp70 es regulada por proteínas accesorias (co-chaperonas) como DnaJ (Hsp40), las cuales estimulan la hidrólisis de ATP por la chaperona (Liberek y col., 1991). La DnaJ en *E. coli* posee al menos cuatro dominios: el dominio J N-terminal, un dominio adyacente que es rico en glicina y fenilalanina, un dominio de dedo de zinc rico en cisteína y un dominio menos conservado C-terminal que se sugiere está involucrado en la unión al sustrato. Hay considerable evidencia que sugiere que el dominio J dirige interacciones con la chaperona Hsp70 (Kelley, 1998).

### 6.3 Homólogos de DnaK

El segundo homólogo bacteriano de DnaK es codificado por el gen *hscA*, conocida como Hsc66, con una masa aproximada de 66 kDa la cual muestra aproximadamente 40% de identidad en su secuencia de aminoácidos respecto a DnaK y otras proteínas de la familia Hsp70. El gen *hscA* está localizado cerca del minuto 54 en el cromosoma de *E. coli*, inmediatamente río arriba del gen *fdx* el cual codifica una ferredoxina [2Fe-2S]. Estos genes forman parte de un operón que incluye al gen *hscB* que codifica una proteína de 20 kDa con una región amino terminal que tiene similitud con el dominio J de las co-chaperonas. La similitud de la proteína Hsc20 con proteínas relacionadas con la familia Hsp40 sugiere que Hsc66 pueda usar esta proteína como su co-chaperona. Estos resultados sugieren que Hsc66/Hsc20 (también llamadas HscA/HscB) comprenden un sistema de chaperonas moleculares similar a los sistemas procarióticos DnaK/DnaJ (Seaton y Vickery, 1994).

Con la llegada de los proyectos de secuenciación de genomas completos de diversos organismos se ha identificado la presencia del gen *hscA* como por ejemplo en: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Azotobacter vinelandii*, *Buchnera aphidicola*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*

*gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Ralstonia solanacearum*, *Pasteurella multocida*, *Rickettsia conorii*, *R. prowazekii*, entre otras muchas.

El primer organismo en que se demostró que las proteínas Hsc66/Hsc20 pueden funcionar como chaperona molecular y co-chaperona fue en *E. coli*, presentando actividad característica de ATPasa y solubilizando algunos agregados proteicos (Vickery y col., 1997; Silberg y col., 1998). El gen *hscB* se encuentra adyacente a *hscA* en los genomas de las bacterias mencionadas arriba; en *E. coli*, los genes *hscBAfdx* forman un operón, aunque hay evidencia de que *hscA* se transcribe independientemente (Kawula y Lelivelt, 1994). En el caso de las bacterias, una ferredoxina es codificada río abajo del gen *hscA* y ambos genes son transcritos como un operón (Seaton y Vickery, 1994); sin embargo, la funcionalidad de este arreglo es desconocida. En *A. vinelandi* y *E. coli* se sugiere que el papel de las proteínas Hsc66/Hsc20 es estabilizar proteínas que contienen grupos hierro-azufre, tal es el caso de una proteína involucrada en la protección contra el oxígeno de la enzima nitrogenasa (Zheng y col., 1998).

Hesterkamp y Bokau (1998) investigaron el papel de la proteína HscA en *E. coli* y mostraron que no es estrictamente necesaria para el correcto plegamiento de proteínas recién sintetizadas, sugiriendo una función más especializada que involucra la ferredoxina que es codificada por el gen *fdx* río abajo de *hscA*.

En *E. coli*, se ha encontrado que la transcripción del operón *hscBAfdx* es inducida por estrés al frío ("cold shock") y por la presencia del cloramfenicol, mientras que el calor no lo induce; pero la proteína es mantenida en alto nivel en todas las condiciones probadas, incluyendo diferentes temperaturas; sin embargo, en mutantes de *E. coli* en el gen *hscA* no fue observada alteración del fenotipo de crecimiento (Kawula y Lelivelt, 1994).

## **7. Caracterización del sistema HscA/HscB en *P. aeruginosa***

En *P. aeruginosa* ha sido identificado el gen *hscA* el cual forma parte de un operón constituido río arriba por el gen *hscB* y río abajo por el gen *fdx*. El arreglo genético de la región formada por el operón *hscBAfdx* de *P. aeruginosa*

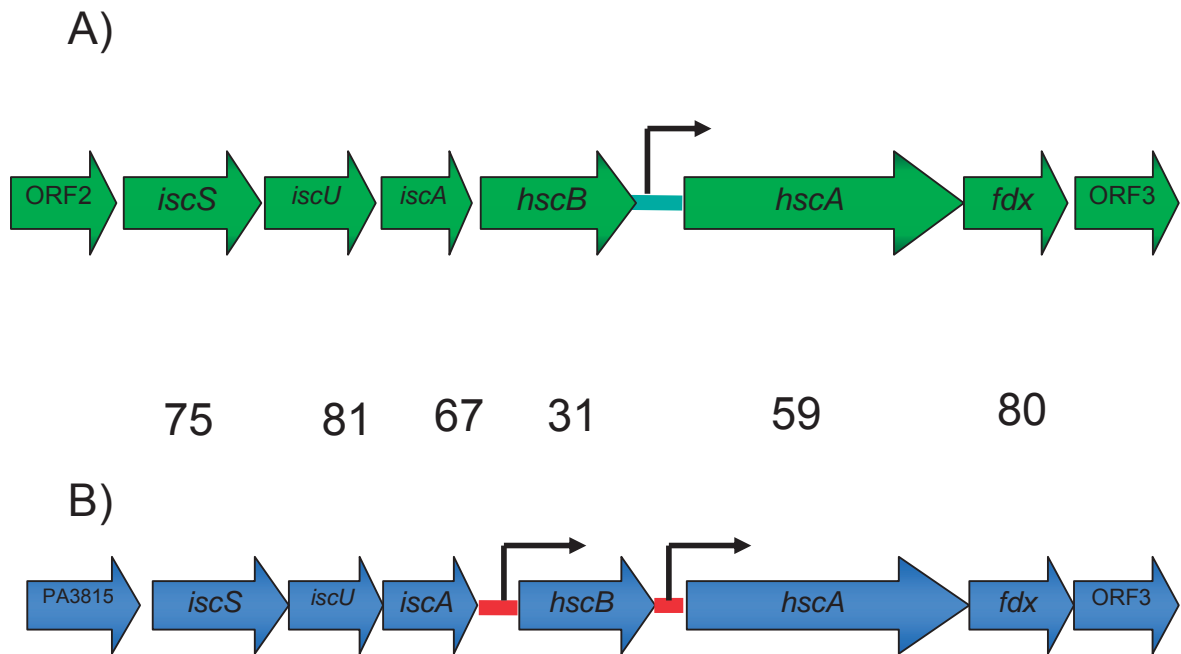
es similar al de *E. coli* mostrando que pertenece a la familia de chaperonas moleculares Hsp70 con un 64% de identidad con su homóloga en esta bacteria, aunque hay evidencia de que su regulación transcripcional difiere de la reportada en *E. coli* (Campos-García y col., 2000) (Figura 4). El papel propuesto para la proteína Hsc66 o HscA de *P. aeruginosa*, basado en su homología con otras proteínas de la familia Hsp70 y con la obtención de una mutante por la inserción de un transposón en el gen correspondiente, se sugiere estar involucrada en la asimilación y en la tolerancia a etanol. El mecanismo propuesto para HscA es que probablemente participa en la estabilización o el plegamiento de proteínas que son necesarias para la asimilación y tolerancia a etanol (Campos-García y col., 2000).

### **8. Genes involucrados en el ensamblaje de grupos Fe-S**

Recientemente fue demostrado que los genes *hscA*, *hscB* y *fdx* forman parte de un grupo de nueve genes [ORF1-ORF2-*iscS* (gen homólogo a *nifS*)-*iscU*(homólogo a *nifU*)-*iscA*-*hscB*-*hscA*-*fdx*([2Fe-2S]Fd)-ORF3], conservados en varios organismos. Estos genes forman un operón el cual fue designado *isc* (del inglés "iron-sulfur cluster") debido a que ha sido demostrada su participación en el ensamblaje de proteínas que contienen grupos Fe-S (Takahashi y Nakamura, 1999).

La participación de la proteína HscA en el ensamblaje de proteínas Fe-S es indispensable por lo que se ha propuesto que puede actuar como una chaperona molecular, enfocándose en la función de estabilizar proteínas en su estado desplegado o asistiendo el plegamiento de las proteínas blanco con el grupo Fe-S (Takahashi y Nakamura, 1999).

Estudios indican que al menos seis genes del operón *isc* (*iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* y *fdx*) son necesarios para la biogénesis de proteínas Fe-S en *E. coli* como: NADH deshidrogenasa I, aconitasa B, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fumarasa A, FNR (proteína de reducción de fumarato nitrato), glutamato sintasa (GltS) y succinato deshidrogenasa (SDH) siendo esencial la participación de la proteína IscS para la función de IscU, IscA, HscB, HscA y Fdx (Tukumato y Takahashi, 2001).

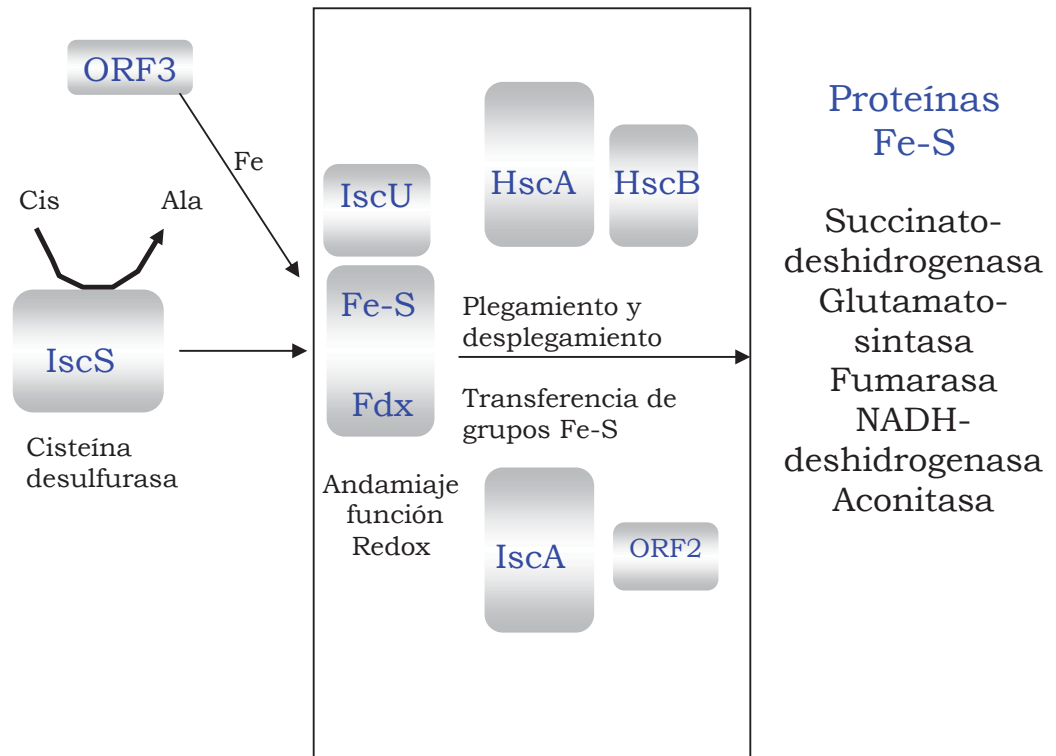


**Figura 4:** Arreglo genético del operón hscBAfdx. A) de *E. coli* (adaptada de Takahashi y col. 1999) y B) de *P. aeruginosa* (adaptada de Campos-García y col. 2000). Las flechas negras indican el sitio de inicio de la transcripción, además se muestra el porcentaje de identidad de los genes entre *E. coli* y *P. aeruginosa*.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Tukumoto y Takahashi (2001), se ha propuesto un modelo para el proceso de ensamblaje de los grupos Fe-S en proteínas que los contienen (Figura 5). La cisteína desulfurasa (IscS) lleva a cabo la remoción del azufre de la cisteína para formar alanina y el azufre queda unido a la enzima. Después de la reducción a S<sup>0</sup> que es utilizado para formar el grupo Fe-S, probablemente la ferredoxina (Fdx) que contiene el grupo [2Fe-2S] o [4Fe-4S] es producida. El grupo es entonces liberado y transferido a apoproteínas con la posible ayuda de la proteína IscA y, finalmente, la chaperona HscA con su co-chaperona HscB pudieran ser responsables del ensamblaje del grupo Fe-S a la proteína blanco (Figura 5).

Se ha encontrado en *E. coli* que la proteína IscU que forma parte del operón *isc* interactúa con las proteínas HscA y HscB. La proteína HscB favorece la unión de IscU a HscA. En ausencia de HscB, la proteína IscU estimula la actividad de ATPasa por arriba de 480 veces. Estos resultados establecen un papel directo y específico para el sistema de chaperonas Hsc66/Hsc20 en interacciones con el producto de los genes *isc* en el ensamblaje de proteínas Fe-S (Hoff. y col., 2000).

El ensamblaje de grupos Fe-S requiere de una maquinaria compleja, en varias proteobacterias este proceso involucra la maquinaria ISC, la cual también es conservada en las mitocondrias de eucariontes; en las bacterias fijadoras de nitrógeno existe el sistema denominado NIF (nitrogen fixation), y es requerido para la maduración de la nitrogenasa. Hay reportes de un tercer sistema para el ensamble de los grupos Fe-S, el cual ha sido nombrado SUF, y fue descubierto en *E. coli* en un operón aún no designado, ahora conocido como *sufABCDSE*. Este operón fue descubierto al analizar pseudorevertantes de mutantes de *E. coli* que habían perdido todos los componentes de la maquinaria ISC. Homólogos de esta maquinaria se encuentran presentes en un amplio número de bacterias, arqueas y plástidos, lo que sugiere que este tipo de sistemas es ubicuo en la naturaleza (Takahashi y Tokumoto, 2002).



**Figura 5:** Modelo para la biogénesis de proteínas que contienen grupos Fe-S en *E. coli*. Se representan las proteínas involucradas en el ensamblaje de grupos Fe-S y la función de las proteínas IscS, IscA, HscB, HscA y Fdx (EcFdx) en la formación de enzimas (Tomado de Takahashi y col. 1999).

## 9. Antecedentes experimentales

En el año 2000 Campos-García y col. obtuvieron un plásmido denominado pJC10, el cual contiene el operón *hscBAfdx* procedente de *E. coli*, insertado en el vector pUCP20. Ellos pudieron observar que al transformar la cepa de *P. aeruginosa* W51M22, la cual tiene mutado el gen *hscA* y que es incapaz de asimilar y tolerar etanol, recuperando su fenotipo silvestre, lo que sugiere que estos genes están involucrados en el mecanismo de tolerancia a etanol.

En el año 2002 Villagómez-Zavala clonó el operón *hscBAfdx* de *P. aeruginosa* a partir de su ADN cromosomal y posteriormente ligó este fragmento de ADN en el vector comercial PCR 2.1-TOPO, obteniendo el plásmido recombinante pKAV1; sin embargo, este plásmido sólo posee un origen de replicación para *E. coli*, por lo que se realizó la subclonación del operón en el vector binario pUCP20, que tiene también un origen de replicación para *P. aeruginosa*, obteniéndose el plásmido pKAV2. Este plásmido fue utilizado para corroborar la funcionalidad del operón en el organismo del cual proviene. Además, en ese mismo año, Villagómez-Zavala reportó un notable aumento en el nivel de tolerancia a etanol de la cepa etanológica de *E. coli* KO11, al ser transformada con el plásmido pKAV2, sugiriendo que el operón *hscBAfdx* se encuentra involucrado en el mecanismo de tolerancia a etanol, tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli*.

Reséndiz-Tamayo (2002), logró introducir una mutación en el gen *hscA* en cepas de *E. coli* KO11 y LY01, utilizando una mutante de *E. coli* hiper-recombinante JC7623 obtenida por Villagómez-Zavala (2002), la cual tiene interrumpido el gen *hscA* con un cassette de resistencia a kanamicina. Las mutantes obtenidas mostraron una disminución en el nivel de tolerancia a etanol y un crecimiento deficiente con respecto a las cepas parentales; esto reforzó la hipótesis de la participación del sistema HscA/HscB en el mecanismo de tolerancia a etanol en ambos microorganismos.

En el 2004 Núñez-Pastrana, probó el efecto de la mutación del gen *hscA*, observándose una disminución en la producción de etanol; sin embargo, no se observó un aumento en la producción de etanol en las cepas

transformadas con los plásmidos pKAV2 y pJC10 que tienen un nivel de tolerancia a etanol mayor a las cepas parentales.

## II. JUSTIFICACION

Los estudios hasta ahora realizados muestran efectos del producto del gen *hscA* sobre el nivel de tolerancia y producción de etanol. La finalidad de este trabajo es guiarnos a un mejor entendimiento acerca de los efectos del producto del gen *hscA* sobre enzimas importantes del metabolismo fermentativo y saber cual es el efecto sobre el mecanismo de la tolerancia a etanol.

### III. HIPOTESIS

El producto del gen *hscA* está involucrado en la tolerancia a etanol vía la estabilización de proteínas.

### IV. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo General

Evaluar el efecto del gen *hscA* en cepas etanológicas de *Escherichia coli*.

#### 2. Objetivos específicos

- a) Obtener mutantes en el gen *hscA* de la cepa de *E. coli* etanológica LY01
- b) Transformar las cepas en estudio con el operón *hscBA* procedentes de *E. coli* y *P. aeruginosa*.
- c) Evaluar el nivel de tolerancia a etanol de las cepas recombinantes.
- d) Determinar el efecto de la mutación sobre la ADHII de las cepas recombinantes.
- e) Evaluar la producción de etanol en fermentaciones por lotes.
- f) Determinar el perfil de expresión de proteínas en cepas recombinantes mediante electroforesis de 2-D.

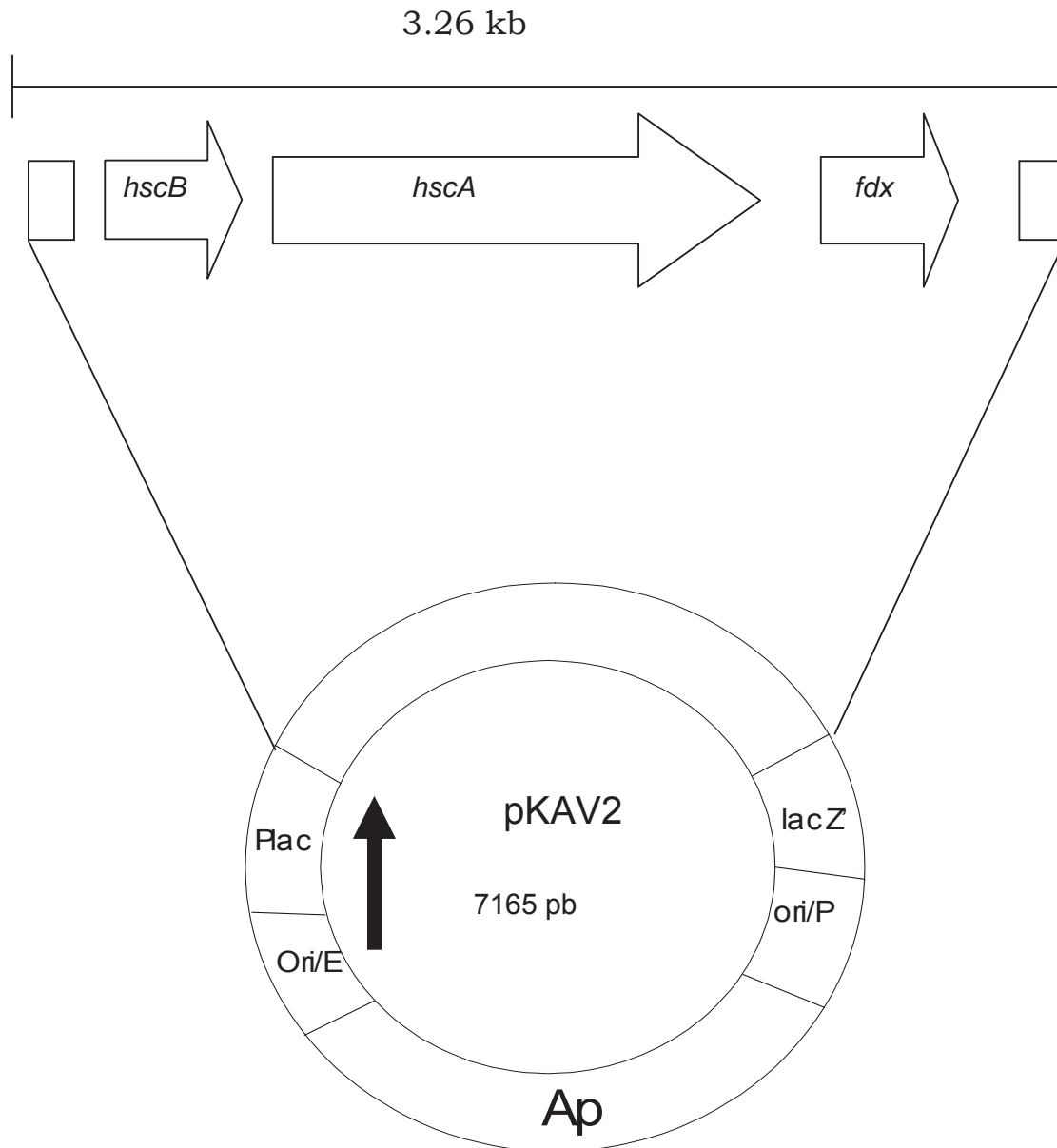
## V. MATERIALES Y METODOS

### A. Cepas y plásmidos

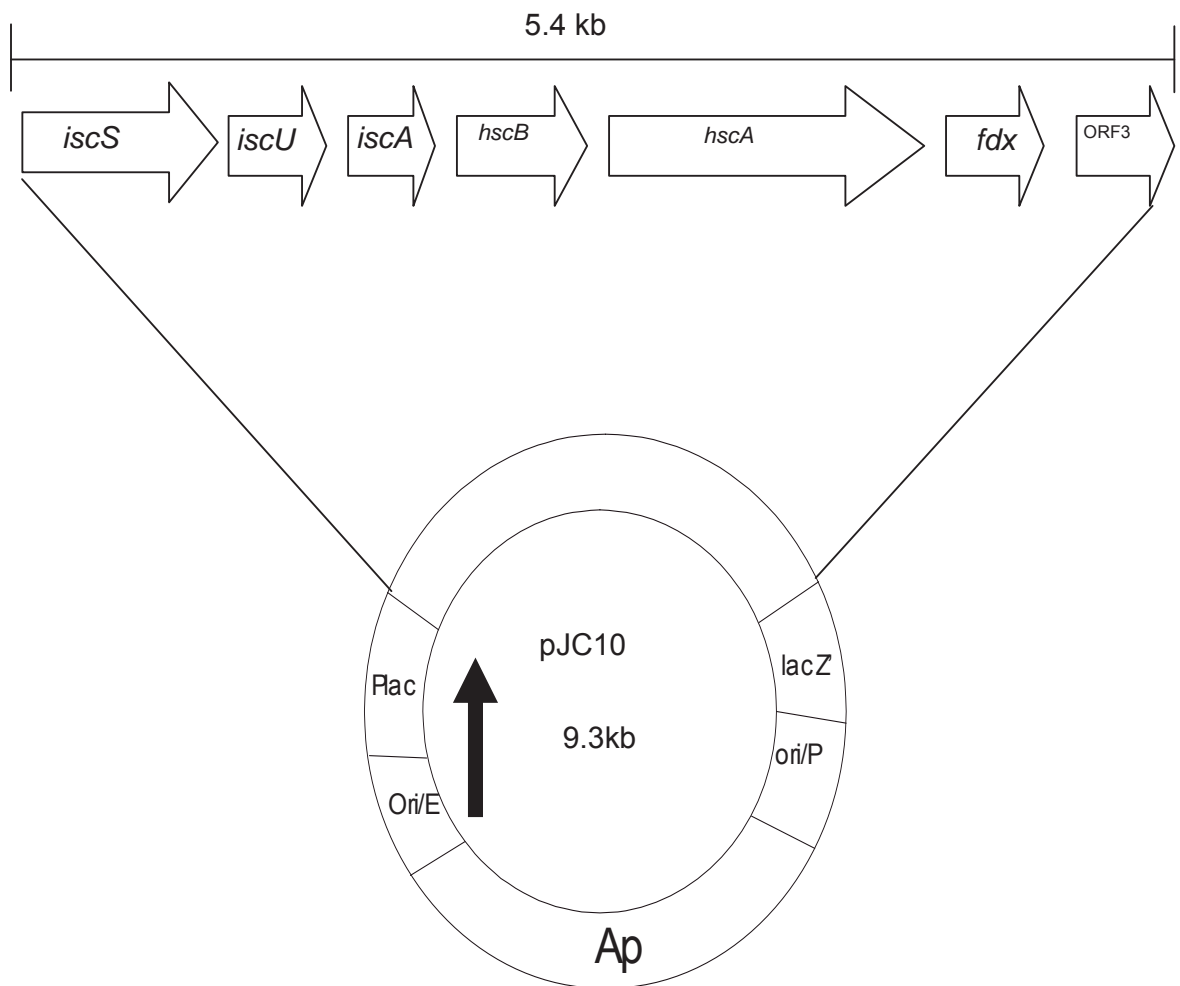
Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo están enlistados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

<b>CEPA O PLASMIDO</b>	<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>REFERENCIA</b>
JC7623 (4,5,7)	Cepas de <i>E. coli</i> hiper recombinantes <i>hscA::km</i>	Villagómez-Zavala, 2002
LY01	Cepa de <i>E. coli</i> productora de etanol	Ingram y col., 1998
LY01/pKAV2	Cepa LY01 con el plásmido pKAV2	Este trabajo
LY01/pJC10	Cepa LY01 con el plásmido pJC10	Este trabajo
LY01 m6a	Mutante LY01:: <i>hscA</i>	Este trabajo
LY01 m6a/pKAV2	Mutante de LY01 con el plásmido pKAV2	Este trabajo
LY01 m6a/pJC10	Mutante de LY01 con el plásmido pJC10	Este trabajo
<b>PLASMIDOS</b>		
pKAV2	Plásmido pUCP20 con un fragmento de 3.2 kb que corresponde al operón <i>hscBAfdx</i> de <i>P. aeruginosa</i> .	Villagómez-Zavala, 2002
pJC10	Plásmido pUCP20 con un fragmento de 5.4 kb que contiene el operón <i>hscBAfdx</i> de <i>E. coli</i> .	Campos-García y col., 2000
<b>VIRUS</b>		
P1vir	Fago utilizado para transducción en <i>E. coli</i>	Lennox, 1955



**FIGURA 6:** Esquema del plásmido recombinante pKAV2. Derivado en vector pUCP20. Contiene un fragmento de 3.26 kb que comprende el operón *hscBAfdx* de *P. aeruginosa* (Villagómez-Zavala, 2002).



**FIGURA 7:** Esquema del plásmido recombinante pJC10. El plásmido deriva de pUCP20 y contiene un fragmento de 5.4 kb que comprende al operón *hscBAfdx* y genes del operón *isc* de *E. coli*. (Campos- García y col. 2000).

## B. Medios de cultivo

Fueron utilizados dos medios de cultivo para crecer las cepas: medio Luria-Bertani (LB) y medio mínimo M9, cuya preparación se indica enseguida:

**1. Medio sólido Luria-Bertani (LB).** Composición por litro de agua destilada (para el caso del caldo Luria CL no se le agrega agar):

- ☞ 10 g de peptona caseína.
- ☞ 5 g de extracto de levadura.
- ☞ 5 g de NaCl.
- ☞ 15 g de agar bacteriológico.

El medio es esterilizado 15 minutos a 121°C, posteriormente se deja enfriar para adicionar los antibióticos requeridos para cada cepa (Tabla 3). Estas cepas requieren de glucosa adicional por lo que se adicionó 2% de glucosa al medio LB.

**TABLA 3:** Antibióticos y concentraciones utilizadas para el crecimiento de las diferentes cepas.

CEPA	ANTIBIOTICO (Conc. en mg/l)
LY01	Cm (600 y 40)
LY01/pKAV2	Cm (600 y 40) y Ap (100)
LY01/pJC10	Cm (600 y 40) y Ap (100)
LY01 m6a	Cm (600 y 40) y Km (40)
LY01 m6a/pKAV2	Cm (600 y 40), Km (40) y Ap (100)
LY01 m6a/pJC10	Cm (600 y 40), Km (40) y Ap (100)

Cm= Cloranfenicol (Se usan dos concentraciones de éste para mantenimiento del fenotipo de las cepas), Km= Kanamicina y Ap= Ampicilina. Para el crecimiento de LY01 se añade isopropanol (10 g/l).

## 2. Medio de almacenamiento:

Las cepas fueron almacenadas en viales con medio LB y glicerol al 40% a -80°C.

## 3. Medio mínimo M9: Composición por litro de agua destilada:

- ☞ 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- ☞ 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- ☞ 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- ☞ 0.5 g de  $\text{NaCl}$
- ☞ 2 ml de  $\text{MgSO}_4$  1M
- ☞ 0.1 ml de  $\text{CaCl}_2$  1M

## C. Métodos

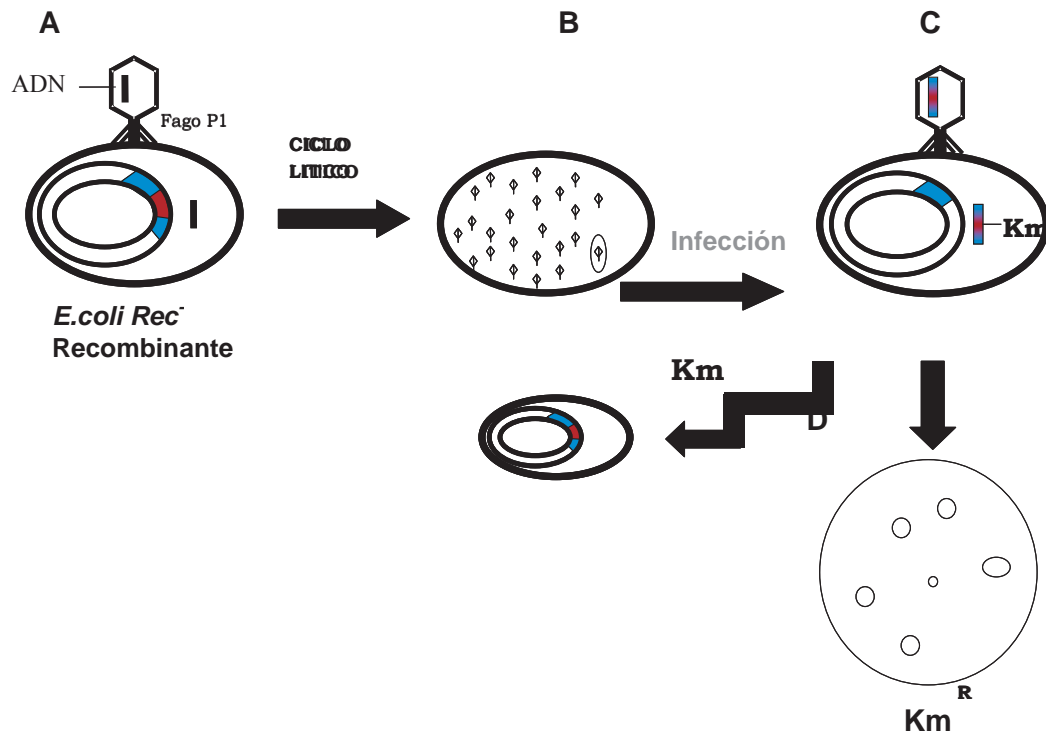
### 1. Mutagénesis por recombinación homologa (por el método de transducción)

#### 1.1 Preparación del lisado del fago P1

- a) Crecer durante toda la noche la cepa de *E. coli* en CL+5 mM de  $\text{CaCl}_2$ .
- b) Hacer una dilución del cultivo 1:100 en medio fresco CL-1 y después de una hora de crecimiento aeróbico a 37°C agregar 10  $\mu\text{l}$  de una suspensión del fago P1 e incubar hasta observar lisis (incluir un control sin fago).
- c) Centrifugar y guardar el sobrenadante. Agregar 1 o 2 gotas de cloroformo y vortexear por 20 segundos. Volver a centrifugar. Este es el lisado del fago P1.

#### 1.2 Transducción

- d) Se pone un cultivo de toda la noche de la cepa donadora (que contiene la mutación deseada) en CL+5 mM de  $\text{CaCl}_2$ .
- e) Se repiten los pasos b y c de 1.1 con la cepa donadora para obtener el lisado de fagos procedentes de la cepa mutante.



**Figura 8:** Esquema de la transducción del gen *hscA* interrumpido con el cassette de resistencia a kanamicina (*hscA::km*). A) Infección de la cepa donadora JC7623-4, 5, 7; B) ciclo lítico, obtención de fagos entre los cuales algunos contendrán fragmentos de ADN con la mutación; C) infección de las cepas de *E. coli* receptoras (LY01); D) selección de colonias resistentes a kanamicina en las cuales pudo ocurrir la recombinación homóloga del gen *hscA::km* con el gen cromosomal.

- f) Crecer durante toda la noche la cepa receptora en CL+5 mM de CaCl<sub>2</sub>.
- g) Resuspender en la mitad del volumen de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- h) Se mezclaron 100 µl de la suspensión bacteriana con 10, 50 y 100 µl de la suspensión de fagos P1 conteniendo el ADN con la mutación. Se deja a temperatura ambiente por espacio de 10 minutos.
- i) Centrifugar las células desechando el sobrenadante y resuspendiendo en CL+5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Este paso se repite 3 veces.
- j) Finalmente las células son resuspendidas en 80 µl de MgSO<sub>4</sub> (10 mM) y plateadas en medio selectivo, LB con 30 µg/ml de kanamicina. Se incluyen los controles de células sin fago.

## 2. Aislamiento de plásmidos

El aislamiento de ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina descrito a continuación.

### 2.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina

- a) 4.0 ml de cultivo crecido en CL toda la noche a 30°C con agitación constante fueron centrifugados a 12 000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C por 3 min, para sedimentar las células.
- b) Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución TE [Tris (tris [hidroximetil] aminometano)-HCl 10mM pH 8.0], EDTA [(ácido etilendiaminotetracético) 1 mM y NaCl 100 mM] y se centrifugó 30 segundos.
- c) El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en 100 µl de STE (Sacarosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM a pH 8.0), se agregaron 20 µl de lisozima 20 mg/ml y se incubó 5 min a 37°C.
- d) Se agregaron 200 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N/SDS (dodecil-sulfato de sodio) 1% mezclado suavemente y se incubó 10 min en hielo.

- e) Fueron adicionados 150  $\mu$ l de una solución 3M de acetato de potasio a pH 4.8, se incubó 10 min en hielo y posteriormente centrifugado a 12 000 rpm por 5 min.
- f) El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 500  $\mu$ l de fenol/cloroformo (25/25), fue mezclado en vortex moderadamente y centrifugado 5 min a 12 000 rpm.
- g) La fase superior se transfirió a otro tubo y se repitió el paso anterior.
- h) La fase superior se transfirió a otro tubo y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se incubó 30 min a  $-25^{\circ}\text{C}$ .
- i) Se centrifugó a velocidad máxima por 15 min desechando el sobrenadante y la pastilla fue lavada tres veces con etanol al 70%. La pastilla fue secada y resuspendida en 50  $\mu$ l de agua estéril.
- j) Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o sometidas a corrimiento electroforéticos en geles de agarosa.

### 3. Electroforesis en geles de agarosa

Una vez aislado el ADN plasmídico, se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1% disuelta en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04M y EDTA 0.001M). Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se sumergieron en amortiguador TAE. Las muestras de ADN se mezclaron con azul de bromofenol en solución de glicerol al 30%, colocándose en los orificios del gel. Se permitió que el corrimiento electroforético procediera aplicando de 60 a 120 voltios durante 1-2 h. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y las bandas se observaron por medio de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (fotodocumentador vilbert lountart).

Como marcador de tamaño molecular de ADN lineal se utilizó el ADN del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y/o *HindIII*.

#### 4. Tratamientos enzimáticos de moléculas de ADN

- **Restricción con endonucleasas**

Los ADNs purificados se digirieron utilizando una unidad de endonucleasas de restricción por  $\mu\text{g}$  de ADN, incubando a  $37^\circ\text{C}$  por un mínimo de 4 h. A continuación se realizó un corrimiento electroforético de la mezcla de restricción en un gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

#### 5. Transformación

##### 5.1 Transformación de *E. coli*

Para llevar a cabo la transformación de *E. coli* con los plásmidos recombinantes se utilizó la cepa etanológica de *E. coli* LY01 y su mutante.

##### 5.1.1 Preparación de células competentes de *E. coli*

- a) Para obtener células competentes, se creció la cepa durante toda la noche a  $30^\circ\text{C}$  con agitación constante en 4 ml de medio de cultivo CL.
- b) Fueron transferidos 2.5 ml del cultivo anterior a matraces de 1000 ml con 250 ml de CL (dilución 1:200). Se incubó a la misma temperatura con agitación constante por 3-4 h hasta alcanzar la absorbencia de 0.6-0.8 a 600 nm.
- c) El cultivo se colocó en hielo por 10 min y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  en una centrifuga (centrifuga Eppendorf 5415D).
- d) Las células obtenidas se lavaron dos veces, resuspendiéndose en 50 ml de solución de glicerol al 10% en agua destilada, estéril y fría, centrifugándose 15 min a 5000 rpm a  $4^\circ\text{C}$ .
- e) Finalmente se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de glicerol al 10%.

### 5.1.2 Transformación de las células competentes de *E. coli*

- a) A 100  $\mu$ l de células competentes se adicionó de 1 a 5  $\mu$ l de ADN plasmídico (aproximadamente de 10 a 20 ng) y se colocó la mezcla entre los electrodos de una celda en la cámara del electroporador (electroporador bio rad micropulser TM) y se le dió un pulso de 2.4 kV, 4K $\Omega$  durante 6 ms.
- b) Después de la electroporación, se les adicionó a las células 2 ml de CL y se incubaron por 1 a 2 h con agitación constante a 30°C.
- c) Posteriormente se distribuyeron 100  $\mu$ l de las células electroporadas en placas con agar con medio selectivo adicionado de 100  $\mu$ g/ml de ampicilina.
- d) Las colonias que crecieron en el medio de selección fueron inoculadas en 4 ml de CL para realizar aislamiento y purificación de ADN plasmídico.

### 6. Pruebas de tolerancia a etanol (dosis-respuesta)

Las pruebas de tolerancia a etanol se realizaron en medio mínimo M9 con glucosa al 0.2% como fuente de carbono. Las cepas fueron crecidas en 4 ml del medio M9 por toda la noche con agitación constante a 30°C, posteriormente este cultivo se utilizó para inocular una batería de tubos con concentraciones crecientes de etanol, al cual eran añadidos 100  $\mu$ l. La batería de tubos fue incubada por 18 h a 30°C con agitación constante. El crecimiento se determinó mediante la cuantificación de la absorbencia a 600 nm en el espectrofotómetro modelo JENWAY 6406 UV/VIS.

### 7. Crecimiento en presencia de etanol

Matraces de 125 ml con 25 ml de medio mínimo M9 más glucosa al 0.2% como fuente de carbono, suplementado con 0.025% de peptona y distintas concentraciones de etanol fueron utilizados. Este fue inoculado con 300  $\mu$ l de un cultivo crecido toda la noche, en un tubo con 4 ml de medio. Los cultivos fueron incubados a 30°C con agitación constante (200 rpm) y el

crecimiento se monitoreó cada dos horas, tomando 1 ml del cultivo y midiendo la absorbencia a 600 nm.

## 8. Pruebas de fermentación

Esta prueba fue realizada en un bio-reactor esterilizable marca applikon® de un litro de capacidad. El medio utilizado fue el medio M9 suplementado con tiamina (10 mg/l), peptona de caseína (0.5 g/l), trazas de metales (0.5 ml/l) y glucosa (120 g/l).

➤ Preparación del inóculo. El inóculo se creció en 100 ml de medio M9 + 2% de glucosa + 1 mg/l de tiamina + 0.5 g/l de peptona de caseína + 0.5 ml/l de trazas de metales, en un matraz de 250 ml. El cultivo se incubó a 30°C con agitación constante de 125 rpm durante 12 horas.

La cantidad total de medio utilizado para esta prueba fue de 750 ml de M9 con los 120 g/l de glucosa. Para determinar la cantidad de inóculo utilizada, considerando que se comenzaría la fermentación con una D.O. <sub>600 nm</sub> de 0.1, se determinó con la siguiente fórmula:

$$V_i \text{ (ml)} = V_m \text{ (ml)} \times D.O._{m \ 600 \text{ nm}} / D.O._{i \ 600 \text{ nm}}$$

Donde:

$V_i$  es el volumen de inóculo en mililitros.

$V_m$  es el volumen inicial de medio de cultivo en el bioreactor en ml.

$D.O._{m \ 600 \text{ nm}}$  es la densidad óptica con la que se desea empezar la fermentación.

$D.O._{i \ 600 \text{ nm}}$  es la densidad óptica que alcanzó el inóculo.

Entonces:

$$V_i \text{ (ml)} = 750 \text{ (ml)} \times 0.1 / D.O._{i \ 600 \text{ nm}}$$

Las condiciones de trabajo del fermentador fueron las siguientes:

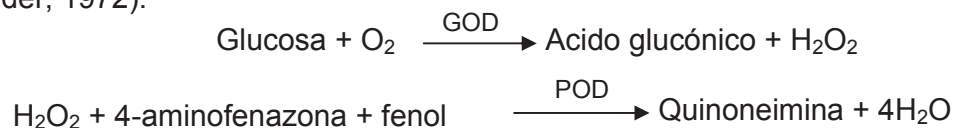
- ❖ Temperatura: 35°C.
- ❖ Agitación: 100 rpm.
- ❖ Volumen total: 750 ml.
- ❖ pH: 7.0. El pH se controló de manera automática con la adición de KOH (4N).

Una vez inoculado el medio del fermentador, se tomaron dos muestras (c/u de 1.5 ml) cada 2 h, durante las primeras 12 h; posteriormente las muestras se tomaron cada 12 h durante 120 h. Al mismo tiempo se realizó un registro del consumo de KOH (4N). Las muestras se utilizaron para medir biomasa por medio de la turbidez del cultivo, y cuantificar el consumo de glucosa y la producción de etanol. La turbidez se midió mediante la absorbencia de la muestra s 600 nm.

## 9. Cuantificación de glucosa

Se utilizó un “kit” comercial marca RANDOX® para cuantificar la glucosa.

**Principio:** La glucosa se determina después de una oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar el indicador de quinoneimina que va de rojo a violeta (Barham, D. y Trinder, 1972):



La muestra extraída del fermentador se centrifugó por 5 min a 12 000 rpm, para eliminar las células, colocando el sobrenadante en otro tubo eppendorf. Para cuantificar la glucosa fue necesario realizar diluciones 1:1000 con las muestras, debido a que el método utilizado es lineal hasta una concentración de glucosa de 4 g/l.

Procedimiento para el ensayo de glucosa:

- Longitud de onda: 500 nm.

- Celda: 1 ml.
- Temperatura: 37°C.
- Medición: Frente a reactivo blanco.

Pipetear en tubos Eppendorf:

- 10 µl patrón + 1000 µl de reactivo.
- 10 µl muestra + 1000 µl de reactivo.
- 10 µl agua + 1000 µl de reactivo.

Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C y medir la absorbencia del patrón y de las muestras frente al reactivo blanco antes de 60 minutos.

Cálculos:

$$\text{Concentración de glucosa (mg/dl)} = A_{\text{muestra}}/A_{\text{patrón}} \times 100$$

## 10. Cuantificación de Etanol

Para cuantificar el etanol producido en las pruebas de fermentación, se utilizó un cromatógrafo de gases, con las siguientes características:

- HP-FF. AP
- Temperatura del inyector: 200°C
- Temperatura del detector: 250°C
- Temperatura inicial: 50°C
- R<sub>i</sub>= 20°C
- Temperatura final: 200°C
- Duración:13 minutos
- Presión: 5 Psi
- Flujo: 10 ml/min
- Muestra: 0.5 µl
- ATT: 8
- Y<sub>min</sub>:100
- Y<sub>max</sub>: 1500
- S<sub>área</sub>: 100

- $S_{\text{base}}$ : 50
- $S_{\text{skim}}$ : 50

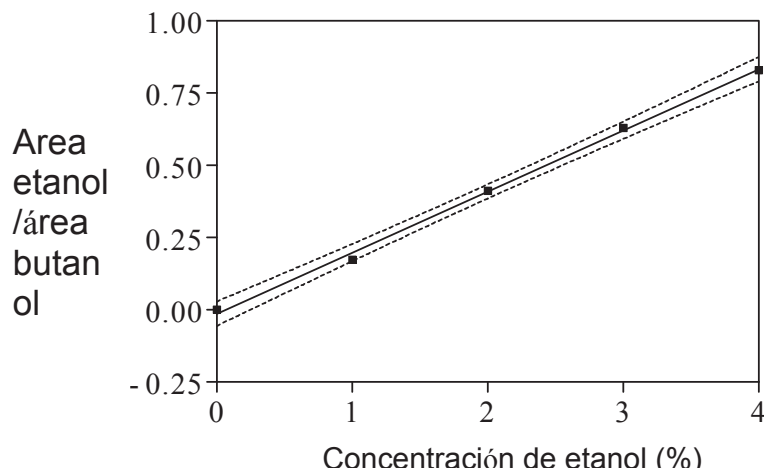
Se extrajeron muestras del fermentador, se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 12 000 rpm para eliminar las células, el sobrenadante se colocó en otro tubo y se congeló hasta ser utilizado. Posteriormente se descongelaron las muestras y se colocaron en viales en la siguiente proporción:

- 0.5 ml de la muestra
- 0.5 ml de n-butanol (10 g/l)

Para determinar la concentración de etanol se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Area del pico del etanol}}{\text{Area del pico del butanol}} \times \frac{1}{\text{Pendiente}} = \text{Cantidad de etanol (\% V/V)}$$

La pendiente fue calculada a partir de una curva de calibración, donde la cantidad de etanol era conocida. En la figura 9 se muestra la curva de calibración obtenida, y por lo tanto la pendiente para el cromatógrafo utilizado:



**Figura 9:** Curva de calibración para la determinación de etanol, en el cromatógrafo, para la obtención del valor de la pendiente.

De la curva de calibración fue determinado el valor de la pendiente que fue de 0.2116 y el inverso de la pendiente fue de 4.725. Con el valor anterior se pudo calcular la producción de etanol (V/V) en porcentaje, para calcular la producción de etanol (W/V) en gramos por litro se multiplicó el valor obtenido de la fórmula anterior por la densidad del etanol que es de 7.9 g/l.

## **11. Actividad enzimática de ADHII**

Los cultivos fueron crecidos en matraces de 250 ml con 100 ml de medio M9 suplementado con tiamina (10 mg/l), peptona caseína (0.5g/l), trazas de metales (0.5 ml/l) y 2% de glucosa, a 30°C a 200 rpm por toda la noche.

### **11.1 Obtención de los extractos celulares**

- a. Una vez que los cultivos se encontraban crecidos se colocaban en hielo por 10 minutos, se pasaron a tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 7 500 rpm por 5 min a 4°C, para la obtención de una pastilla de células y el sobrenadante fue desechado.
- b. La pastilla celular era resuspendida en un volumen de 50 ml de una solución fría de Tris 2mM pH=7.5, NaCl 20 mM. Se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a 4°C, desechándose el sobrenadante.
- c. El paso anterior se repitió.
- d. Se resuspendió en 20 ml de una solución fría de Tris 30 mM pH=7.5, se centrifugó a 7 500 rpm por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante fue desechado.
- e. La pastilla se resuspendió en 10 ml de la solución fría de Tris 30 mM pH=7.5 y pasar la suspensión a un tubo Falcon de 15 ml. Centrifugar a 7 500 rpm por 5 min a 4°C y desecha el sobrenadante.
- f. Nuevamente se resuspendió en 2 ml de la solución fría de Tris 30 mM pH=7.5; mantener la suspensión de células en hielo.

- g. Las suspensiones celulares fueron sonicadas por 30 segundos, evitando que se caliente la suspensión, para lo cual se colocan en el hielo después de sonicar por espacio de 1 a 2 minutos. Los pulsos de sonicación se repitieron de tres a cuatro veces.
- h. Se centrifugó la suspensión ya sonicada a 9 500 rpm por 15 minutos a 4°C.
- i. El sobrenadante se paso a tubos eppendorf de 1.5 ml y se determinó la concentración de proteína obtenida.

### 11.2 Determinación de la concentración de proteína (Método Bradford)

El método Bradford está diseñado para cuantificar de 1 a 10 µg de proteína. Por lo que para la determinación de cantidades mayores fue requerida la preparación de diluciones.

#### Materialles:

- ☞ Solución estándar de proteína albumina (0.5 mg/ml BSA)
- ☞ 0.15 M NaCl
- ☞ Solución de azul brillante de Coomassie. Para un litro:
  - Disolver 100 mg de azul brillante de Coomassie G250 en 50 ml de etanol al 95%
  - Adicionar 100 ml de ácido fosfórico al 85%
  - Completar el volumen con agua destilada
  - Filtrar a través de un papel filtro Whatman No. 1
  - Almacenar a 4°C
- ☞ Una celda para 1 ml

1. En ocho tubos de microcentrifuga se hicieron alícuotas por duplicado de BSA 0.5 mg/ml (5, 10, 15, 20 µl) y se diluyó cada uno a 100 µl con NaCl 0.15 M. En dos tubos más se agregaron 100 µl de NaCl 0.15 M; estos fueron los tubos blancos.

2. Se adicionó 1 ml de azul brillante de Coomassie y vortexear. Se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbencia a 595 nm. Realizar una curva estándar para graficar la absorbencia a 595 nm contra la concentración de proteína.
3. Se realizó una dilución 1:99 del extracto crudo de proteína, para tener el equivalente a 1  $\mu$ l del extracto, se tomaron 10  $\mu$ l de la dilución y se completaron a 100  $\mu$ l con NaCl 0.15 M. Se agregó 1 ml de azul brillante de Coomassie y se dejó reposar por espacio de 2 minutos.
4. Se determinó la absorbencia de la muestra y se usó la curva estándar para determinar la concentración de proteína en la muestra problema.

### 11.3 Determinación de la actividad específica

Una vez determinada la concentración de proteína la actividad enzimática se determinó antes de 12 horas después de obtenido el extracto crudo, además de mantener las muestras en hielo. La prueba se realizó de la siguiente manera:

1. Se colocó en una celda de cuarzo de 1 ml de capacidad c.b.p. 1 ml del buffer Tris 30 mM pH 7.5.
2. Adicionar de 0.5 a 1 mg de proteína al buffer y se mezcló suavemente con la micropipeta.
3. Se adicionaron 50  $\mu$ l de etanol 1 M. Se agitó suavemente para mezclar perfectamente.
4. El espectrofotómetro se calibró con la mezcla anterior antes de añadir  $\text{NAD}^+$ , en la modalidad de cinética enzimática a 340 nm (longitud de onda a la cual se detecta la aparición de NADH). Se colocó la celda en el porta celdas y se añadieron 10  $\mu$ l de  $\text{NAD}^+$  1M (recién preparado), quedando a una concentración de 10 mM. Se inició la cinética, por espacio de 5 min. Se imprimió la curva y se determinó la actividad específica con la siguiente fórmula:

$$\frac{A_f - A_o}{t_f - t_o} \Bigg/ \frac{\text{Tiempo total de la cinética}}{\varepsilon_{\text{NAD}}} \Bigg/ \text{Conc. de proteína del extracto}$$

Donde:

$\epsilon_{\text{NAD}} = 6.22 \mu\text{g}/\text{min}$

A f= Absorbencia final

A o= Absorbencia inicial

t f= Tiempo final

t o= Tiempo inicial

## 12. Análisis de proteínas por doble dimensión

### 12.1 Preparación de geles de IEF (isoelectroenfoque): (para 5-7 tubos)

2.75 g urea

0.67 ml solución acrilamida/bisacrilamida 28.38/1.62% (4.257 g acrilamida y 0.243 g bisacrilamida, aforar a 15 ml con agua desionizada.)

0.25 ml solución detergente (0.3 g CHAPS y 100  $\mu\text{l}$  NP-40, aforar a 1 ml con agua desionizada.)

1.74 ml agua desionizada.

Calentar ligeramente para disolver y filtrar por vacío.

50  $\mu\text{l}$  anfolitas pH 3-10

200  $\mu\text{l}$  anfolitas pH 5-8

9  $\mu\text{l}$  solución de persulfato de amonio al 10%

7  $\mu\text{l}$  TEMED

Llenar inmediatamente los tubos de vidrio con la solución de IEF.

Agregar 15  $\mu\text{l}$  buffer de "overlay" en la parte superior y dejar polimerizar a TA/1-2 hr.

#### Buffer de "overlay": (1 ml)

0.4805 g urea

8  $\mu\text{l}$  anfolitas pH 5-8

2  $\mu\text{l}$  anfolitas pH 3-10

- Aforar a 1 ml con agua desionizada.

- Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$

## 12.2 Precorrida

- Se colocaron los tubos en la cámara de electroforesis Protean II xi (Bio-Rad) adaptada para IEF.
- En el contenedor inferior de la cámara se agregaron 2 litros de solución  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.01 M (1.38 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en 2 litros de agua destilada) previamente desgasificada por vacío con agitación durante 10 min.
- Se quitó el buffer de "overlay" de los tubos y se cubrieron con 15  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis.

### Buffer de lisis: (1 ml):

- 0.5886 g urea
- 16  $\mu\text{l}$  anfolitas pH 5-8
- 4  $\mu\text{l}$  anfolitas pH 3-10
- 0.02 g NP-40
- 0.0154 g DTT
- Aforar a 1 ml con agua desionizada.
- Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$

- Se llenaron los tubos con solución NaOH 0.02 M (0.8 g NaOH en 1 litro de agua destilada) previamente desgasificada por vacío con agitación durante 10 min.
- Se llenó el contenedor superior de la cámara con 500 ml de la solución NaOH 0.02 M desgasificada.
- Se precorrieron los tubos de IEF a 200 V/15 min, 300 V/30 min y 400 V/30 min a temperatura ambiente.

## 12.3 Corrida de las muestras

- Se retiró la solución de NaOH del contenedor superior de la cámara.

- Se quitó el NaOH de los tubos de IEF.
- Se colocaron en el tubo de IEF la muestra disuelta en 25  $\mu$ l de buffer de "lisis".
- Se cubrió la muestra con 10  $\mu$ l de buffer de "overlay".
- Se llenaron los tubos nuevamente con solución NaOH 0.02 N desgasificada.
- Se llenó el contenedor superior de la cámara con 500 ml solución NaOH 0.02 N desgasificada.
- Se corrieron los tubos 18 h a 400 V y 1 hr a 600 V a temperatura ambiente.

#### 12.4 Equilibrio de los geles de IEF

- Una vez que terminó de correr el gel IEF se sacó el gel del tubo de vidrio y se colocó el gel 30 minutos en buffer de equilibrio.

##### **Buffer de equilibrio:** (60 ml)

3.6 ml solución Tris-HCl 1M (pH 6.8)

1.2 g SDS

0.93 g DTT

6 g glicerol

- Guardar a temperatura ambiente.

#### 12.5 Segunda dimensión

Se colocó el gel de IEF equilibrado sobre el gel de SDS-PAGE de 3 mm de grosor.

##### **Gel separador (al 10%):** (60 ml)

19.95 ml solución acrilamida/bisacrilamida 29:1 (58 g acrilamida y 2 g de bisacrilamida, aforar a 200 ml con agua desionizada).

11.4 ml soln. Tris-HCl 2M (pH 8.8)

300 ml solución SDS al 20%

28.2 ml agua desionizada.

270  $\mu$ l solución persulfato de amonio al 10%

30  $\mu$ l TEMED

**Gel concentrador (al 4%):** (20 ml)

2.6 ml solución acrilamida/bisacrilamida 29:1

2.5 ml solución Tris-HCl 1M (pH 6.8)

100  $\mu$ l solución SDS al 20 %

14.7 ml agua desionizada.

130  $\mu$ l solución de persulfato de amonio al 10%

10  $\mu$ l TEMED

- Se cubrió el gel de IEF con una solución de agarosa al 1% fundida en buffer de equilibrio con un poco de azul brillante de Coomassie G-250 y se colocaron aproximadamente 1.5 l de buffer de corrida 1X en el contenedor inferior de la cámara de electroforesis.

**Buffer de corrida 5X:** (1,000 ml)

72.07 g glicina

con agua destilada

15.14 g Tris

5 g SDS

- Se aforó a 1 litro con agua destilada

- Se guardó a temperatura ambiente.

**Buffer de corrida 1X:**

Diluir 1:5 el buffer de corrida 5X

- Se colocaron los geles en la cámara adaptada para geles planos y llenar el contenedor superior de la cámara con 400 ml de buffer de corrida 1X nuevo.

- Se corrió el gel por 7 h a 120 V o toda la noche a 65 V, hasta que salga el colorante del gel.

## 12.6 Tinción del gel

### 1) Tinción de Coomasie:

- Se colocó el gel en solución azul de Coomasie por 1 h aprox. hasta que todo el gel esté muy azul.

**Solución azul de Coomassie:** (550 ml)

250 ml metanol

50 ml ácido acético

0.275 g azul brillante de Coomassie G-250

250 ml agua destilada

- Se destiñó el gel con solución metanol: ácido acético 5:7% v/v en agua destilada. Haciendo cambios hasta que el gel estuvo transparente.

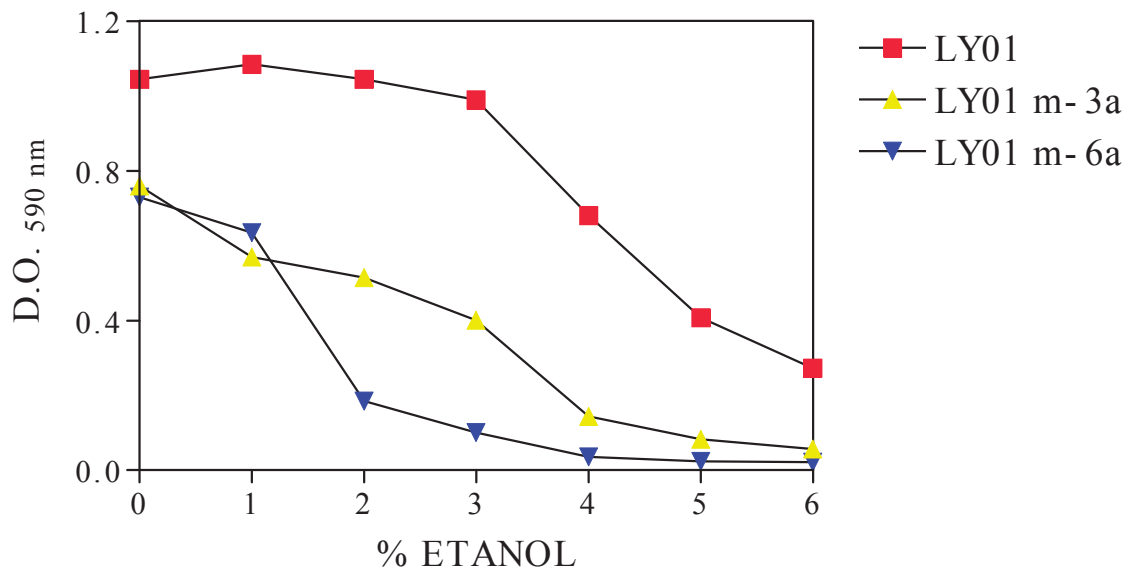
## VI. RESULTADOS

### 1.1 Obtención de mutantes de la cepa de *E. coli* LY01 por recombinación homóloga

Para poder estudiar más a fondo el efecto de la mutación en el gen que codifica para la chaperona molecular HscA se usaron las cepas de *E. coli* hiper recombinante *hscA::km* como cepas donadoras para la mutación por recombinación homóloga por el método de transducción con el fago P1vir, con lo cual se obtuvieron algunos fagos que contenían el gen *hscA::km*. De esta manera se pudo transferir la mutación al genoma de la cepa receptora (*E. coli* LY01). Una vez infectada la cepa receptora se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina, de las cuales se obtuvieron alrededor de 40 clonas. A estas se les realizó un segundo escrutinio que consistió en picar por duplicado las colonias y posteriormente incubar una placa a 30°C y la otra a 37°C; a 37°C se inicia el ciclo lítico, lo que nos indicó qué colonias tenían el fago activo. Se tomaron las colonias que crecieron a 37°C de la caja crecida a 30°C para evitar la contaminación de las colonias con bacteriófagos. De este segundo escrutinio nos quedamos con 25 mutantes resistentes a kanamicina, de lo que concluimos que estas clonas habían integrado la mutación *hscA::km* a su cromosoma.

### 1.2 Caracterización de mutantes de la cepa de *E. coli* LY01 por recombinación homóloga

Las 25 cepas de *E. coli* LY01 *hscA::km* fueron expuestas a distintos concentraciones de etanol en pruebas de tolerancia, observándose distintos niveles de tolerancia a etanol. Debido a que se encontraron dos tipos de comportamientos en las mutantes se seleccionaron dos que eran representativas de estos grupos (Figura 10). En ambas mutantes se presentó un crecimiento deficiente en ausencia de etanol; con respecto a esta deficiencia en el crecimiento se tienen reportes de que mutantes en el grupo de genes de interés presentan deficiencia metabólicas, las cuales son minimizadas al suplementar el medio con tiamina y aminoácidos (Skovran y col., 2000). En cuanto a su nivel de tolerancia a etanol se observa un



**Figura 10:** Prueba de tolerancia a etanol de la cepa de *E. coli* LY01 y sus mutantes. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo M9 + 0.2% de glucosa, como fuente de carbono a 30°C, con agitación constante, durante 18 h con las concentraciones de etanol indicadas. El crecimiento fue medido por absorbencia a 590 nm. N=2.

crecimiento casi paralelo con respecto a la cepa parental en el caso de la mutante m3a, en el caso de la mutante m6a se observó un menor nivel de tolerancia.

Estos resultados concuerdan con los ya obtenidos anteriormente en trabajos del laboratorio (Reséndiz-Tamayo y col., 2002).

Para los siguientes experimentos seleccionamos a la mutante m6a, ya que fue la mutante más afectada en su nivel de tolerancia.

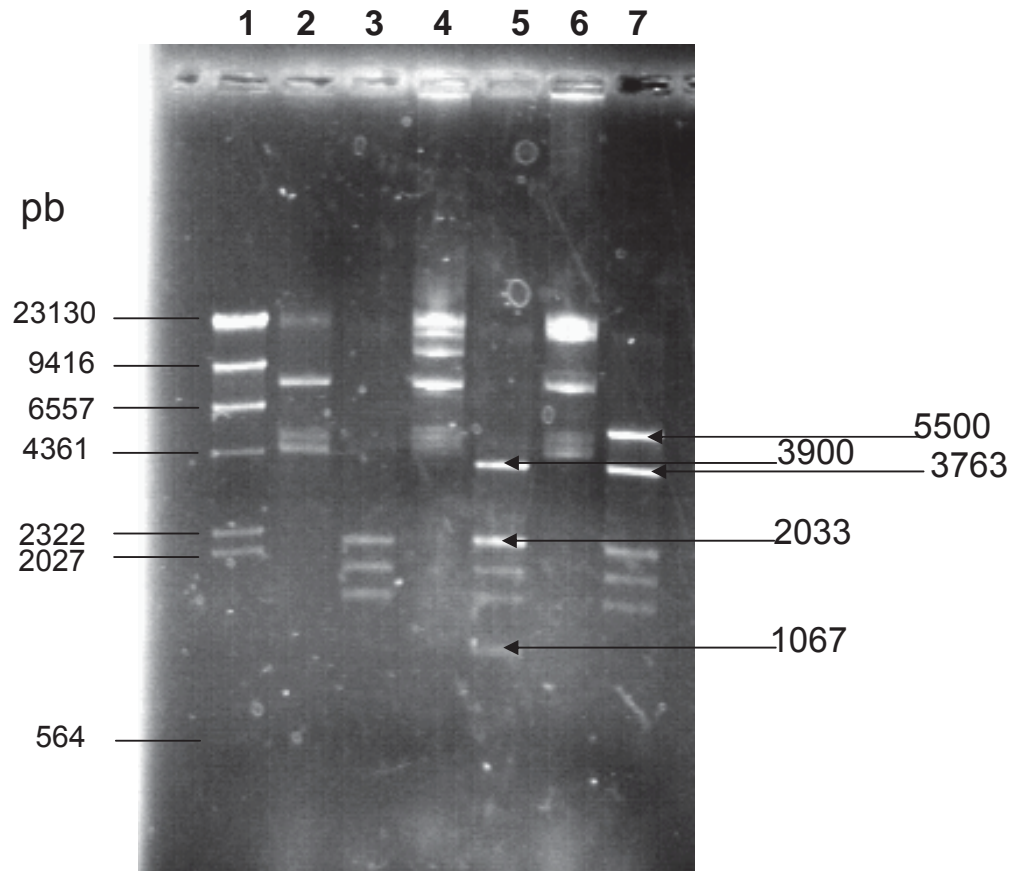
## **2. Transformación de las cepas en estudio con el operón hscBA**

Una vez obtenidas las cepas con la que se trabajaría se procedió a transformar las cepas LY01 y m6a con los plásmidos pKAV2 y pJC10 (Figuras 6 y 7), por el método de electroporación con las condiciones indicadas. Una vez transformadas se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina (Ap). Las colonias seleccionadas fueron analizadas para comprobar que contenían el plásmido esperado por el corrimiento electroforético del ADN plasmídico en geles de agarosa al 1%, donde se observó la presencia de los plásmidos pKAV2 y pJC10, con lo que se corroboró que las cepas transformadas, la cepa parental LY01 y la mutante m6a, tenían el plásmido esperado (Figura 11).

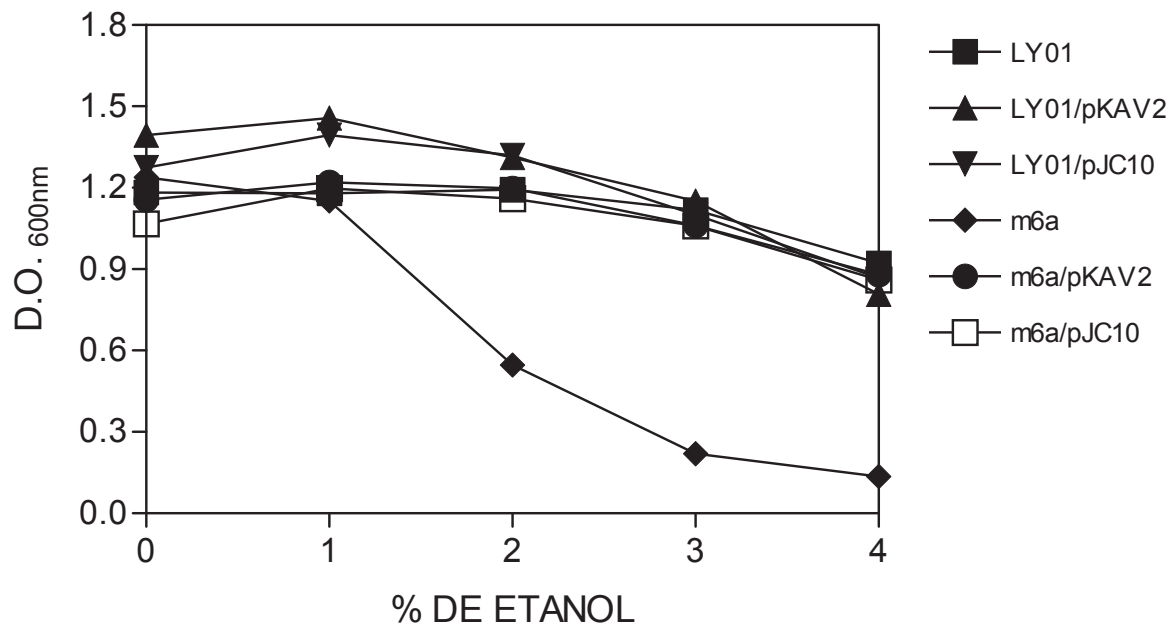
Al quedar transformadas las cepas con los plásmidos pKAV2 y pJC10, se esperaba que el fenotipo de tolerancia a etanol fuese restablecido en la mutante m6a, y en la cepa parental se esperaba un aumento en el nivel de tolerancia para lo cual se realizaron pruebas de tolerancia a etanol.

## **3. Pruebas de tolerancia a etanol**

Para comprobar que las cepas transformadas con los plásmidos pKAV2 y pJC10 mejoraban el nivel de tolerancia a etanol se realizó una curva dosis-respuesta de las diferentes cepas a distintas concentraciones de etanol en medio mínimo M9 + 0.2% de glucosa como fuente de carbono (Figura 12). Se observó que la mutante m6a tiene menor nivel de tolerancia a etanol con respecto a la cepa parental, la cual a partir del 1% de etanol tenemos una disminución del crecimiento celular. Mientras que la mutante transformada con pKAV2 y la transformada con pJC10 recuperaron su nivel de tolerancia a etanol



**Figura 11:** Corrimiento electroforético de la cepa etanológica de *E. coli* LY01. Carril 1: Marcador de tamaño molecular  $\lambda$  *Hind*III; carril 2: LY01; carril 3: LY01-*Eco*RI; carril 4: LY01+ pKAV2; carril 5: LY01+ pKAV2-*Eco*RI; carril 6: LY01+pJC10; carril 7: LY01+pJC10-*Eco*RI.



**Figura 12:** Prueba de tolerancia a etanol de la cepa de *E. coli* LY01 y sus derivadas. Los cultivos fueron crecidos en medio mínimo M9 + 0.2% de glucosa, como fuente de carbono a 30°C, con agitación constante, durante 18 h con las concentraciones de etanol indicadas. El crecimiento fue medido por absorbencia a 600 nm.

de forma similar a la cepa parental LY01. Con esto podemos observar que el producto del gen *hscA* tiene efecto sobre el nivel de tolerancia de la cepa etanológica de *E. coli* LY01.

En lo que respecta a la cepa de LY01 transformada con los plásmidos pKAV2 y pJC10 no se observó diferencia en su nivel de tolerancia etanol (Fig. 12).

#### 4. Curvas de crecimiento

Como los efectos tóxicos del etanol causan la inhibición del metabolismo y crecimiento de las células, además de causar la muerte celular, surge la duda de si el efecto que observamos en el nivel de tolerancia a etanol es desde el inicio del crecimiento o es una suma de los efectos tóxicos del etanol, especialmente la muerte celular.

Por lo que el siguiente paso fue comparar el comportamiento de las distintas cepas por medio de curvas de crecimiento, lo que nos permitiría observar el efecto de los distintos parámetros estudiados, la mutación, la sobre-expresión del operón *hscBA* y el etanol sobre los tiempos de duplicación de cada cepa.

Comparando el comportamiento de las curvas de crecimiento de cada cepa en ausencia de etanol, se observó que la mutante m6a tiene un comportamiento diferente al mostrado por la cepa parental (LY01), donde el crecimiento es menor desde las 2 horas de incubación, y sigue hasta el final del experimento (Fig. 13-A). Al transformar la cepa mutante con los plásmidos pKAV2 y pJC10 se puede observar que hay un comportamiento intermedio al de la cepa parental, con lo que podemos asegurar que se complementó la mutante. Con respecto a la cepa LY01 que contiene los plásmidos pKAV2 y pJC10, no hay diferencia en su comportamiento respecto de su parental (Figura 13 A).

En presencia de etanol (1%), se observó que la mutante m6a presenta un comportamiento diferente en la curva de crecimiento con respecto a la parental, además de que su crecimiento se encuentra afectado por la presencia de etanol, en comparación a la parental (Fig. 13-B). En cuanto a la mutante

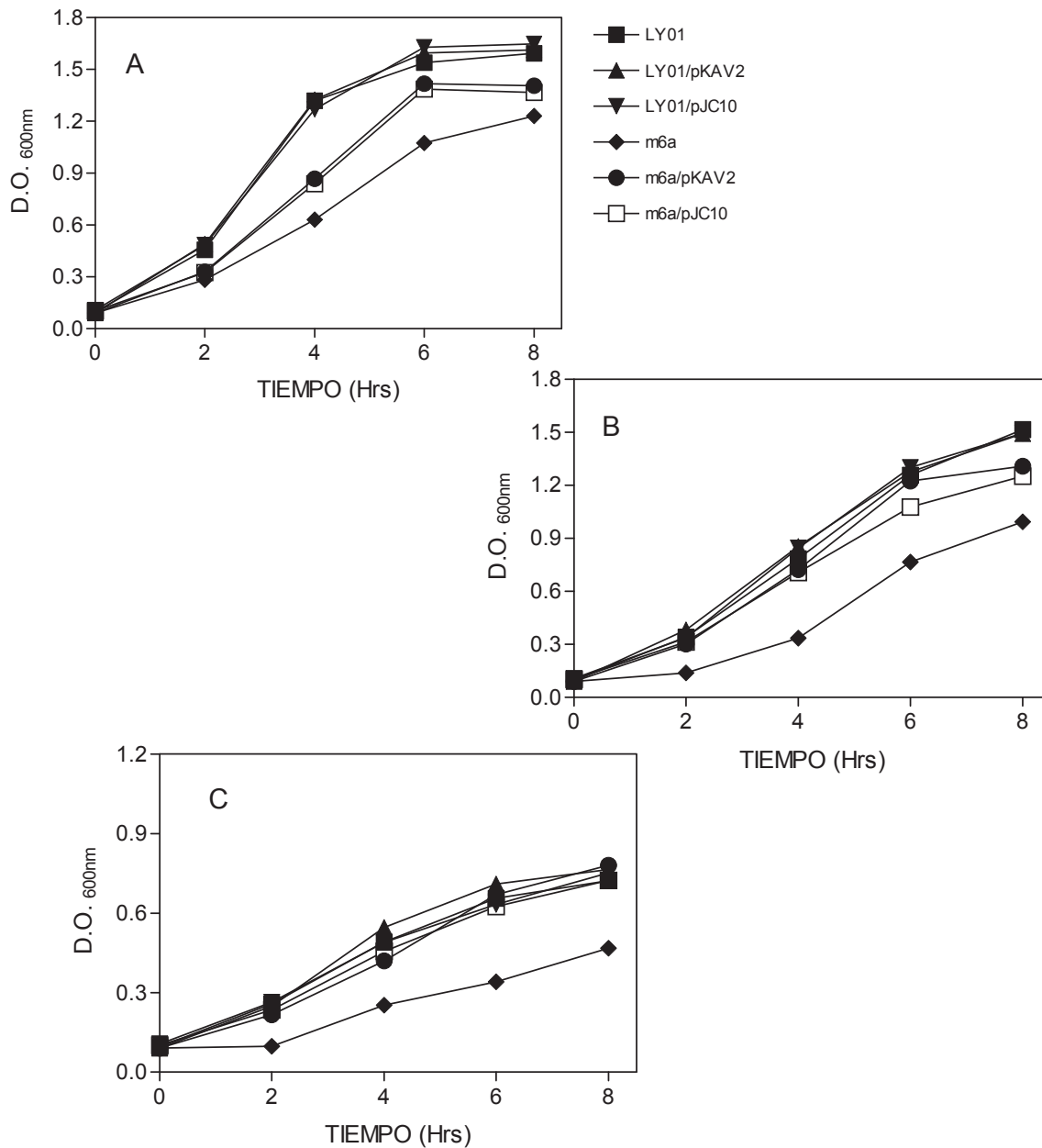


Figura 13: Las curvas de crecimiento fueron realizados en medio mínimo M9+0.2% de glucosa +0.025% de peptona en agitación constante a 30°C, a diferentes concentraciones de etanol. A) En ausencia de etanol; B) 1% de etanol, y C) 3% de etanol. La absorbencia se midió a 600 nm. n=3.

complementada con los plásmidos pKAV2 y pJC10, tienen un comportamiento y crecimiento similar al mostrado por la cepa parental en esta concentración de etanol. Las cepa de LY01 transformadas con los plásmidos pKAV2 y pJC10 no muestran diferencia respecto de la cepa parental (Figura 13 B).

La curva de crecimiento al 3% de etanol sigue mostrando que la mutante es la que tiene un comportamiento diferente al del resto de las cepas, al tener un menor crecimiento (Fig. 13-C). En cuanto al resto de las cepas que albergan los plásmidos pKAV2 y pJC10 tuvieron un comportamiento similar al de la cepa parental (Figura 13 C).

#### 4.1 Tiempo de duplicación

A partir de las curvas de crecimiento se calculó el tiempo de duplicación de cada cepa, por medio de la siguiente formula:

$$td = \frac{0.69}{\mu}$$

donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ).

td = Tiempo de duplicación (h).

0.69 = proviene del logaritmo natural de 2.

Para obtener el valor de  $\mu$  se usó la siguiente formula:

$$\mu = \frac{\ln (M_2-M_1)}{\Delta t}$$

donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ).

$\Delta t$  = intervalo de tiempo que existe entre la segunda y la primera medición de absorbencia.

$M_1$  = Absorbencia al tiempo 1.

$M_2$  = Absorbencia al tiempo 2.

En la Tabla 4 se muestran los tiempos de duplicación obtenidos para cada cepa en las concentraciones de etanol a las que fueron expuestas.

CEPA	ETANOL (%)		
	0	1	3
LY01	1.3	1.7	2.1
LY01/pKAV2	1.4	1.7	1.8
LY01/pJC10	1.4	1.5	2.2
m6a	1.7	2.1	2.6
m6a/pKAV2	1.4	1.6	2.1
m6a/pJC10	1.5	1.7	2.1

**Tabla 4:** Tiempos de duplicación de las cepas de *E. coli* LY01 y sus derivadas. Los datos fueron obtenidos de las curvas de crecimiento de la figura 13. Los datos utilizados para determinar el td (tiempo de duplicación) fue de las 4 a las 6 horas.

Hasta el momento, se comprobó que el producto del gen *hscA* se encuentra involucrado en el nivel de tolerancia y del crecimiento de la cepa de *E. coli* etanologénica LY01; sin embargo, ya se tenían indicios de este efecto, lo que ahora resultó de interés fue el efecto que tendría la mutación sobre la producción de etanol y si estaba relacionado con alguna(s) enzimas perteneciente a la ruta de síntesis del etanol. Por lo que el siguiente paso fue comparar la producción de etanol de las diferentes cepas en pruebas de fermentación por lotes.

## 5. Pruebas de fermentación por lotes

Existen varios parámetros determinados a partir de las pruebas de fermentación, los cuales son enlistados a continuación:

- Etanol producido (% o g/l).
- Glucosa restante en el medio de cultivo.
- KOH (4N) consumido (ml).
- Densidad óptica a 600 nm.
- Velocidad de crecimiento específico ( $h^{-1}$ ).

### 5.1 Crecimiento (densidad óptica)

Es importante que una cepa de interés industrial tenga una buena capacidad de crecimiento, ya que se cree que entre mayor es el número de células presentes en el fermentador mayor será la cantidad de etanol producido. Por lo que el primer paso fue ver el efecto de la mutación del gen *hscA* sobre la velocidad de crecimiento en condiciones de fermentación, es decir en ausencia de oxígeno.

La mutante m6a tiene defectos en la velocidad de crecimiento (tabla 6), además de que la densidad óptica máxima alcanzada por ésta es menor al que registró la cepa parental LY01 (Figura 14), mientras que las mutantes complementada con los plásmidos pKAV2 y pJC10 aumentaron su velocidad de crecimiento (tabla 6); la D.O. máxima que alcanzaron fue similar al de la cepa parental (Figura 14). En cuanto a las cepas restantes (LY01/pKAV2 y LY01/pJC10) alcanzaron una D.O. máxima similar a la cepa parental. Con lo

que se corroboró lo obtenido en condiciones aeróbicas, en las curvas de crecimiento.

## 5.2 Consumo de glucosa

Se comparó el consumo de las seis cepas utilizadas entre si, como se puede observar en la Figura 15 existen tres cepas que presentan un consumo bifásico, y otras tres que presentan un consumo de glucosa constante desde el inicio de la fermentación.

Las cepas que presentan consumo bifásico fueron: LY01, m6a y m6a/pKAV2, lo que probablemente se deba a que estas cepas utilicen la glucosa principalmente para el crecimiento celular y posteriormente para la producción de etanol u otros productos obtenidos durante la fermentación.

Las cepas restantes, que tuvieron un consumo de glucosa constante, posiblemente estén utilizando la glucosa de manera simultánea para el crecimiento celular y la obtención de productos de fermentación.

Para comprobar lo anteriormente mencionado se relacionó la velocidad de consumo de glucosa con la velocidad de producción de etanol (tabla 5). En el caso de la mutante y su complementada con el plásmido pKAV2 tuvieron una velocidad de producción de etanol menor con respecto al resto de las cepas.

## 5.3 Consumo de KOH

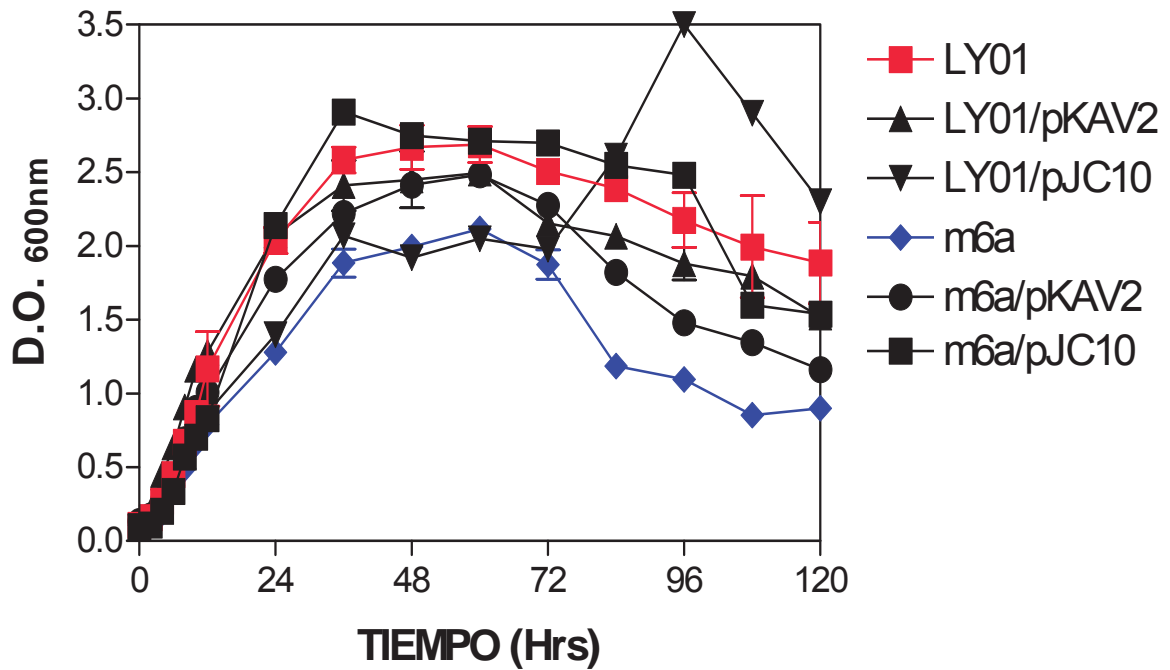
Una de las característica principales de las cepas de *E. coli* etanologénicas es que tienen como principal producto de fermentación al etanol, aunque también hay producción de ácidos orgánicos, solo que en menor proporción que en cepas de *E. coli* silvestre. Una manera de monitorear la producción de ácidos orgánicos, de manera indirecta, es observando el consumo de hidróxido de potasio (KOH).

La fermentación se realiza a un pH constante de 7.0, el cual es mantenido con la adición de KOH, registrando la cantidad consumida se logró realizar una gráfica para cada cepa. Un mayor consumo de KOH representa un aumento en la producción de ácidos orgánicos, lo que se refleja en un menor rendimiento en la producción de etanol, o bien, si la producción de etanol no se ve afectada,

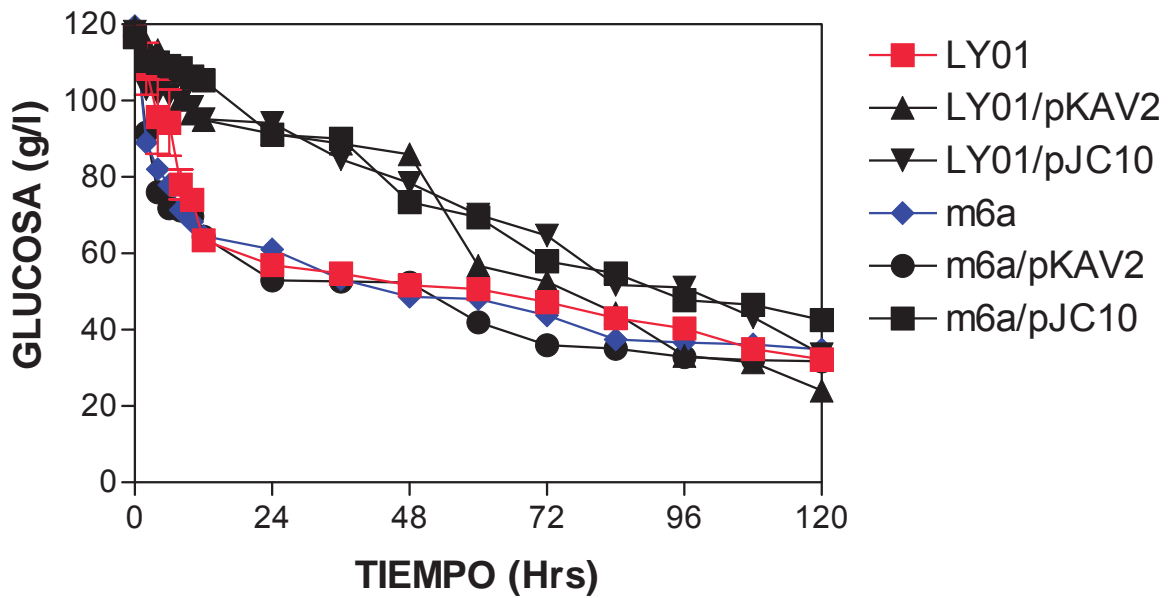
**Tabla 5:** Principales parámetros cinéticos obtenidos de los valores graficados de las pruebas de fermentación de las cepas usadas.

CEPA	PARAMETROS CINETICOS				
	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$r_{gmax}$ (g/h)	CONSUMO DE KOH (ml)	$r_{pmax}$ (g/h)	EFICIENCIA % (W/W)
LYO1	0.114	4.54	51.5	0.88	47.6
LYO1/pKAV2	0.101	2.1	108	0.67	34
LYO1/pJC10	0.055	1.91	96	0.44	41.5
<b>m6a</b>	<b>0.05</b>	<b>4.57</b>	<b>62.5</b>	0.33	<b>39.6</b>
m6a/pKAV2	0.075	4.38	70	0.4	44.4
m6a/pJC10	0.061	0.95	57	0.43	63.8

Donde:  $r_{gmax}$ : consumo máximo de glucosa;  $\mu_{max}$ : crecimiento específico máximo;  $r_{pmax}$ : producción máxima de etanol; el KOH esta a una concentración de 4N y la eficiencia esta calculada por la siguiente fórmula: Etanol producido real X100/EtOH producido teórico, el etanol producido teórico se obtiene al multiplicar el total de glucosa consumida por el rendimiento teórico, que tienen un valor de 0.51.



**Figura 14:** Crecimiento en condiciones anaeróbicas de las diferentes cepas utilizadas. Se utilizó medio mínimo M9 suplementado con 1 mg/l de tiamina, 0.025% de peptona caseína, 0.5 ml/l de trazas de metales y 120 g/l de glucosa, en un fermentador marca applikon® de un litro de capacidad.



**Figura 15:** Consumo de glucosa en condiciones de fermentación de las diferentes cepas utilizadas. Se utilizó medio mínimo M9 suplementado con 1 mg/l de tiamina, 0.025% de peptona caseína, 0.5 ml/l de trazas de metales y 120 g/l de glucosa, en un fermentador marca applikon® de un litro de capacidad.

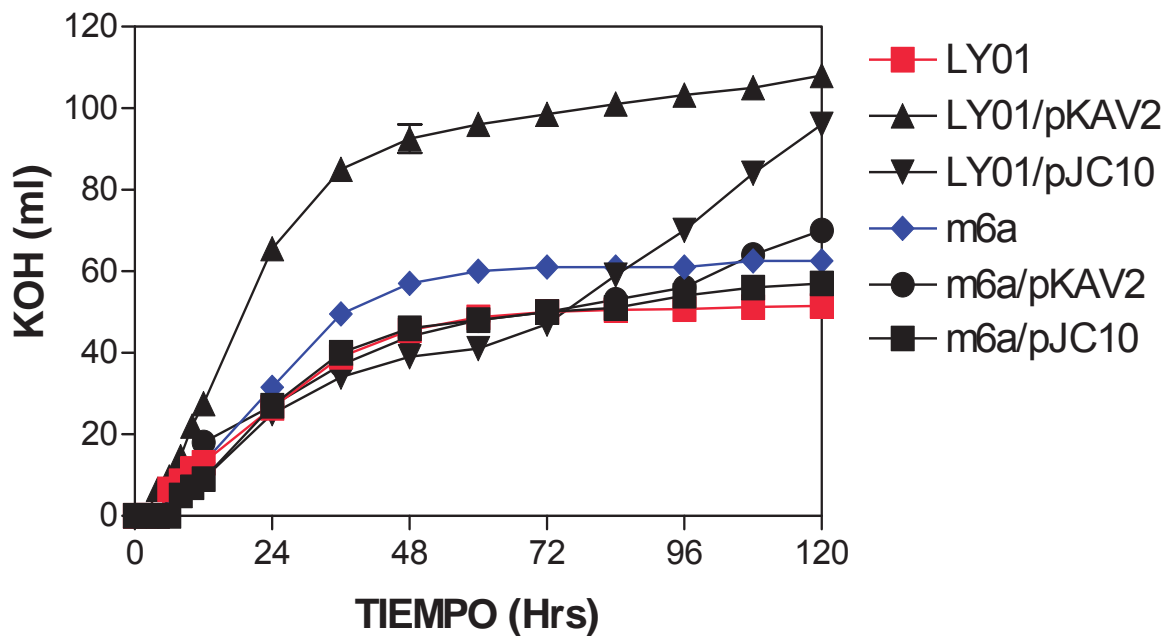
puede ser debida a un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en la ruta de síntesis de los productos de la fermentación.

Al comparar el consumo de KOH entre cada cepa se pueden observar dos grupos: las cepas LY01, m6a, m6a/pKAV2 y m6a/pJC10, las cuales consumieron una cantidad de KOH similar (Figura 16), y las cepas LY01/pKAV2 y LY01/pJC10, las cuales mostraron un mayor consumo de KOH. Lo que nos indica que al transformar la cepa de LY01 con los plásmidos pKAV2 y pJC10 se mejoró la producción de ácidos orgánicos, probablemente mediante la estabilización o plegamiento de las enzimas involucradas en la ruta de síntesis de los ácidos orgánicos.

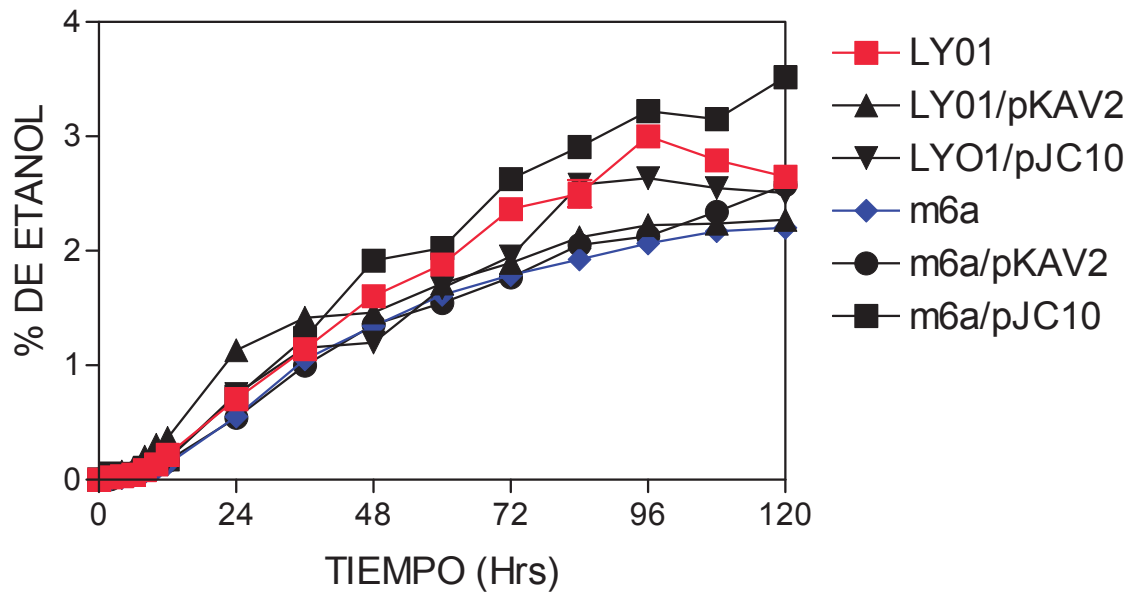
#### **5.4 Producción de etanol**

Con la finalidad de conocer el efecto de la mutación y/o la sobre expresión del gen *hscA* sobre la producción de etanol se monitoreó la producción de éste durante el proceso de fermentación, haciendo uso de un cromatógrafo de gases. En la gráfica de producción de etanol se observaron dos comportamientos en cuanto a la cinética de producción, uno donde las cepas LY01/pKAV2, m6a y m6a/pKAV2 mostraron una producción de etanol uniforme, mientras que las cepas LY01, LY01/pJC10 y m6a/pJC10 tuvieron una producción de etanol variable (Figura 17).

La producción final de etanol se comportó de la siguiente manera: el porcentaje final de etanol producido por la cepa LY01 fue de 2.6%, 2.3% para LY01/pKAV2, 2.5% para LY01/pJC10, 2.2% para m6a, 2.6% para m6a/pKAV2 y 3.5% para m6a/pJC10. Como podemos observar, la mutación afectó la producción de etanol al disminuirla 15.4% con respecto a la cepa parental, a nivel industrial esto significaría una perdida importante. En cuanto a la cepa LY01/pKAV2, se encontró también una disminución en la producción de etanol, sin embargo, con los datos obtenidos de la producción de ácidos orgánicos (consumo de KOH) podemos suponer que el metabolismo se inclinó más hacia la obtención de ácidos orgánicos que hacia la producción de etanol.



**Figura 16:** Monitoreo del consumo de hidróxido de potasio de cada una de las cepas utilizadas. Se utilizó medio mínimo M9 suplementado con 1 mg/l de tiamina, 0.025% de peptona caseína, 0.5 ml/l de trazas de metales y 120 g/l de glucosa en un fermentador marca aplikon® de un litro de capacidad.



**Figura 17:** Producción de etanol (V/V) de cada una de las cepas utilizadas. Se utilizó medio mínimo M9 suplementado con 1 mg/l de tiamina, 0.025% de peptona caseína, 0.5 ml/l de trazas de metales y 120 g/l de glucosa, en un fermentador marca applikon® de un litro de capacidad.

Lo que respecta a las cepas LY01/pJC10 y m6a/pKAV2 tuvieron una producción de etanol similar a la cepa parental LY01. La cepa que mejoró la producción de etanol (75%) fue la mutante m6a transformada con el plásmido pJC10 con respecto a la cepa parental LY01, este aumento en la producción de etanol es de gran importancia, sobre todo si se piensa escalar a nivel industrial.

A partir de los datos graficados se pueden determinar varios parámetros, como la velocidad de crecimiento, la velocidad de consumo de glucosa, la velocidad de producción de etanol, los gramos de etanol producidos y la eficiencia en la producción de etanol. Estos parámetros nos ayudan para entender mejor lo que pasa en el metabolismo de las cepas. Así pues tenemos que los valores obtenidos de la cepa parental son tomados como valores normales, un punto de comparación para las demás cepas (tabla 5).

Empezando a analizar los valores obtenidos para la cepa LY01/pKAV2; tenemos que la velocidad de crecimiento es similar, la velocidad de consumo de glucosa fue aproximadamente 50% menor, consumió un poco más del doble de KOH, la velocidad de producción de etanol disminuyó un 24% y la eficiencia en la producción de etanol se afectó en un 29%; todo con respecto a los valores obtenidos por la cepa parental LY01. De esta manera corroboramos lo propuesto en las gráficas, que el consumo de glucosa es menor diferente al que presenta la cepa parental, y por consiguiente, hay diferencias en la velocidad de crecimiento y la velocidad de producción de etanol, además de que se puede reafirmar que hay una tendencia a favorecer la producción de ácidos orgánicos, lo que se refleja en una disminución en el rendimiento y por lo tanto aumenta el costo de producción, por lo que no es una cepa candidata para la producción de etanol a nivel industrial.

Lo que respecta a la cepa LY01/pJC10, comparando de la misma manera que con la cepa anterior tenemos que la velocidad de crecimiento disminuyó aproximadamente 50%, la velocidad de consumo de glucosa presentó una disminución del 58%, consumió cerca del doble de KOH, la velocidad de producción de etanol se afectó en un 50% y la eficiencia que reportó ésta cepa fue 13% menor que el obtenido por LY01. De igual forma podemos decir que la sobreexpresión del gen *hscA* influyó sobre la producción de ácidos orgánicos.

Una de las cepas que más nos interesó conocer su comportamiento fue la mutante m6a, cuya velocidad de crecimiento se encontró disminuida en un 50%, una velocidad de consumo de glucosa similar a LY01, consumió un 21% de KOH más que LY01, en cuanto a la velocidad de producción de etanol se observó una disminución del 63% y la eficiencia se vió afectada en un 17%, todo con respecto a LY01. Por lo que podemos concluir que esta cepa utilizó principalmente la glucosa para su crecimiento en las primeras 12 hrs, y que el metabolismo se inclinó hacia la producción de ácidos orgánicos.

Al transformar la cepa m6a con el plásmido pKAV2 se obtuvo un aumento del 50% en la velocidad de crecimiento, esto ya con respecto a la mutante m6a, la velocidad de consumo de glucosa fue similar al que mostraron las cepas LY01 y m6a, el consumo de KOH fue de 36% más al reportado por LY01, la velocidad de producción de etanol fue 55% menor que en el caso de LY01 pero 21% mayor que el de la cepa m6a. En cuanto a la eficiencia encontrada para ésta cepa fue similar al de la cepa LY01, con una diferencia del 7% menos en la cepa LY01/pKAV2. Con lo que podemos concluir que al complementar la mutación del gen *hscA* pudimos recuperar una producción de etanol similar al de la cepa parental, además de que también existe un aumento en la producción de ácidos orgánicos.

La cepa m6a/pJC10 mostró un aumento del 22% en la velocidad de crecimiento con respecto a m6a, la velocidad de consumo de glucosa fue la más lenta reportada en este grupo de cepas con una disminución del 79% con respecto a la cepa LY01, el consumo de KOH fue similar al encontrado en la cepa LY01, la velocidad de producción de etanol fue 50% menor al de LY01, y la eficiencia encontrada para esta cepa fue del 34% mayor al de LY01. Lo que resulta de gran importancia para la industria, al encontrar una cepa que tenga una mayor eficiencia en la producción de etanol y que el metabolismo se conserve con tendencia hacia la producción del mismo.

Lo que hasta el momento se observó fue el efecto que tiene la mutación en el gen *hscA* sobre la producción de etanol y cómo al complementar la mutante con el plásmido pJC10, el efecto negativo sobre la producción se minimiza, e inclusive hay un aumento en la eficiencia de producción, esto nos lleva a pensar que posiblemente el producto del gen *hscA* se encuentra

involucrado con las enzimas involucradas en la ruta de síntesis de etanol, de las cuales existen al menos 11 en la ruta de Embden-Meyerhof, que es la ruta por la cual se asimila la glucosa en *E. coli*. Es probable que al menos una enzima sea ensamblada y/o estabilizada por la chaperona molecular HscA/HscB, por lo que el siguiente paso fue ver el efecto de la mutación del gen *hscA* sobre la actividad de alguna de las enzimas involucradas en la síntesis de etanol.

## 6. Determinación de la actividad de la alcohol deshidrogenasa II (ADHII)

Una de las enzimas importantes en las cepas de *E. coli* etanológicas (LY01) es la Alcohol Deshidrogenasa II (ADHII) proveniente de *Z. mobilis*, se sabe que ésta enzima es dependiente de Fe para ser activa, por lo que es probable que sea sustrato de la chaperona HscA. Hasta el momento no existen reportes sobre el sistema por medio del cual ésta enzima es plegada, lo que la hace una enzima que pueda ser plegada por el mecanismo de biogénesis de las enzimas que contienen grupos Fe-S. Una forma de comprobarlo fue determinar la actividad de la ADHII en las diferentes cepas utilizadas en este trabajo.

Los valores obtenidos fueron graficados y se muestran en la figura 18, tomando como referencia a la cepa LY01, mostrando una actividad de 42.4 unidades ( $\mu\text{mol}$  de producto por minuto por  $\text{mg}$  de proteína) (tabla 6).

Todas las cepas probadas mostraron efectos en la producción de etanol, por lo que era muy posible que la actividad de la ADHII también se encontrara afectada. Las cepas que más nos interesaron fueron m6a y la m6a/pJC10.

La actividad de ADHII presentada por la mutante m6a fue de 13.6 unidades, es decir una disminución del 68% con respecto a las 42.4 unidades de la cepa parental. Esto nos sugiere que el mecanismo de ensamble de la ADHII en *E. coli* puede estar involucrado el grupo de genes *isc*, en el cual se encuentra el gen *hscA*. Al respecto existen reportes de que mutaciones en los genes *iscS* y *fdx* tienen efectos similares sobre enzimas que requieren grupos Fe-S (Djaman y col., 2004). Otra forma de comprobarlo es complementando la mutante, la cepa que nos dio mejores resultados en la producción de etanol fue m6a/pJC10, al calcular la actividad enzimática tuvo una actividad de 33.5

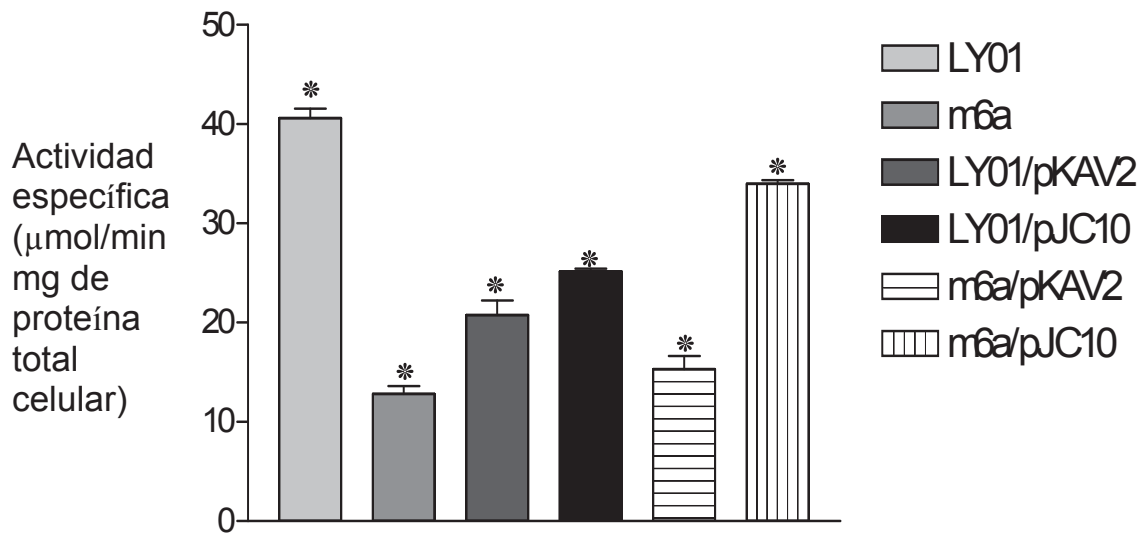


Figura 18: Actividad de la ADHII de las cepas en estudio. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo M9 suplementado con 1 mg/l de tiamina, 0.025% de peptona caseína, 0.5 ml/l de trazas de metales y 20 g/l de glucosa, a 30°C, con una agitación constante de 150 rpm, durante toda la noche.\*N=3. = Desviación estándar.

unidades, es decir que tiene una recuperación de un 90%, lo que nos confirma lo antes mencionado.

En cuanto a la actividad de ADHII presente en el resto de las cepas dió un comportamiento no esperado y los resultados hasta ahora obtenidos no nos ayudan a responder la disminución en la actividad de ADHII que mostraron las cepas LY01/pKAV2, LY01/pJC10 y m6a/pKAV2.

Los resultados nos sugieren hasta el momento que el producto del gen *hscA* probablemente se encuentra involucrado con el ensamblaje de la ADHII.

## 7. Pruebas de estabilidad de la ADHII

La prueba de estabilidad fue realizada utilizando extractos crudos, en el buffer usado para la determinación de la actividad enzimática, de la misma forma que la actividad, aunque sin necesidad de realizar una cinética, además que el extracto de proteína era mantenido a la temperatura requerida, en este caso a 37°C. Para determinar la estabilidad se graficaron los valores obtenidos en los lapsos de tiempo requeridos, en este caso fueron de 10 min, y se determinó el valor de la pendiente por medio de una regresión lineal. El logaritmo natural de la pendiente es proporcional a la estabilidad de la enzima presente en la cepa en estudio, es decir, que entre mayor es el valor obtenido de la constante de estabilidad ( $K_E$ ) mayor es la estabilidad de la enzima.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7, donde podemos observar que la estabilidad de la ADHII presente en las cepas LY01/pKAV2 y LY01/pJC10 fue mayor a la registrada por la cepa LY01, teniendo un aumento de alrededor del doble en la estabilidad de la cepa LY01/pKAV2. Se debe tomar en cuenta que la constante de estabilidad está dada en valores logarítmicos. Con esto podemos decir que aunque la actividad de ADHII presente en las cepas LY01/pKAV2 y LY01/pJC10 fue menor la estabilidad que presentaron éstas fue mayor.

En cuanto a la mutante m6a se observó una disminución de la estabilidad de la ADHII de aproximadamente 50% con respecto a la cepa LY01. Al complementar esta cepa con los plásmidos pKAV2 y pJC10 se obtuvo un aumento en la estabilidad de la ADHII presente en estas cepas (Tabla 6).

**Tabla 6:** Constante de Estabilidad ( $K_E$ ) de la ADHII de las distintas cepas de *E. coli* LY01 y sus derivadas.

	LY01	m6a	LY01/ pKAV2	LY01/ pJC10	m6a/ pKAV2	m6a/ pJC10
$K_E$	31.29	16.67	60.31	36.42	44.66	21.46

Las cepas fueron crecidas en medio mínimo M9 suplementado con 1 mg/l de tiamina, 0.025% de peptona caseína, 0.5 ml/l de trazas de metales y 20 g/l de glucosa. N=2.

Esto nos sugiere que efectivamente el producto del gen *hscA* se encuentra involucrado con la estabilidad de la ADHII.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento nos sugieren que el producto del gen *hscA* se encuentra involucrado en el ensamblaje y la estabilización de la enzima ADHII, sin embargo, esta no es la única enzima que requiere de grupos Fe-S, y una forma de saber el efecto de la chaperona HscA sobre otras enzimas es observando las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas, lo cual fue el siguiente paso a realizar.

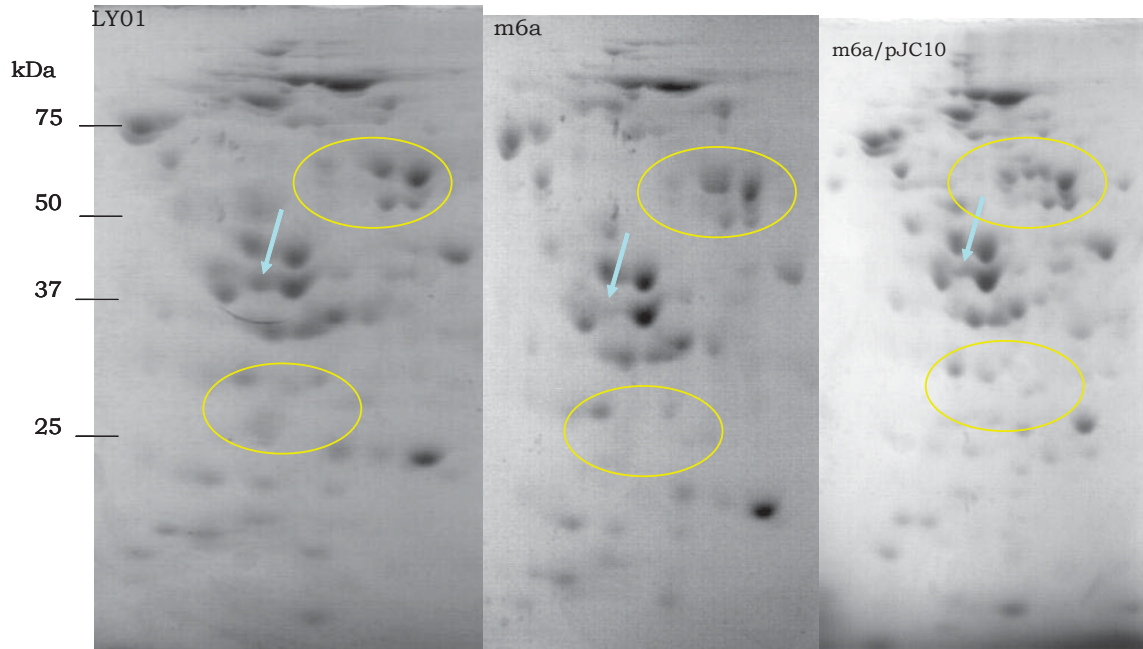
### **8. Diferencia en el nivel de expresión de proteínas por el método de electroforesis en dos dimensiones (IEF-PAGE/SDS)**

Con los resultados obtenidos hasta el momento se decidió evaluar el efecto de la mutación en el gen *hscA* sobre la expresión de proteínas, para lo cual fueron seleccionadas las cepas LY01, m6a y m6a/pJC10.

Tomando como referencia el patrón de expresión de proteínas de la cepa LY01 y comparándola con la de la cepa m6a, podemos observar que hay una disminución en la concentración de algunas proteínas (Figura 19), especialmente nos inclinamos a la búsqueda de diferencias en el nivel de expresión de proteínas que se encuentran alrededor de los 37 kDa, debido a que este es el peso reportado para la ADHII de *Z. mobilis*, y de esta manera apoyar los resultados de la disminución en la producción de etanol y en la actividad enzimática son debidos a un mal plegamiento de la enzima.

También es importante mencionar que existen algunas proteínas que tienen mayor expresión en la mutante m6a, probablemente para compensar la disminución de otras proteínas. Proponemos que las enzimas que se encuentran disminuidas en su nivel de expresión son ensambladas por los productos codificados por el grupo de genes *isc* y que probablemente alguna de ellas esté involucrada en el catabolismo de glucosa y producción de etanol.

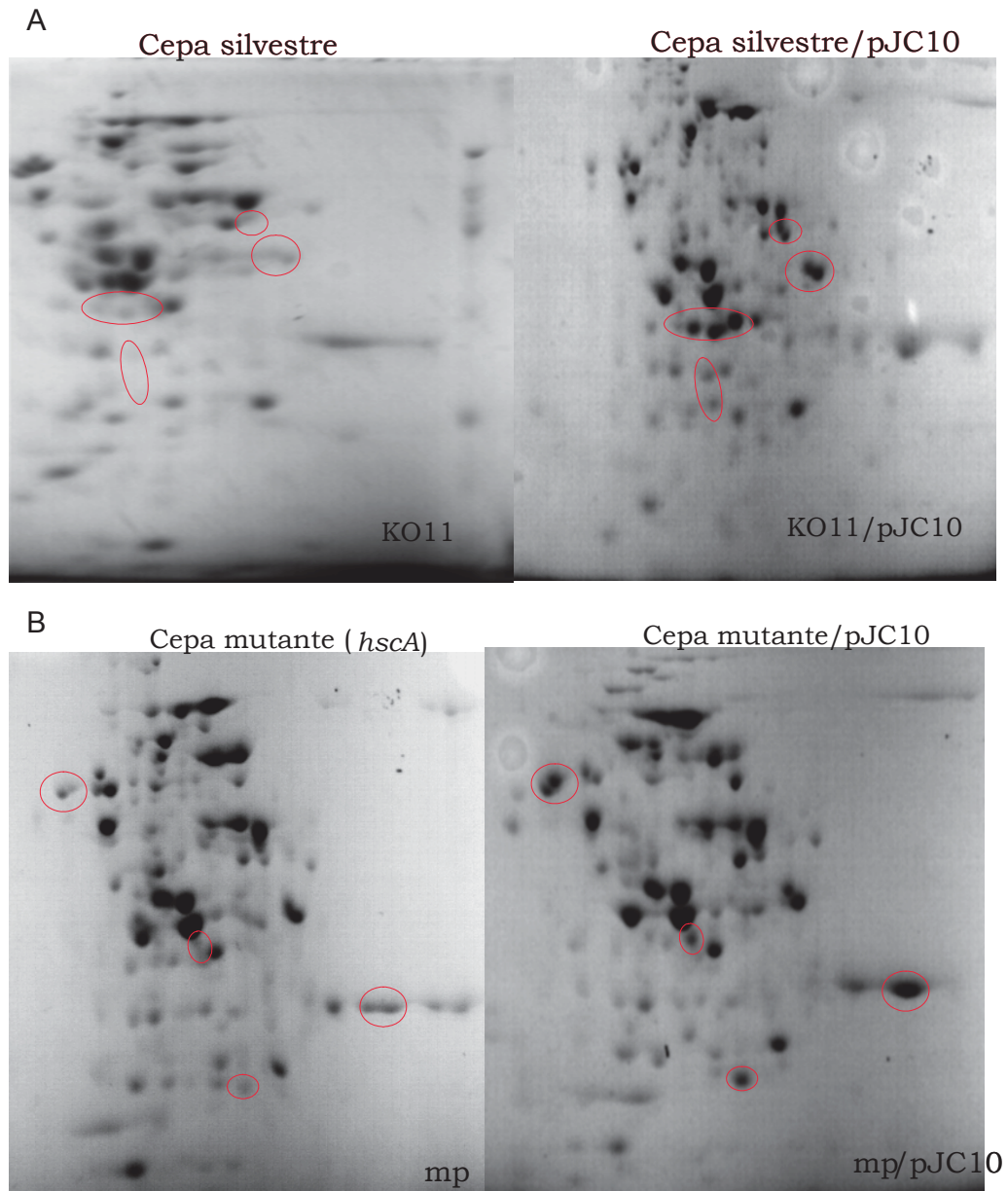
Al complementar la mutación en el gen *hscA* con la introducción del plásmido pJC10, podemos observar que hay una sobreexpresión de proteínas, en la cepa m6a/pJC10 que no se distinguen en el gel correspondiente a cepa



**Figura 19:** Geles de electroforesis proteínas en dos dimensiones de la cepa LY01, m6a y m6a/pJC10. La banda señalada con la flecha es probablemente ADHII y las bandas encerradas en círculos amarillos son las que muestran diferencias en su nivel de expresión.

LY01. Estos resultados refuerzan nuestra propuesta de que la chaperona HscA se encuentra involucrada con el ensamble y estabilización de proteínas.

Además de observar la diferencia en los niveles de expresión de proteínas de las cepas de LY01 y sus derivadas, nos dimos a la tarea de realizar el mismo proceso con cepas de *E. coli* etanologénicas KO11 y derivadas. Se realizó la electroforesis en dos dimensiones con la cepa parental, la mutante en el gen *hscA* (mP) y la mutante mP complementada con el plásmido pJC10. En este grupo de cepas añadimos la cepa KO11/pJC10. Comparando el nivel de expresión de proteínas entre la cepa KO11 y KO11/pJC10 se observa una sobreexpresión de proteínas en la cepa transformada con el plásmido pJC10, lo que se correlaciona con la producción de etanol por parte de esta cepa (datos no mostrados) (Figura 20-A). De igual manera se puede observar una disminución en el nivel de expresión de proteínas presentes en la mutante comparándola con la mutante transformada con el plásmido pJC10, en la que se observa claramente un aumento en el nivel de expresión de proteínas (figura 20-B), lo que reafirma la capacidad fermentativa de la cepa mP/pJC10 sobre la cepa mP (datos no mostrados).



**Figura 20:** Geles de electroforesis de dos dimensiones de proteínas de las cepas KO11, KO11/pJC10, mP y mP/pJC10; las bandas encerradas en círculos son las que muestran diferencias en su nivel de expresión.

## VII. DISCUSIÓN

Durante los últimos años el uso de la biotecnología para obtener productos de interés para el ser humano ha ido en aumento, debido a que este tipo de procesos abarata los costos y reduce el tiempo de producción, además de que se obtiene un producto casi puro, lo que se refleja en el costo final del producto. Sin embargo, para poder hacer uso de estas técnicas es necesario conocer la ruta metabólica por la cual es sintetizado el producto de interés para la humanidad. La forma más común de identificar los genes biosintéticos, así como las rutas metabólicas en las que están involucrados o bien la función que tienen los productos de estos genes es mediante la mutagénesis (Skovran y col., 2000). De esta manera se ha podido conocer el metabolismo de la glucosa, y de otros componentes que son tóxicos o contaminantes, las rutas de síntesis de los ácidos grasos, colesterol, etc.

Así pues, el uso de la mutagénesis resulta de gran ayuda para aumentar nuestros conocimientos sobre el metabolismo de los microorganismos. Tomando en cuenta que el uso de microorganismos en la obtención de productos que sean de utilidad para el hombre Ingram y col. en 1989 crean una cepa de *E. coli* capaz de sintetizar etanol como principal producto de fermentación (Tao y col., 2001). Una de las limitantes en cepas productoras de etanol es la toxicidad que este compuesto representa para los organismos, ante lo cual se desarrollaron diferentes estrategias para contrarrestar estos efectos por parte de los organismos. Existen reportes sobre las estrategias que se han desarrollado, las cuales son: cambios en la composición de lípidos (Ingram y col., 1976), síntesis de compuestos osmoprotectores (Ingram y col., 2004; Carey y col., 1983), expulsión de solventes (Kieboom y Bont, 1998), aunque no se encuentra reportado para el caso del etanol, pero sí de otros alcoholes y tolueno, y finalmente el menos estudiado pero no de menor importancia la protección brindada por las chaperonas moleculares (Barbosa y col., 1994 y Campos y col., 2000). El presente estudio empezó con una mutante de *P. aeruginosa* obtenida por Campos y col. en el 2000, la cual estaba afectada en su nivel de tolerancia y su capacidad de asimilar el etanol. La mutación fue encontrada en el gen *hscA*, el cual codifica la chaperona molecular HscA y que forma parte de un grupo de

genes denominados *isc*, encargados del ensamblaje de grupos Fe-S a proteínas que requieren de estos. A partir de esta mutante Villagomez (2002) en este laboratorio complementó estas mutantes con plásmidos que contenían el gen *hscA* (pKAV2 y pJC10), observando que se recuperaba su fenotipo de tolerancia y asimilación del etanol. Además transformó la cepa de *E. coli* etanológica KO11 observando un aumento en su nivel de tolerancia.

La finalidad de nuestro trabajo fue analizar más profundamente el efecto del gen *hscA* sobre el nivel de tolerancia a etanol y si éste tiene efecto sobre su producción. Por lo que el primer paso fue introducir una mutación en el gen *hscA* de la cepa de *E. coli* etanológica LY01, donde se obtuvieron las mutantes m6a y m3a las cuales mostraron un nivel de tolerancia a etanol inferior al que mostraba la cepa parental (LY01) (Figura 10), además de que presentaron deficiencias en su crecimiento en ausencia de etanol. Al respecto se sabe que mutantes en el gen *iscS* muestran defectos metabólicos (Skovran y col., 2000), los cuales se minimizan al adicionar vitaminas y aminoácidos al medio. Djaman y col. (2004) mostraron que mutantes en el gen *hscA* y *fdx* se comportan de manera similar a la mutante en el gen *iscS*. Estos resultados nos llevaban a concluir que la mutación en el gen *hscA* afectó el nivel de tolerancia de la cepa mutante, por lo que para el resto de los experimentos elegimos la mutante m6a.

Una vez que se seleccionó la mutante se procedió a transformar la cepa parental y la mutante con los plásmidos que contenían el gen *hscA*, los cuales fueron pKAV2 y pJC10 (Figuras 6 y 7). Para comprobar que las cepas transformadas tenían los plásmidos utilizados se realizó un corrimiento electroforético (Figura 11), lo que nos corroboró la presencia de los plásmidos en las cepas en estudio.

La forma de comprobar que un gen tiene dicha función o efecto sobre el organismo, a parte de la mutagénesis, es revertir la mutación transformando las mutantes con el gen silvestre. Por lo que al transformar la cepa mutante con los plásmidos pKAV2 y pJC10 esperábamos que se recuperará el fenotipo de tolerancia a etanol; esto quedó comprobado al realizar pruebas de tolerancia a etanol (Figura 12), al observar que el nivel de tolerancia a etanol es similar entre m6a/pKAV2, m6a/pJC10 y LY01, en cuanto a las cepas LY01/pKAV2 y LY01/pJC10 no mostraron diferencias en su nivel de tolerancia respecto a su

parental, y lo que respecta a m6a continuó manteniendo el nivel de tolerancia a etanol menor al que tiene la cepa LY01. Con esto podemos concluir que el producto del gen *hscA* tiene efectos en el nivel de tolerancia a etanol en las cepas etanológicas de *E. coli*.

Fue importante determinar si el efecto en el nivel de tolerancia era continuo o si era debido al tiempo en el que se realizaba la prueba de tolerancia, por lo que se realizaron curvas de crecimiento, las cuales nos permitieron observar diferencias en el comportamiento del crecimiento entre cada una de las cepas, y por otro lado pudimos calcular los tiempos de duplicación de cada cepa para compararlos y sacar conclusiones (tabla 5). En ausencia de etanol se observó que la mutante se comporta de manera diferente al crecimiento que presentó LY01, en cuanto a m6a/pKAV2 y m6a/pJC10 presentaron un mejor crecimiento con respecto a la cepa m6a; al calcular sus tiempos de duplicación se obtuvo un tiempo de duplicación similar al de la cepa LY01 (tabla 5). Hasta el momento los resultados obtenidos para estas cepas nos sugerían que la mutante transformada con los plásmidos que contiene el gen *hscA* minimizaron los defectos metabólicos. Lo que respecta a las cepas LY01/pKAV2 y LY01/pJC10 se comportaron de manera similar a la cepa LY01 (Figura 13-A), además de que los tiempos de duplicación fueron similares entre estas tres cepas (tabla 5), lo que nos indicó que los plásmidos no tuvieron efecto sobre su crecimiento.

El comportamiento de la cepa parental y las cepas transformadas con los plásmidos que llevan el gen *hscA* fue similar en presencia de etanol, al 1 y 3% (Figura 13-B y C), de igual forma el tiempo de duplicación que registraron éstas también fue similar (tabla 5). En cuanto al comportamiento que se observó en la mutante m6a fue diferente al del resto de las cepas, lo que nos indicó que la mutante crecía más lento las otras cepas en presencia de etanol (1 y 3%) (Figura 13B y C). Al comparar los tiempos de duplicación de cada una de las cepas en presencia de etanol (1 y 3%), se encontró que el tiempo de duplicación encontrada en la cepa m6a era mayor al que registraron el resto de las cepas; esto sugirió que la mutante crecía más lento. Para conocer si la diferencia en el tiempo de duplicación de las cepas era significativa se aplicaron los análisis estadístico de ANOVA y Tuckey, los resultados obtenidos no fueron significativos, es importante decir que esta diferencia en el

crecimiento de las cepas es valiosa, pues al querer utilizar estas cepas a nivel industrial y ser más lento en el crecimiento, hay una disminución en el rendimiento y un aumento en los costos de producción y esto nos lleva a preferir cepas con mejor crecimiento.

Las curvas de crecimiento realizadas no solo nos mostraron que el gen *hscA* se encuentra involucrado con el tiempo de duplicación, sino que además es otra forma de corroborar que también se encuentra involucrado con el nivel de tolerancia a etanol en las cepas de *E. coli* etanológicas.

Hasta el momento nos habíamos inclinado en el efecto que tendría la mutación del gen *hscA* sobre el nivel de tolerancia a etanol y crecimiento de las cepas, pero faltaba determinar éste efecto y el que causaría la sobreexpresión de éste gen sobre la producción de etanol. Para poder determinarlo se realizaron pruebas de fermentación; de estas se pudieron medir cuatro aspectos, tales como el crecimiento, el consumo de glucosa, el consumo de KOH (4N) y la producción de etanol. Cada uno de estos parámetros es de gran importancia, sobre todo si se trata de cepas de interés industrial. El crecimiento que presentó cada una de las cepas analizadas (Figura 14), en condiciones fermentativas, es decir, en condiciones anaeróbicas, nos refuerzan los resultados obtenidos en condiciones aeróbicas, en las pruebas de tolerancia y curvas de crecimiento; donde se observó un menor crecimiento de la cepa m6a y un crecimiento similar de las cepas transformadas con respecto a LY01. En cuanto al consumo de glucosa, se espera que sea dirigida principalmente hacia la producción de etanol. Se presentaron dos comportamientos en el consumo de glucosa (Figura 15), LY01, m6a y m6a/pKAV2 mostraron un consumo bifásico, probablemente debido a que utiliza la glucosa para el crecimiento celular y posteriormente para la obtención de productos de fermentación. Las cepas, LY01/pKAV2, LY01/pJC10 y m6a/pJC10, tuvieron un consumo de glucosa constante, esto debido, posiblemente, a que utiliza simultáneamente la glucosa para el crecimiento y la obtención de productos de fermentación.

El etanol no es el único producto de fermentación que es secretado al medio, también hay ácidos orgánicos producidos durante el proceso de fermentación; estos disminuyen el pH del medio y para mantenerlo es necesario adicionar bases, KOH (hidróxido de potasio) a una concentración 4N. Se utilizó el consumo de KOH como indicativo de producción y secreción de

ácidos orgánicos. Al graficar el consumo de KOH pudimos observar dos comportamientos (Figura 16). Las cepas LY01, m6a, m6a/pKAV2 y m6a/pJC10 consumieron una cantidad similar de KOH, mientras que las cepas LY01/pKAV2 y LY01/pJC10 consumieron cerca del doble de cantidad de KOH. Los resultados nos indicaron que la sobreexpresión del gen *hscA* tiene efectos sobre la producción de ácidos orgánicos.

Respecto a la producción de etanol se observaron dos comportamientos (Figura 17): las cepas LY01, LY01/pJC10 y m6a/pJC10, cuya curva de producción de etanol tiene un comportamiento similar entre ellas, podemos observar que al final de la prueba de fermentación encontramos una disminución en la cantidad de etanol, al respecto se sabe que la levadura *S. cereviceae* consume el etanol que produce después de cierto tiempo de fermentación, por lo que es probable que también suceda esto en nuestras cepas etanológicas de *E. coli* (Biosca y col., 2002). En lo que respecta al resto de las cepas (LY01/pKAV2, m6a y m6a/pKAV2) podemos decir que la curva de producción de etanol fue uniforme, en otras palabras, no mostró un consumo de etanol, esto puede ser debido a que la velocidad de producción de etanol presente en estas cepas es menor que el que presentaron LY01, LY01/pJC10 y m6a/pJC10. Pasando a la producción final de etanol tenemos que la mutante m6a produjo 15.4% menos etanol con respecto a la cepa LY01, mientras que la cepa m6a/pJC10 produjo 75% más etanol superando así la producción que obtuvo la cepa LY01 (tabla 6). De esto podemos concluir que la mutación en el gen *hscA* afectó también la producción de etanol.

De todos los datos obtenidos de las pruebas fermentativas se calcularon varios parámetros cinéticos (tabla 6), los cuales reforzaron los datos y propuestas sobre el efecto que la chaperona molecular HscA tiene sobre la producción de etanol. Así pues, las cepas que consumieron mayor cantidad de KOH tuvieron menor eficiencia en la producción de etanol, tal fue el caso de LY01/pKAV2 y LY01/pJC10, además de que la velocidad de consumo de glucosa fue menor a la cepa LY01. Otra de las cepas estudiadas fue m6a/pKAV2, la cual consumió una cantidad de KOH similar al que consumió LY01, una velocidad de consumo de glucosa también similar, y la producción de etanol y eficiencia de producción similares al de LY01.

Las cepas que fueron de mayor interés para nosotros fueron la m6a y m6a/pJC10. La mutante m6a reportó una velocidad de crecimiento menor al de la cepa parental, esto comprobó los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento, su velocidad de consumo de glucosa fue similar al de LY01, de igual forma el consumo de KOH, pero en cuanto a la producción de etanol y eficiencia fue menor al del resto de las cepas. La cepa más importante, obtenida en este estudio fue la cepa m6a/pJC10, la cual mostró una velocidad de crecimiento mayor al de la mutante m6a, la velocidad de consumo de glucosa fue menor al de m6a y LY01, un consumo de KOH similar al de LY01, lo que resultó de mayor importancia fue la producción de etanol, la cual fue mayor al de LY01, aumentando la eficiencia de producción de etanol cerca de un 20%, lo cual es excelente, si pensamos en obtener etanol con un medio más simple, lo que reduciría el costo de producción, alcanzando de esta manera una meta que es muy difícil de logran en cepas productoras de etanol.

Al encontrarse mutado el gen *hscA* se afectó la producción de etanol, pero al complementar la mutante se logró producir mayor cantidad de etanol, por lo tanto el producto del gen *hscA* puede encontrarse relacionado con las enzimas involucradas en el catabolismo de glucosa y la producción de etanol. En esta ruta existen al menos 11 enzimas, de las cuales alguna puede ser ensamblada por el mecanismo de ensamble de grupos Fe-S.

Una de las enzimas más importantes en la ruta de síntesis del etanol, en las cepas de *E. coli* etanologénicas, es la ADHII, proveniente de *Z. mobilis* (Ingram y col. 1989). Esta enzima se sabe es activada por hierro (Fe), pero no se tiene conocimiento del mecanismo por el cual es ensamblada, ni si requiere Fe o grupos Fe-S. Estas características hicieron de esta enzima un blanco perfecto para ser estudiado, así que el siguiente paso fue determinar la actividad enzimática de la ADHII. Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron que la actividad de la ADHII presentada en la cepa mutante fue 50% menor al de la ADHII presentada por la cepa LY01 (Figura 18). Otra de las cepas importantes que resultaron en este trabajo, m6a/pJC10, recuperó un 90% de la actividad de la ADHII. Con lo que pudimos concluir que la mutación en el gen *hscA* afectó la actividad de la ADHII presentada por la cepa mutante, probablemente debido a un mal plegamiento de la misma. En cuanto a los

resultados obtenidos con el resto de las cepas no fueron los esperados, y se requiere de más estudios para determinarlos.

Cuando se obtiene una mutante se espera que se pierda completamente su actividad, comportamiento que no se observó en muestra mutante, además de que no se pierde totalmente la actividad de enzimas dependientes de grupos Fe-S. Esto podría ser debido a un tercer grupo de genes relacionados con el ensamblaje de grupos Fe-S denominado *suf* y que ayuda a mantener cierta actividad, aunque no en la misma dimensión que cuando se encuentra completo y funcionando el grupo de genes *isc* (Takahashi y col., 2002).

Es sabido que las chaperonas moleculares cumplen varias funciones, no sólo se encargan del plegamiento de las proteínas, también pueden degradar proteínas mal plegadas, o bien puede renaturalizar o estabilizar las proteínas que se ven afectadas por alguna situación que las afecte. Uno de los factores que afecta a las proteínas es el calor. Sabiendo esto el siguiente paso fue probar la estabilidad térmica, en la tabla 7 se muestran las constantes de estabilidad ( $K_E$ ) de la enzima ADHII en cada una de las cepas, donde se tiene que la estabilidad de la ADHII presente en LY01/pKAV2 y LY01/pJC10 fueron mayores que la  $K_E$  presente en LY01. De acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad enzimática la m6a también mostró una disminución del 50% en la  $K_E$ , en cuanto a las cepas m6a/pKAV2 y m6a/pJC10, tiene mayor  $K_E$  que m6a. Lo que nos ayudó a concluir que el producto del gen *hscA* se encuentra involucrado en el mecanismo de la estabilización y ensamblaje de la enzima ADHII, por lo que probablemente contenga grupos Fe-S.

Hasta aquí se concluye que el producto del gen *hscA* se encuentra involucrado con el ensamblaje y estabilización de la ADHII, sin embargo, faltaba saber si este efecto también se presentaba en otras enzimas. Una técnica muy utilizada y que podía mostrar los efectos de la mutación o sobreexpresión del gen *hscA* es la electroforesis de proteínas de dos dimensiones, en la cual se observaron diferencias en el nivel de expresión de proteínas. Para el caso de la cepa de *E. coli* etanológica LY01 se analizaron tres de las cepas estudiadas, LY01, m6a y m6a/pJC10, así pudimos comparar el nivel de expresión de proteínas entre la cepa parental, la mutante y una de las mutantes complementadas. Efectivamente se observó una diferencia en el

nivel de expresión de proteínas de estas cepas (Figura 19). El nivel de expresión de algunas proteínas presentes en la cepa m6a fue menor que el de las mismas proteínas presentes en LY01, mientras que el nivel de expresión de proteínas en LY01 fue menor al encontrado en la cepa m6a/pJC10. En estudios realizados por Djaman (2004), demostró que la mutación del gen *hscA* en *E. coli* no afectaba la expresión de genes que codificaban proteínas que requieren grupos Fe-S, con lo que podemos concluir que la diferencia en el nivel de expresión de proteínas es debida al plegamiento de estas. Para nosotros fue importante localizar una banda de proteína, de aproximadamente 37 kDa, la cual tuvo menor nivel de expresión en la cepa m6a y una expresión semejante en m6a/pJC10, con respecto a la cepa LY01, debido a que es probable que sea la enzima ADHII, cuya masa es de aproximadamente 37 kDa. Esto reforzó los resultados obtenidos en la actividad enzimática, y nuestra conclusión sobre que el plegamiento de la ADHII puede ser realizada por la chaperona HscA.

Este mismo análisis se realizó para cepas de *E. coli* etanológicas KO11. Se compararon los geles de 2-D de KO11 y KO11/pJC10, en las cuales la cepa transformada con el plásmido pJC10 mostró mayor nivel de expresión de algunas proteínas que la cepa parental (Figura 20-A). Y entre la mutante (KO11:: *hscA*) mP y mP/pJC10 se encontró también una sobre expresión de algunas proteínas en mP/pJC10 (Figura 20-B).

Con estos resultados podemos concluir que el producto del gen *hscA* tiene efectos en el nivel de expresión de proteínas, las cuales pueden ser ensambladas por los productos del “cluster” de genes *isc*, entre los que se encuentra el gen, *hscA*, y probablemente alguna de ellas esté involucrada en la ruta de síntesis de etanol.

## VIII. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos podemos dar las siguientes conclusiones:

- ∞ La mutación del gen *hscA* disminuyó el nivel de tolerancia a etanol y la velocidad de crecimiento en la cepa etanológica LY01.
- ∞ La producción de etanol disminuyó (15 %) en la cepa mutante y aumentó al transformarse con pJC10 (75 %).
- ∞ La mutación del gen *hscA* disminuyó la actividad enzimática y la estabilidad de la ADHII en la cepa etanológica LY01.
- ∞ El producto del gen *hscA* tuvo efecto sobre el nivel de expresión de proteínas en las cepas recombinantes.

Cada una de las conclusiones nos ayudó a contestar nuestra hipótesis de forma afirmativa, con lo cual llegamos a un buen termino de nuestro trabajo.

**IX. BIBLIOGRAFIA**

- Alterthum**, F., and Ingram, L.O. **1989**. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 55:943-948.
- Barbosa**, M.F., Yomano, L.P. and Ingram, L.O. **1994**. Cloning, sequencing and expression of stress genes from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*: the *groESL* operon. Gene 148:51-57.
- Barham**, D. and Trnder, P. 1972. Analyst. 97:142.
- Beall**, S.D., Ohta, K., and Ingram, L.O. **1991**. Parametric studies of ethanol production from xilosa and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. Biotech. Bioeng. 38:296-303.
- Biosca**, J.A., Fernandez, M.R., LArroy, C., Gonzalez, E., y Parés, X. **2002**. Descripción y funciones metabólicas de las Alcohol Deshidrogenasas de *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos aspectos de ingeniería metabólica aplicados a la fabricación de cerveza. Cerveza y Malta. XXXIX (3), 155:27-38.
- Blaszczak**, A., Zylics, M., Georgopoulos, C. and Liberek, K. **1999**. Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^{32}$  factors assembled with RNA polymerase. EMBO J. 20:5085-5093.
- Campos-García**, J., Ordoñez, G.L. and Soberón-Chavez, G. **2000**. The *Pseudomonas aeruginosa hscA* gene encodes Hsc66, a DnaK homologue. Microbiology. 146:1429-1435.
- Carey**, V.C., and Ingram, L.O. **1983**. Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: Effects of ethanol and glucose. J. Bacteriol. 154:1291-1300.
- Conway**, T., Sewell, G.W., Osman, Y.A. and Ingram, L.O. **1987**. Cloning and sequencing of the Alcohol Dehydrogenase II Gene from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 169:2591-2597.
- Djaman**, O., Outten, F.W. and Imlay J.A. **2004**. Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 279(43):44590-44599. **Encarta**®, 2002. Biblioteca de Consulta Microsoft®. © 1993-2001 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.

- Farewell, A., Kvin, K., and Nystrom, T. 1998.** *uspB*, a new  $\sigma^S$ -regulated gene in *Escherichia coli* which is required for stationary-phase resistance to ethanol. J. Bacteriol. 180:6140-6147.
- Fried, V.A. and Novick, A. 1973.** Organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. 114:239-248.
- Frydman, J. and Hohfeld, J. 1997.** Chaperones get in touch: the chip-hop connection. TIBS Rev. 22:87-92
- Glazer, A.N. y Hiroshi, N. 1993.** Ethanol. Microbial Biotechnology. ASM Press. Washington D.C. pp. 359-391.
- Glick, R.B., and Pasternak, J.J. 1998.** Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. ASM Press. Washington D.C. pp. 1-106.
- Gragerov, A., Nudler, E., Kamissarova, N., Gaitanaris, G.A., Guttelman, M.E. and Nikiforov, V. 1992.** Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. Genetics 89:10341-10344.
- Gonzalez, R., Tao, H., Purvis, J.E., York, S.W., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. 2003.** Gene array-based identification of changes that contribute to ethanol tolerance in ethanologenic *Escherichia coli*: comparison of KO11 (parent) to LY01 (resistant mutant). Biotechnol. Prog. 19: 612-623.
- Gupta, R.S. and Goldin, G.B. 1993.** Evolution of *hsp70* gene and its implications regarding relationships between archaebacteria, eubacteria and eukaryotes. J. Mol. Evol. 37:573-582.
- Haejung, A. N., Scopes, R.K., Rodriguez, M., Keshav, K.F. and Ingram L.O. 1991.** Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. J. Bacteriol. 173:5975-5982.
- Herman, C. and D'Ari, R. 1998.** Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. Curr. Opin. Microbiol. 1:204-209.
- Hesterkamp, T. and Bakau, B. 1998.** Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E. coli*. EMBO J. 17:4818-4828.

- Hoff**, K.G., Silberg, J.J. and Vickery, L.E. **2000**. Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:7790-7795.
- Ingram**, L.O. **1976**. Adaptation of membrane lipids to alcohols. J. Bacteriol. 125: 670-678.
- Ingram**, L.O. and Vreeland, N.S. **1980**. Differential effects of ethanol and hexanol on the *Escherichia coli* cell envelope. J. Bacteriol. 144:481-488.
- Ingram**, L.O., Alterthum, F., y Conway, T. **1989**. Ethanol production by *Escherichia coli* strains co-expressing *Zymomonas pdc* and *adh* genes. U.S. Patent No. 5000000.
- Ingram**, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzama, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., and York, S.W. **1998**. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. Biotechnol. Bioeng. 58:204-214.
- Ingram**, L.O., Aldrich, H.C.,Borges, A.C., Causey, T.B., Martínez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yomano, L.P., York, S.W., Zaldivar, J., and Zhou, S. **1999**. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. Biotechnol. Prog. 15:855-866.
- Kawula**, T.H. and Lelivelt, M.J. **1994**. Mutations in a gene encoding a new Hsp70 suppress rapid DNA inversion and *bgl* activation, but not *proU* derepression, in *hns-1* mutant *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176:610-619.
- Kedzierska**, S. and Matuszewska, E. **2001**. The effect of co-overproduction of DnaK/DnaJ/GrpE and ClpB proteins on the removal of heat-aggregated proteins from *Escherichia coli* delta *cplb* mutant cells- new insight into the role of Hsp70 in functional cooperation with Hsp100. FEMS Microbiol. Lett. 204:355-360.
- Keiboom**, J., Dennis, J.J., Zylstra, G.J. and Jan A.M. de Bont. **1998**. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. J. Bacteriol. 180: 6769-6772.
- Kelley**, W.L. **1998**. The J- domain family and the recruitment of chaperone power. TIBS Rev. 23:222-227.
- Kosaric**, N., Vardar-Sukan, F. y Pieper, H.J. **2001**. The biotechnology of Ethanol. WILEY-VCH. Germany. Pp. 89-115.
- LéJohn**, H.B., Cameron, L.E., Yang, B., MacBeath, G., Barker, D.C. and Williams, S.A. **1994**. Cloning and analysis of a constitutive heat shock (cognate) protein 70 gene inducible by L-glutamine. J. Biol. Chem. 269:4513-4522.

- Lennox, E.S. 1975.** Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*. 1:190-200.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. 1991.** *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2874-2878.
- Macario, A.J.L., Lange, M., Ahring, B.K. and de Macario, E.C. 1999.** Stress genes and proteins in the archaea. *Microbiol. Mol.Biol.Rev.* 63:923-967.
- Mackenzie, F.K., Conway, T., Aldrich, and Ingram, L.O. 1989,** Expresión of *Zymomonas mobilis adhB-lacZ* operon fusions in recombinant *Z. mobilis*. *J. Bacteriol.* 171: 4577-4582.
- Martínez, J.A., Covarrubias, R.A., Gosset, L.G., López-Munguía, C.A. and Merino, P.E. 2000.** Biotecnología energética sustentable: uso de la diversidad genómica e ingeniería de vías metabólicas en la producción de etanol. Proyectos de investigación y desarrollo tecnológico en el campo de la biotecnología. Convocatoria CONACYT 2000.
- Moniruzzaman, M., Lai, X., York., and Ingram, L.O. 1997.** Isolation and molecular characterization of high-performance cellobiose-fermenting spontaneous mutants of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 containing the *Klebsiella oxytoca casAB* operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4633-44637.
- Morrison y Boyd, 1996.** Química orgánica. 5ª. Edición. ADDISON-WESLEY IBEROAMERICANA. U.S.A. pp. 621-625.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., y Pfaller, M.A. 2002.** Microbiología médica. 4a. Edición. Mosby-ELSEVIER SCIENCE. Pp. 11-14.
- Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.P., Shanmugam, K.T., and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:893-900.
- Osman, Y.A. and Ingram, L.O. 1985.** Mechanisms of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J. Bacteriol.* 164: 173-180.
- Parsell, D.A. and Lindquist, S. 1991.** The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27:437-496.
- Rodríguez, B.I.M. 1992.** Producción de alcohol por fermentación. Biotecnología HOY. CONACYT, México, D.F. pp. 83-96.

- Seaton**, B.L. and Vickery, L.E. **1994**. A gene encoding a DnaK/hsp70 homologue in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2066-2070.
- Silberg**, J.J., Hoff, G.K. y Vickery, E.L. **1998**. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing some isomers in a branched-chain dodecylbenzene sulfonate mixture. World J. Microbiol. Biotechnol. 12:367-372.
- Skovran**, E. and Downs D.M. **2000**. Metabolic defects caused by mutations in the *isc* gene cluster in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: implications for Thiamine synthesis. J. Bacteriol. 182:3896-3903.
- Smeds**, A., Varmanen, P., and Palva, A. **1998**. Molecular characterization of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*. J. Bacteriol. 180:6148-6153.
- Stryer**, L. **1993**. Bioquímica. Reverté. Pp.199-201.
- Suzuki**, C.K., Rep, M., Diji, J.M.V., Suda, K., Grivell, L.A. and Schatz, G. **1997**. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. TIBS Rev. 22:118-123.
- Takahashi**, Y. and Nakamura, M. **1999**. Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. J. Biochem. 126:917-926.
- Takahashi**, Y. and Tokumoto, U. **2002**. A third bacterial system for the assembly of Iron-Sulfur clusters with homologs in Archaea and Plastids. J. Biol. Chem. 277:28380-28383.
- Tao**,H., Gonzalez,R., Martínez, A., Rodríguez, M., Ingram, L.O., Preston, J.F.,and 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. J. Bacteriol. 183:2979-2988.
- Tokumoto**, U. and Takahashi, Y. **2001**. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. J. Biochem. 130:63-71.
- Vickery**, L.E.,Silberg, J.J. and Ta, D.T. **1997**. Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. Protein Sci. 6:1047-1056.
- Vigh**, L., Maresca, B. and Harwood, J.L. **1998**. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? TIBS. 23:369-373.

- Wild**, J., Kamath-Loeb, A., Ziegelhoffer, E., Lonetto, M., Kawasaki, I., and Gross, C.A. **1992**. Partial loss of function mutations in DnaK, The *Escherichia coli* homologue of the 70-Kda heat shock proteins, affect highly conserved amino acids implicated in ATP binding and hydrolysis. *Genetics* 89:7139-7143.
- Yehia**, A.O., and Ingram, L.O. **1985**. Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J. Bacteriol.* 164:173-180.
- Yura**, T., Kanemori, M., and Morita, T.M. **2000**. Bacterial stress responses. Editores G. Strorz y R. Hengge-Aronis. ASM Press, Washington, D.C. pp 3-39, 231-237, 393-399.
- Zaldivar**, J., Nielsen, J., and Olsson, L. **2001**. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:17-34.
- Zheng**, L., Cash, V.L., Flint, D.H. and Dean, D.R. **1998**. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273:13264-13272.
- Zhou**, s., Davis, F.C., and Ingram, L.O. **2001**. Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (*cely*) and CelZ (*celZ*) in ethanologenic *Klebsiella oxycota* P2. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:6-14.