

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

TITULO DE LA TESIS

Efecto de la interrupción del gen cromosomal *pfkA* sobre el crecimiento, esporulación y producción de ácidos orgánicos en *Bacillus subtilis*.

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

MARÍA ENRIQUETA MUÑOZ MÁRQUEZ

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2009.

RESUMEN de la tesis de **María Enriqueta Muñoz Márquez**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Agosto del 2009

Efecto de la interrupción del gen cromosomal *pfkA* sobre el crecimiento, esporulación y producción de ácidos orgánicos en *Bacillus subtilis*.

Resumen aprobado por:

Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Director de Tesis

RESUMEN

La enzima fosfofructocinasa (Pfk) juega un papel clave en la regulación del metabolismo de carbohidratos. Su actividad puede ser usada como un indicador del flujo glicolítico en un microorganismo. En este trabajo se clonó y caracterizó el gene *pfkA* de *Bacillus subtilis*, el cual codifica para la enzima fosfofructocinasa. Este gen fue inactivado por la inserción de un casete de resistencia a espectinomicina (*sp*) a nivel cromosomal en una cepa silvestre y en una cepa carente del sistema de fosfoenolpiruvato (PEP): fosfotransferasa de azúcares (PTS). Aunque el gen constitutivo *pykA* esta inmediatamente corriente abajo del gen *pfkA*, formando un operon, la actividad de piruvato cinasa no fue alterada en la mutante *pfkA*. La inactivación del gen *pfkA* mostró un fuerte impacto en el crecimiento de la cepa silvestre y la mutante en PTS, cuando fueron crecidas en medio mínimo Spizizen y medio de esporulación Schaeffer. La inactivación de *pfkA* también se reflejó en el porcentaje de esporulación de las cepas silvestre y mutante en PTS crecidas en medio de esporulación, así como en la producción de metabolitos secundarios (ácidos pirúvico, láctico y acético).

Palabras Clave: mutante fosfructocinasa, PTS, metabolismo del carbon, HPLC, GC/MS.

ABSTRACT of the thesis presented by **María Enriqueta Muñoz Márquez** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree with ORIENTATION IN MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México August of 2009

Effect of *pfkA* chromosomal interruption on growth, sporulation, and production of organic acids in *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

Phosphofructokinase (Pfk) plays a key role in the regulation of carbohydrate metabolism. Its activity can be used as an indicator of glycolytic flux in a microorganism. We have cloned and characterized the *pfkA* gene from *Bacillus subtilis*, which encodes the enzyme phosphofructokinase. This gene was insertionally inactivated at the chromosomal level in a wild type strain and in strains lacking the PTS:sugar phosphotransferase system (PTS). Although the constitutive *pykA* gene is immediately downstream of the *pfkA* gene, forming an operon, the pyruvate kinase activity was not altered in the *pfkA* mutant. The inactivation of the *pfkA* gene had a strong impact on the growth of the wild type strain and PTS mutants in Spizizen's minimal media and Schaeffer's sporulation media. Pfk inactivation was also reflected by the timing and percentage of sporulation of the wild type and PTS mutants in sporulation media as well as in the production of organic by-products (pyruvic, lactic, and acetic acids).

Palabras Clave: phosphofructokinase mutant, PTS, carbon metabolism, HPLC, GC/MS

Dedicatorias

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MI OTRO YO

Agradecimientos

A la Dra. Elizabeth Ponce Rivas, mi directora de tesis, por su paciencia, dedicación e inagotable capacidad de enseñanza.

A los miembros de mi Comité de Tesis: Dra. Rosa Mouriño, Dr. Helmut Maske, Dra. Beatriz Palmeros, por todo el apoyo recibido.

A IQ. Claudia Delgadillo, MC. Eduardo Morales, M.C. Jaime Altamirano, por su apoyo técnico.

A la Universidad Autónoma de Baja California, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada y FDA-NCTR.

A todos aquellos que sin ser mis amigos se portaron como el mejor de los hermanos.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	ix
I. Introducción	1
II. Antecedentes	
II.1 Fisiología y genética de <i>Bacillus subtilis</i>	4
II.1.1 Crecimiento.....	8
II.1.2 Adaptación.....	10
II.1.3 Desarrollo celular	13
II.2 Metabolismo general.....	17
II.2.1 Consideraciones generales.....	17
II.2.2 Nodo de fosfoenolpiruvato (PEP).....	21
II.2.2.1 Consideraciones generales.	21
II.2.3 Transporte activo de glucosa: El sistema de fosfoenolpiruvato (PEP): fosfotransferasa de azúcares (PTS).....	24
II.2.3.1 Mutantes en el sistema PTS.	26
II.2.4 Vía de Embden-Meyernhoff-Parnas (EMP) o vía glicolítica.....	29
II.2.4.1 Análisis del caso en estudio: Fosfofructocinasa.....	33
II.2.4.1.1 Generalidades.....	33
II.2.4.1.2 Características bioquímicas de las fosfofructocinasas.....	34
II.2.4.1.3 Mutantes en las fosfofructocinasas.....	35
II.2.5 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).....	35
II.2.6 Productos de la fermentación de glucosa.....	38
III. Justificación	42
IV. Hipótesis	43
V. Objetivos	
V.1 Objetivo general.....	44
V.1.1 Objetivos particulares.....	44
VI. Material y Métodos	
VI.1 Cepas bacterianas y vectores.....	45
VI.2 Análisis teórico del motivo (“motif”) de transcripción.	45
VI.3 Cultivos y preparación de muestras.	46
VI.4 Construcción de cepa mutante en <i>pts</i>	47
VI.5 Construcción de la mutación en <i>pfkA</i> por inserción de cassette de resistencia.....	47
VI.6 Amplificación por PCR.	49

CONTENIDO (continuación)

VI.7 Fermentación.	50
VI.8 Determinación de proteínas.	50
VI.9 Actividad enzimática de fosfofructocinasa.....	51
VI.10 Actividad enzimática de piruvato cinasa.....	52
VI.11 Determinación de ácidos orgánicos por HPLC.....	53
VI.12 Determinación de ácidos orgánicos por GC/MS.....	54
VI.13 Medición de esporas resistentes a calor.....	54
VI.14 Evaluación estadística de datos.....	55
VII. Resultados	
VII.1 Análisis teórico del motivo de transcripción.....	56
VII.2 Construcción de la mutante <i>pfk</i>	58
VII.4 Actividad enzimática.	61
VII.5 Caracterización de los cultivos.	62
VII.6 Determinación de la esporulación.	64
VII.7 Impacto de la mutación <i>pfkA</i> sobre la formación de ácidos orgánicos.	65
VIII. Discusión	70
IX. Conclusiones	78
X. Perspectivas	80
XI. Literatura citada	81
XII. Anexos	
XI.1 Lista de abreviaturas.....	97
XI.1.1 Vías metabólicas.....	97
XI.1.2 Enzimas.....	97
XI.1.3 Moléculas.....	98
XI.1.4 Diversos.....	98
XI.2 Medios de cultivo y soluciones.	99
XI.2.1 Medio Schaeffer.....	99
XI.2.2 Medio Mínimo Spizizien.....	99
XI.2.3 Medio Luria Bertani (LB)	100
XI.2.4 Medio MB.....	100
XI.2.5 Suplementos de medios de cultivo.....	100
XI.2.6 Buffer para esporas.....	101
XI.3 Reactivos para determinación de proteínas por el método de Lowry.....	101
XI.4 Fórmula para obtención de actividad enzimática total (AE)	101

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Esquema del ciclo de vida de <i>B. subtilis</i> .	14
2	Esquema de las principales actividades metabólicas (A) y biosintéticas (B) de <i>B. subtilis</i> .	20
3	Algunas de las vías del metabolismo que involucran PEP como sustrato.	23
4	Reacciones en general de la transferencia del grupo fosforilo catalizadas por las proteínas del PTS.	25
5	Principales mecanismos de regulación de la incorporación y metabolismo de carbohidratos en las bacterias Gram positivas.	28
6	Metabolismo central de carbohidratos.	30
7	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y vías relacionadas.	37
8	Vías de fermentación de <i>B. subtilis</i> .	40
9	Localización de sitios teóricos de transcripción.	57
10	Fragmento <i>pfkA pykA</i> clonado en el plásmido pE512.	59
11	Región del plásmido pDG1726	60
12	Obtención de la interrupción de <i>pfkA</i> en plásmido.	60
13	Obtención de la mutante <i>pfkA</i> cromosomal en fondo genético silvestre y <i>pts</i> .	61
14	Cinética de crecimiento.	63
15	Tiempos de retención de los ácidos carboxílicos por HPLC	65
16	Determinación de ácidos orgánicos por HPLC.	66
17	Tiempos de retención ión determinante de ácidos carboxílicos por GC/MS.	68
18	Determinación de ácidos orgánicos por GC/MS.	69

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Genes que codifican las enzimas del metabolismo central de carbohidratos (Figura 6).	31
II	Cepas y plásmidos.	46
III	Oligonucleótidos.	58
IV	t _{DS} y esporulación.	64

I. Introducción

La enzima fosfofructocinasa-1 (ATP: D-fructosa-6-fosfato 1 fosfotransferasa, Pfk-1, EC 2.7.1.11) cataliza la fosforilación de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), segundo paso del metabolismo central de carbohidratos (CH) por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). La Pfk, junto con la enzima piruvato cinasa (Pyk), juega un papel muy importante en el control del flujo de carbono a través de la vía glicolítica (Fraenkel, 1992). La Pfk ha sido estudiada ampliamente, tanto estructuralmente como funcionalmente, en *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* y *Bacillus stearothermophilus* (Kimmel y Reinhart, 2000; Emmerling *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2001;), pero en el caso de *B. subtilis* ha recibido muy poca atención.

Debido a sus propiedades en cultivo, *B. subtilis* ha sido usado comercialmente para la producción de algunas enzimas industriales, por ejemplo: α -amilasa, proteasa alcalina y β -glucanasa. En 1997, el genoma de *B. subtilis* fue secuenciado completamente (Kunst *et al.*, 1997); sin embargo, se ha visto poco progreso en el área del metaboloma bacteriano y su relación con el ambiente (Markuszewski *et al.*, 2003).

El mecanismo responsable de la regulación del flujo glicolítico y de las concentraciones de metabolitos intermediarios y cofactores es afectado por la concentración externa de azúcar (Fordyce *et al.*, 1984; Thompson, 1987; Garrigues *et al.*, 1997). En presencia de exceso de azúcar, la concentración de FBP, triosa-fosfato, piruvato (PYR) y la relación $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ es alta, mientras que las concentraciones de fosfoenolpiruvato (PEP) y fosfato inorgánico (Pi) son relativamente bajas. En contraste, cuando el azúcar es limitante el nivel de FBP decrece y el nivel de Pi incrementa (Fordyce *et al.*, 1984; Thompson, 1987), lo cual resulta en decremento de la actividad de Pyk e incremento en la concentración de PEP (Thompson, 1978; Mason *et al.*, 1981; Thompson y Torchia, 1984). Se ha propuesto que el “flux” glicolítico esta regulado a través del nivel de FBP (Thomas *et*

al., 1979), por el cual se activan Pyk y lactato deshidrogenasa (Ldh). Finalmente, PEP inhibe la actividad de Pfk (Fordyce, 1982), lo que proporciona un mecanismo para la regulación de la vía glicolítica. Algunos de los compuestos importantes producidos a partir del metabolismo del carbón en *B. subtilis* incluye lactato, acetato, butanodiol, aminoácidos y PYR. La utilización de ácidos orgánicos requiere la conversión de esos ácidos a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), gluconeogenesis y la vía de pentosas fosfato (PP) para obtener la energía y los precursores metabólicos necesarios para la célula (Schilling *et al.*, 2007).

Los microorganismos no pueden utilizar azúcares si no cuentan con un sistema de transporte eficiente de los mismos. En bacterias, el sistema de fosfoenolpiruvato (PEP): fosfotransferasa de azúcar (PTS, siglas en inglés de sugar phosphotransferase system) es un mecanismo eficiente para la translocación de carbohidratos dentro del citoplasma. En general PTS consiste de dos proteínas citoplásmicas, la enzima I (EI) codificada por *ptsI*, y la proteína termoestable (HPr) que es codificada por *ptsH*, la cual a su vez transfiere un grupo fosfato a partir de PEP al componente azúcar-específico del PTS, EII-azúcar (Postma *et al.*, 1993). Luego, estos elementos azúcar-específicos, median el transporte del azúcar y su concomitante fosforilación. Los elementos PTS también están involucrados en otras funciones importantes, tales como procesos generales de regulación de la represión por catabolito de carbón (CCR) (Saier, 1996; Stülke y Hillen, 2000; Titgemeyer y Hillen, 2002). También funcionan como un co-factor de la proteína A de control catabólico (CcpA), la cual forma un complejo de unión a ADN que reconoce secuencias específicas llamadas sitios *cre* (elementos de represión catabólica) presentes en las regiones del promotor o en la parte estructural de genes sujetos a represión o activación catabólica (Henkin *et al.*, 1991; Deutscher *et al.*, 1995; Ludwig *et al.*, 2001; Titgemeyer y Hillen, 2002).

A pesar de la relevancia de la enzima Pfk para el metabolismo del carbono, no se ha prestado mucha atención a su papel en el metabolismo, y el efecto de su inactivación en la fisiología de *B. subtilis*. Las mutantes en *pfk* de *B. subtilis* se han obtenido por mutagénesis

generalizada con etil metano sulfonato (Gay *et al.*, 1983), por experimentos de transducción y selección por auxotrofías (Fresse *et al.*, 1972; Gay y Delobbe, 1977). La presencia de mutaciones adicionales puede interferir con los efectos metabólicos y fisiológicos directamente relacionados a Pfk. En este estudio, el gen *pfkA* fue inactivado a nivel de cromosoma por inserción del gen de resistencia a *sp* en este locus en diferentes fondos genéticos. Las mutantes en Pfk y cepas control fueron evaluadas caracterizando el crecimiento y esporulación que presentaron en medio rico y medio mínimo suplementado con glucosa. La ausencia de la actividad de Pfk mostró un fuerte impacto en el crecimiento, esporulación y producción de ácidos orgánicos en *B. subtilis*.

II. Antecedentes

II.1 Fisiología y genética de *Bacillus subtilis*.

Las bacterias Gram-positivas constituyen uno de los grupos más diversos, entre los cuales se encuentran microorganismos aerobios, aerobios facultativos y anaerobios. El género *Bacillus* forma parte de éste grupo, constituido por bacterias con morfología tipo barra y formadoras de endosporas (Slepecky, 1992; Priest, 1993; Setlow, 1993). Las especies de este género se adaptan a condiciones nutricionales desfavorables, diferenciándose en una espora resistente al calor, desecación, radicación y solventes orgánicos, pudiendo sobrevivir en estado latente por años (Slepecky, 1992; Setlow, 1994). Esas esporas y los múltiples pasos del proceso por el cual se desarrollan han sido objeto de un estudio intenso, ambos como ejemplos de diferenciación celular (Burkholder y Giles, 1947; Anagnostopoulos y Spizizen, 1961; Schaeffer *et al.*, 1965), y debido a la necesidad de destruirlos en el procesamiento de alimentos y otros productos industriales que requieren estar estériles. La mayoría de los *Bacillus* han convertido a este género en uno de los más valiosos para la industria biotecnológica debido a su capacidad para crecer a altas temperaturas, a la ausencia de productos tóxicos y a su habilidad para producir y secretar grandes cantidades de proteínas, entre las cuales se encuentran la subtilisina, amilasa, levansacarasa, antibióticos y otros compuestos bioquímicos (Harwood, 1992; Pierce *et al.*, 1992; Ferrari *et al.*, 1993; Schallmeyer *et al.*, 2004).

El miembro más representativo de este género, *B. subtilis*, es una eubacteria ampliamente distribuida que habita principalmente en el suelo, aunque también se le encuentra en el aire, ríos, estuarios y es poco común encontrarla en humanos (Priest, 1989 y 1993). Es una bacteria "generalmente reconocida como segura" (de las siglas en inglés, GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos de América (Boer y Diderichsen, 1991; Harwood, 1992). Aunque existen algunos antecedentes que han demostrado problemas respiratorios, envenenamiento de alimentos y citotoxicidad *in*

vitro. Sin embargo, en general sus metabolitos no son considerados como toxinas para mamíferos (Salinas *et al.*, 2005; Stein 2005; Ostensvik *et al.*, 2004; Lindsay *et al.*, 2000; Rowan *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2002; Flindt, 1969). Una característica particularmente atractiva de ésta bacteria es que es usada para producir materiales diseñados para consumo humano (Priest, 1989).

Muchos estudios pioneros fueron realizados como una consecuencia de la demostración de su capacidad de tomar e incorporar ADN exógeno (Transformación) (Spizizen, 1958). Los avances en la tecnología del ADN recombinante (Mongkolsuk *et al.*, 1984; Ferrari y Hoch, 1989), el desarrollo de sistemas huésped/vector (Mountain, 1984), y sistemas de producción de proteínas heterólogas continúan en crecimiento (Wong, 1995; Valle y Ferrari, 1989). Esto ha hecho que *B. subtilis* y otros representantes del género tengan importancia tanto académica como comercial (Harwood, 1992; Slepecky, 1992; Wong, 1995; Schallmeyer *et al.*, 2004).

El uso de *B. subtilis* como un sistema experimental para el estudio del metabolismo, de la diferenciación celular y de mecanismos de regulación de genes, puede ser rastreado a tres líneas críticas de investigación. Investigadores como Burkholder y Giles (1947), expusieron a una cepa Marburg de *B. subtilis* a rayos X y luz ultravioleta (UV) y aislaron varias mutantes auxótrofas. Estas mutantes llegaron a ser básicas para el análisis bioquímico y genético de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, así como de otras vías, y han servido como herramienta en estudios detallados de la mecánica de la recombinación. Más tarde, Spizizen llevó a cabo experimentos de transformación de *B. subtilis* con ADN cromosomal (Spizizen, 1958), usando una de las cepas auxótrofas en triptofano (cepa 168). Anagnostopoulos y Spizizen (1961) siguieron los primeros experimentos exitosos para encontrar las condiciones óptimas de la eficiencia de transformación. Su método aún es usado virtualmente por todos los laboratorios que trabajan con *B. subtilis*. Inspirado por los hallazgos logrados por Anagnostopoulos y Spizizen, Hoch y Spizizen y más tarde Piggot y Coote, iniciaron el aislamiento y el mapeo de mutantes de *B. subtilis* que no esporulan (Anagnostopoulos y Spizizen, 1961; Hoch, 1971; Piggot y Coote, 1976).

Antoinette Ryter y Fitz-James, expertos en microscopía electrónica, establecieron la secuencia normal de esporulación relacionándola con los cambios morfológicos, y correlacionaron mutaciones particulares con bloqueos en estadios específicos en el desarrollo de la esporulación, por lo tanto inventaron un campo de búsqueda nuevo y lleno de información (Ryter *et al.*, 1966; Fitz-James y Young, 1969).

La habilidad de *B. subtilis* para esporular y la facilidad con la que este organismo se puede manipular genéticamente, ha servido durante muchos años como la justificación principal para fundamentar la investigación en *B. subtilis* en una era que estaba dominada por el trabajo en *E. coli* como el primer modelo bacteriano (Harwood y Archibald, 1990).

Con los años ha quedado claro que ninguna bacteria es un representante perfecto de todas las demás y que en eso, de manera mínima, las Gram-positivas son mejor representadas por *B. subtilis* que por cualquier organismo Gram-negativo. Esto se conoce como el paradigma de la fracción Gram-positiva del mundo microbiano, y ha reforzado la idea de que todas las especies tienen características importantes que las distinguen y que cada una debe ser confrontada en sus propios términos. Aún así, el análisis de conservación genética nos dice que los miembros de las clases de bacterias Gram-positivas bajas en G + C definen un grupo particular dentro de los organismos Gram-positivos. Es importante señalar que *B. subtilis* y *Staphylococcus aureus*, que morfológicamente parecen tan diferentes, están altamente relacionados a nivel de secuencias de proteínas y de regulación genética.

Para finales de los 1970s ya se contaba con el conocimiento definido y detallado de la fisiología de *B. subtilis* y la identificación de genes que codificaban para enzimas del metabolismo y del desarrollo. La invención de la tecnología del ADN recombinante sentó las bases para que se diera el segundo gran avance en nuestro entendimiento de este microorganismo. El descubrimiento de factores sigma alternativos de la RNA polimerasa, primero en *B. subtilis* (Talkington y Pero, 1978; Haldenwang y Losick, 1979) y luego en otros microorganismos, y los mecanismos interesantes por los cuales son activados (Losick y Stragier, 1992), así como la exploración de la información a cerca de los mecanismos de

regulación genética en respuesta a una multitud de retos ambientales han ayudando a mantener el campo de la biología de los procariotas a la vanguardia.

Una de la futuras direcciones claves de la fisiología microbiana será el análisis de las vías complejas de interconexión de regulación; tales vías han sido reconocidas y exploradas en *B. subtilis* por cerca de 20 años. Como la tecnología de secuenciación del ADN mejoró al punto de que genomas completos de organismos tan complejos como las bacterias fueran contemplados, era obvio que *B. subtilis* estuviera entre los primeros a ser analizados. Un esfuerzo internacional, fundado principalmente por el gobierno Japonés y por la Unión Económica Europea completó el proyecto en 1997 (Kunts *et al.*, 1997).

La genómica comparativa y la fisiología han revelado diferencias interesantes aún entre *B. subtilis*. Varios aislados de *B. subtilis* producen una cápsula de ácido poliglutámico (como *B. subtilis* Subs. *natto* (Nagai, 2000) y *B. subtilis* S317 (Kambourova *et al.*, 2001) o el antibiótico surfactina. La cepa de laboratorio *B. subtilis* 168 tiene los genes para la síntesis de la cápsula pero falla en la expresión de estos; la cepa 168 sintetiza al precursor de la surfactina pero carece del proceso de maduración final de la enzima. Aún está por entenderse como es que esta capacidad genética fue silenciada y porque la bacteria retiene estos genes. De los 4,107 genes que se piensa existen en el genoma de *B. subtilis*, cerca de 1,500 tienen funciones específicas definidas o deducidas y otros 1,000 han sido clasificados sin saber sus funciones específicas (Kunts *et al.*, 1997). Cerca de un cuarto del genoma de *B. subtilis* se predice que codifica para proteínas necesarias para la obtención de energía y procesos de biosíntesis. Esta predicción parece ser un subestimado, debido a que muchos de los genes de funciones actualmente desconocidas probablemente codifican para vías anabólicas y catabólicas aún no descubiertas. Otra gran fracción del genoma esta dedicada a la adaptación al estrés tanto físico como nutricional, dado la impresionante diversidad de ambientes en los cuales *B. subtilis* puede sobrevivir y desarrollarse.

El genoma de *B. subtilis* parece tener una sobreabundancia de cierto tipo de genes. Por ejemplo, hay cerca de 400 transportadores, de los cuales de 40 a 50 parecen ser del tipo

sistema de casete de unión a ATP, y más de 50 pueden ser bombas de eflujo que contribuyen a la resistencia a fármacos. *B. subtilis* no es conocido por utilizar un arreglo vasto de fuentes nutricionales, y generalmente es sensible a bajas concentraciones de la mayoría de los antibióticos. Uno puede identificar 36 histidina cinasas de dos componentes que se supone activan a 34 reguladores de respuesta. Solo 11 de esos reguladoras de respuesta tienen funciones conocidas. El número total de proteínas aparentemente reguladoras (como 200) parecen menos, dada la cantidad de genes que necesitan ser regulados (cerca de 1,500 operones). Por otro lado, varias proteínas reguladores tienen muchos blancos; y a su vez, la mayoría de los genes blanco están sujetos a múltiples formas de regulación (Kunts *et al.*, 1997).

La disponibilidad de la secuencia del genoma completo de *B. subtilis* ha cambiado las preguntas a ser contestadas y la forma de llegar a contestarlas. Como la secuencia de más y más genomas ha sido completada, llega a ser fácil la manera en que llegan a deducirse las funciones de cualquier gen dado. Sin embargo, la simple comparación de la estructura de un gen, su organización y regulación entre organismos relacionados o distantes, abre una ventana hacia la evolución. Los nuevos avances en fisiología celular hechos posible por la secuencia de genomas, han dado lugar a un gran avance en la citología bacteriana. El estudio de *B. subtilis* tanto en la era pregenómica como en la posgenómica ha reforzado nuestro sentido de que en este organismo han evolucionado mecanismos de síntesis y de regulación que son nuevos, sutiles e interesantes.

II.1.1 Crecimiento.

La designación en 1936 de la cepa Marburg como la cepa fenotipo de *B. subtilis* clarificó inicialmente la confusión entre *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. licheniformis*. Siguiendo los estudios de Gordon *et al.* (1973), *B. subtilis* se estableció como un taxón distinguible de *B. licheniformis*, especies cercanamente relacionadas que pertenecen al grupo II. A pesar de que *B. subtilis* es generalmente reconocido como aerobio, puede crecer y esporular lentamente bajo condiciones estrictamente anaerobias. Esto es, en un medio con glucosa y usando nitrato

como un aceptor terminal de electrones. Esta bacteria representa un estadio intermediario entre los anaerobios facultativos reales de las cepas del grupo I y los aerobios estrictos en los grupos III y IV. Esto se ve reflejado en la formación de ácidos a partir de algunos azúcares. Todas estas bacterias producen endosporas ovaladas que no hinchan a la célula madre y generalmente están localizadas en la parte central o subterminal de la célula (Priest, 1993).

B. subtilis es un quimio-organótrofo, que posee la habilidad de oxidar una variedad amplia de compuestos orgánicos simples y de crecimiento fácil esto es con tiempos de duplicación del orden de 20 minutos para cultivos crecidos en medios ricos y de cerca de una hora o más para el cultivo en medio mínimo a 37°C (Harwood y Archibald, 1990). Al contrario de bacterias como *E. coli* o *S. typhimurium* que pueden utilizar cerca de cien diferentes carbohidratos (azúcares, polioles y carboxilatos) como única fuente de carbono y energía, *B. subtilis* 168 solamente utiliza 20 carbohidratos. La aparente inferioridad, en parte puede ser debida, a la carencia de investigación, por ejemplo, mientras que *B. subtilis* 168 no puede crecer en galactosa o lactosa, si lo hace en xilosa o celobiosa, mientras que la cepa silvestre de *E. coli* K-12 no puede hacerlo (Lin, 1987). Además, *B. subtilis* tiene una habilidad altamente desarrollada para producir enzimas degradativas extracelulares. Al menos seis proteasas extracelulares le proporcionan la oportunidad de usar aminoácidos y péptidos cortos como fuentes de carbono. También secreta enzimas, no solo de gran importancia enzimática sino que también de alto valor biotecnológico. Entre estas enzimas esta la α -amilasa (*amyE*), pululanasa (*amyX*), endo- β -1,4-mananasa (*ydhT*), levanasa (*sacC*), glucano-1,4- α -maltohidrolasa (*yvdF*), pectato liasas (*pel*, *pelB*), β -1,3-1,4 endoglucanasa (*bglS*, *licS*), y endo-1,4- β -xilanasas (*xynA*, *xynD*), las cuales son secretadas al medio y permiten al organismo degradar polisacáridos en partes más pequeñas que subsecuentemente pueden ser internalizadas y metabolizadas.

Los siguientes carbohidratos parecen ser utilizados por *B. subtilis*: mono-, di- y oligosacáridos, aminoazúcares y sus N-acetil derivados, azúcares conteniendo ácidos opinas, glicónico, glicérico y glucorónico, y polialcoholes derivados de azúcares (lineales o

cíclicos). De algunos se conocen y de otros se presume cuales son sus transportadores específicos (Deutschener et al., 2002).

II.1.2 Adaptación

Al igual que todos los microorganismos, *B. subtilis* posee una versatilidad metabólica sorprendente. La mayoría de las bacterias pueden utilizar una gran variedad de fuentes de carbono y adaptan sus vías metabólicas para los cambios continuos a su alrededor, haciéndolas capaces de competir de manera eficaz con otros organismos en condiciones limitantes de nutrientes (Sonenshein, 1989; Hoch, 1993). Esta bacteria, como muchas otras células, tiene la capacidad de sentir el gradiente de concentración de nutrientes y se adapta a limitaciones de los mismos, cambios en la fuerza osmótica, condiciones de estrés y variaciones en la concentración de oxígeno. La producción y excreción de antibióticos presumiblemente sirven para limitar la competencia por los nutrientes con otros microorganismos, mientras que la excreción de varias enzimas les permite hidrolizar las fuentes nutricionales no degradadas previamente en unidades más fáciles de metabolizar (Pierce, 1992).

El estado de adaptación o de transición o de competencia, se refiere a la habilidad de *B. subtilis* para tomar y/o ser transformado genéticamente con ADN exógeno, lo cual puede fortalecer sus posibilidades de sobrevivencia ya sea como una consecuencia de la reparación del ADN, o por favorecer la variación genética. La quimiotaxis y el desarrollo asociado del flagelo facilitan la movilidad hacia los nutrientes. Muchas de las señales sensedas en su entorno, generan una respuesta que incluye la desrepresión de enzimas habilitándolas para incrementar las funciones catabólicas, la competencia, la quimiotaxis y la movilidad asociada, así como la producción de antibióticos y de varias enzimas hidrolíticas (Postma, 1987; Dubnau, 1991).

La desrepresión de enzimas requeridas para incrementar las funciones catabólicas, incluye las que participan en sistemas enzimáticos tales como el TCA y el sistema para la

utilización del nitrógeno, los cuales pueden rearmar la maquinaria enzimática de las células en adaptación capacitándolas para expandir su rango de sustratos metabolizables. La respuesta estricta es una reacción global a la privación de nutrientes que disminuye la síntesis de RNA, incrementa el cambio en proteínas y causa una variedad amplia de otros ajustes en el metabolismo celular (Hanson y Cox, 1967; Price y Gallart, 1983; Freese y Heinze, 1983; Fisher, 1999).

La línea divisoria entre la adaptación y el desarrollo hacia endosporas es confusa, en el mejor de los casos debería ser considerada como una continuación de la respuesta celular o mecanismos directos al escape, tanto de la privación de nutrientes como de la esporulación. Por ello es que el interés en la explotación de la respuesta normal de *B. subtilis*, lleva a considerar el período de adaptación como una ventana crítica para la productividad, debido a que durante este período y en el desarrollo inicial es en donde son elaborados la mayoría de los productos (Priest, 1977 y 1989).

Cuando una célula microbiana agota alguno o todos sus nutrientes disponibles durante su crecimiento y comienza a entrar a fase estacionaria, aparecen ciertos factores de estrés. En los bacilos, así como en algunas otras bacterias, hongos y eucariontes inferiores, una respuesta a dicho estrés acumulado es la formación de una spora latente. En adición a proteínas necesarias para la iniciación de este programa complejo de desarrollo, ciertas proteínas nuevas, las cuales no son necesarias para la esporulación, son también sintetizadas en ese momento. Muchas de estas proteínas son enzimas degradativas, las cuales aparentemente son un intento por parte de la célula para sondear todas las fuentes disponibles de energía y metabolitos en el medio circundante. Además de la síntesis de estas enzimas degradativas, tales como levansacarasa, alfa-amilasa y las diferentes proteasas, algunas otras funciones que son expresadas por *B. subtilis* a este tiempo incluyen el desarrollo de competencia para la asimilación de moléculas de ADN, la producción de antibióticos, la síntesis de flagelos y la inducción total del TCA (el cual normalmente no puede funcionar completamente durante el crecimiento vegetativo de este microorganismo). Se conocen al menos nueve genes *abrB*, *hpr*, *sin*, *degU*, *degS*, *degR*, *degQ*, *senS* y *pai*, que

tienen efectos pleiotrópicos sobre la síntesis de muchas de estas proteínas. Debido a que dichos genes reguladores controlan funciones que son expresadas durante el estado de transición entre el crecimiento vegetativo y el encendido de la fase estacionaria y esporulación, se ha acuñado el término “reguladores del estado de transición” para describirlos (Perego *et al.*, 1988).

Para propósitos prácticos, la presencia de proteasas ha hecho difícil el uso de *B. subtilis* como sistema hospedero para expresar y secretar proteínas foráneas al medio de crecimiento. Si bien la presencia de tres proteasas extracelulares relativamente mayoritarias se conoce desde hace muchos años, también se sabe la existencia de proteasas minoritarias las cuales parecen ser muy activas, ya que pueden degradar proteínas eucariotas efectivamente (He *et al.*, 1991). Actualmente se conocen siete proteasas en *B. subtilis*, las cuales caen dentro de dos grandes categorías: las serinproteasas (que comprenden a las proteasas AprE o subtilisina, Epr, Bpf, Isp-1 e Isp-2) y las metaloproteasas (que incluyen a las proteasas NprE o proteasa neutra y Mpr). Todas las proteasas conocidas son expresadas principalmente durante el inicio de la fase estacionaria y, al igual que sucede para otras enzimas degradativas, se conoce que están bajo control de la misma familia de genes reguladores. Respecto al papel fisiológico de las proteasas, el panorama no está del todo claro; se ha postulado que las proteasas extracelulares tienen importancia en la regulación del recambio de la pared celular (Jolliffe *et al.*, 1981), en la esporulación y la eliminación de enzimas (Priest, 1977). A su vez, se ha sugerido que las proteasas intracelulares funcionan en el procesamiento de proteínas y su recambio, ambos eventos importantes previos a la esporulación (Maurizi y Switzer, 1980). No obstante el avance reciente, la elucidación de genes codificadores para proteasas permanece como un reto para los biólogos moleculares que trabajan con *Bacillus*, pues resulta muy interesante y sorprendente a la vez que existan gran número de genes que codifican para estas proteasas, así como la forma compleja en que su expresión está regulada (Valle y Ferrari, 1989). Dado que la delección de genes codificadores para proteasas parece no afectar el crecimiento ni la esporulación, estos genes parecen ser no esenciales. Sin embargo, queda como paradigma elucidar por qué entonces se encuentran proteasas en gran número, la manera cuidadosa en

que su expresión esta regulada en la naturaleza y como el organismo ha logrado que la pérdida de una o más proteasas no afecte apreciablemente la fisiología celular.

II.1.3 Desarrollo celular

La diferenciación de *B. subtilis* en una endospora latente ocasionada por la privación de nutrientes sirve como un paradigma en el estudio de eventos del desarrollo celular en la biología moderna (Losick y Stragier, 1992). Esto ha ocasionado que se cuente con una descripción detallada de la iniciación (Schaeffer *et al.*, 1965; Grossman, 1991; Errington, 1993), la bioquímica (Setlow, 1981; Freese y Heinze, 1983) y la genética (Losick *et al.*, 1986) de la esporulación. En comparación, la literatura sobre la fisiología y la bioquímica desafortunadamente esta estancada, por lo general este tipo de investigación ha sido por mucho tiempo suplantada por las investigaciones genéticas.

Las células vegetativas de *B. subtilis* septan y se dividen centralmente para producir dos células más o menos idénticas (septación simétrica). Por el contrario, el período inicial de esporulación comprende una forma modificada de división celular donde el proceso de septación ocurre lo más cercano a uno de los polos de la célula (septación asimétrica). El proceso de esporulación, como se aprecia en la Figura 1 se ha dividido en siete estadios basados en los cambios citológicos que ocurren durante la formación de la spora (Ryter *et al.*, 1966). Los estadios son identificados usando la numeración Romana. Cuando *Bacillus* es cultivado en un medio rico, el proceso de esporulación usualmente requiere de 6 a 8 horas (Schaeffer *et al.*, 1965), así que el estadio de desarrollo es aproximadamente equivalente al tiempo en horas después del final del crecimiento (Strauch y Hoch, 1992).

Entre el estadio 0 y el estadio II (o el III) se llevan a cabo muchas de las respuestas adaptativas, señaladas anteriormente, como medidas de evasión del proceso de esporulación. Si estas estrategias se unen de manera eficiente, entonces se resume el suceso final del crecimiento vegetativo; de otra manera, el desarrollo continuará. Durante la

transición del estadio II al estadio III (T2 a T3), la célula madre, engulle a la preespora para formar lo que esencialmente es una célula dentro de una célula. El estadio III generalmente es considerado como el estadio donde ocurre el compromiso con el proceso de esporulación, de ahí que el enriquecimiento del medio de cultivo en este punto no revierte el proceso de esporulación (Freese *et al.*, 1970).

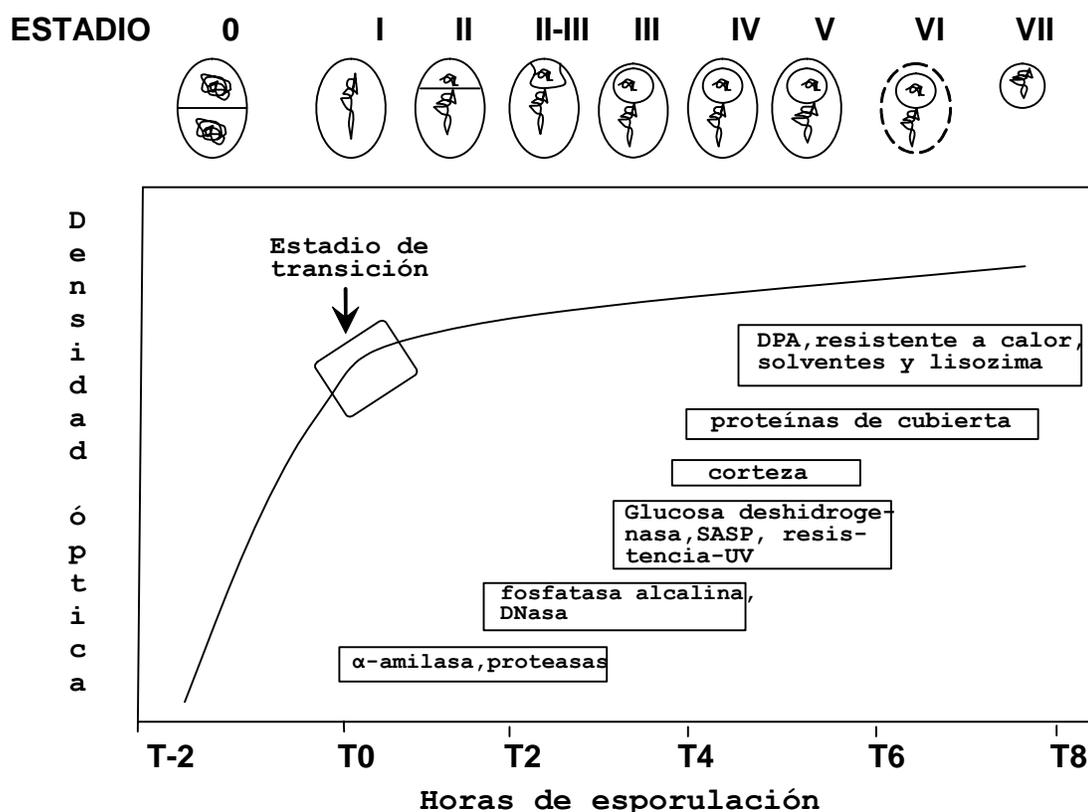


Figura 1. Tiempo idealizado del transcurso de la esporulación de *B. subtilis* a 37°C. El inicio de la esporulación en este sistema es definido como el final del crecimiento exponencial (flecha). Estadios morfológicos de la esporulación en el tiempo de su ocurrencia, están esquemáticamente indicados arriba de la grafica. El tiempo y la duración aproximada de los eventos bioquímicos y fisiológicos están indicados en las cajas dentro de la grafica. Modificado de Nicholson y Setlow (1990).

La designación T0, T1, etc. (Figura 1), se refiere al tiempo en el cual han transcurrido dichos cambios. El inicio de la fase estacionaria del cultivo o del proceso de esporulación se conoce como T0. T2 o estadio II se define como la formación asimétrica del septo, de

manera que cada compartimiento recibe un complemento total de ADN (Errington y Wake, 1991). A partir del estadio III en ambos compartimentos, el de la célula madre y el de la preespora en desarrollo (Losick y Stragier, 1992), la expresión genética ocurre por separado tanto en tiempo como en espacio. En el estadio IV inicia el primordio de la pared celular de la espora y la formación de la corteza. Los cambios en las siguientes etapas se resumen a continuación: estadio V, deposición de la cubierta de la espora; estadio VI, maduración de la corteza y de la cubierta; estadio VII, culminación del proceso de esporulación con la liberación de la espora madura por lisis de la célula madre y liberación de una espora resistente a calor, químicos y radiación (Fitz-James y Young, 1969; Freese y Heinze, 1983) la cual permanece en estado latente hasta que las condiciones nutricionales sean favorables nuevamente, estimulando así la germinación (Foster y Johnstone, 1990) y el crecimiento.

La iniciación de la esporulación es compleja y se conocen al menos tres tipos de señales que se interrelacionan:

- a) Señales nutricionales. La limitación nutricional de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo pueden inducir la esporulación; buenas fuentes de carbono como la glucosa, la reprimen. Se ha demostrado que la concentración intracelular de GTP (o GDP) probablemente representa el efector clave de la señal nutricional. Sin embargo, aún se desconoce como es sensada por la célula la concentración de GTP y como se transmite la señal al aparato transcripcional (Freese y Heinze, 1983; Sonenshein, 1989; Fisher, 1999; Strauch y Hoch 1992).
- b) Densidad de población. Grossman y Losick (1988) observaron que la esporulación no puede inducirse eficientemente en células mantenidas a baja densidad de población. Sin embargo, una esporulación eficiente se obtuvo cuando las células se resuspendieron a baja densidad en medio previamente condicionado por el crecimiento de células a alta densidad. El efecto no se debió al agotamiento de un factor esencial de crecimiento sino a la producción de sustancias, posiblemente oligopéptidos, que son necesarios para una esporulación eficiente. Se conoce poco acerca de la naturaleza de dichos factores y menos aún de como es sensada e interpreta su presencia (Waldburger *et al.*, 1993).
- c) Ciclo celular. En su etapa más temprana, como ya se ha mencionado, la esporulación

claramente comprende una división celular modificada. También en este caso, a pesar de que la relación entre el ciclo celular y el inicio de la esporulación esta bien establecido, la manera en que la célula monitorea el desarrollo del ciclo celular y transmite esta información al aparato de transcripción permanece sin esclarecerse completamente (Clarke y Mandelstam, 1980; Hitchins, 1978; Kunkel, 1991).

En este sentido, se considera que, en general, la esporulación es una confluencia de vías que son seleccionadas por una célula que ha percibido cambios en el medio ambiente y ha dado entrada a una multitud de respuestas de regulación. Las condiciones usadas para la esporulación son condiciones de reducción metabólica y de privación de nutrientes, lo cual conduce a la inducción de una variedad de enzimas que son relevantes para el cambio en el medio nutricional de la célula, pero no necesariamente involucrados con la esporulación. El estudio de los cambios inmediatos en las células fue grandemente dominado por dos observaciones: la primera fue el descubrimiento de que el ciclo de TCA tiene que ser inducido con el fin de permitir la esporulación, y el segundo fue la observación de la conversión al inicio de la esporulación (Schaeffer *et al.*, 1965; Keynan y Sandler, 1983; Sonenshein, 1989)

La esporulación es parte de un programa complejo de desarrollo y diferenciación celular que resulta en la formación de una estructura altamente resistente denominada espora. La formación de esta estructura es un ejemplo extremo de la adaptación de *Bacillus* al medio e involucra a más de 80 genes diferentes (Kunkel, 1991). Los *loci spo* se denominaron de acuerdo al estado en el cual mutaciones en el *locus* bloquean la esporulación. Así *spo0*, *spoII*, *spoIII*, etc., indican que las mutaciones permitían llegar hasta el estado cero, dos y tres respectivamente, pero no más allá (Errington, 1993).

La proteína Spo0A, que pertenece a una familia de proteínas bacterianas llamada reguladores de respuesta, juega un papel central en el inicio de la esporulación. El gene *spo0A* es transcrito a partir de dos promotores, Pv y Ps. Pv es reconocido por el factor de transcripción E sigma A y aparentemente proporciona un nivel basal de Spo0A en células vegetativas. Ps es controlado por el factor de transcripción E sigma H lo cual resulta en un incremento súbito de Spo0A al inicio de la esporulación (Chibazakura *et al.*, 1991). Spo0A

regula negativamente a varios genes, principalmente *abrB*. La regulación positiva de Spo0A es responsable de la activación de ciertos genes específicos de esporulación como los operones de *spoIIA*, *spoIIG* y *spoIIIE* (Perego y Hoch, 1988; Perego *et al.*, 1991; Strauch y Hoch, 1992).

La fosforilación de Spo0A es la clave en el control del inicio de la esporulación. El fosfato es transferido a Spo0A por un mecanismo complejo involucrando histidina-proteína-cinasas y al menos dos acarreadores de fosfato se acetilan como intermediarios. Las interacciones entre los distintos participantes ya han sido reproducidas *in vitro*. Al menos dos histidina-proteína-cinasas codificadas por los genes *kinA* y *kinB* pueden transferir el fosfato a la proteína Spo0F, la cual a su vez transfiere su fosfato a un segundo acarreador, Spo0R. La proteína Spo0R es el donador directo del fosfato a Spo0A. Esta intrincada vía permite que el nivel de Spo0A sea controlado mediante sensores ambientales tanto internos como externos. En apoyo a esta idea, se ha demostrado que las cinasas KinA y KinB pueden responder a diferentes señales. Existen además otras proteínas involucradas en este sistema, denominado de fosforelevos, como son Spo0E y Spo0K pero su blanco preciso no se ha determinado. La elucidación del sistema de fosforelevos ha sido un logro importante puesto que la existencia de varias proteínas que actúan vía este sistema muestra en principio como la información proveniente de muchas fuentes diferentes puede ser integrada para determinar la elección entre proliferación y diferenciación. Sin duda, el conocimiento de este sistema puede tener consecuencias importantes cuando se piensa en las vías por las cuales se efectúan decisiones similares en organismos superiores (Burbulys *et al.*, 1991; Grossman, 1991).

II.2 Metabolismo general

II.2.1 Consideraciones generales

En animales superiores, los métodos tradicionales para la identificación de enzimas reguladoras y la determinación de su papel en la regulación de una vía metabólica incluyen diferentes enfoques. Estos pueden ser: a) la determinación de las cantidades a utilizar de

compuestos específicos con substratos e intermediarios marcados isotópicamente; b) medición de la concentración de los substratos; c) productos y efectores alostéricos de la posible enzima reguladora en un sistema intacto; d) uso de inhibidores enzimáticos específicos; y e) el análisis de las propiedades cinéticas de la enzima purificada. Dichos enfoques han conducido a un entendimiento significativo de muchos fenómenos reguladores.

A pesar de la abundancia de información acerca de las vías metabólicas y su regulación en vertebrados homeotérmicos, la mayoría de nuestro entendimiento al respecto está basado en la evidencia correlativa y no definitiva de lo que realmente pasa en la naturaleza. En este sentido es que la genética y la ingeniería genética en modelos procariontes han sido una herramienta poderosa para el establecimiento definitivo de la relación causa-efecto entre los mecanismos moleculares que regulan la actividad enzimática y el flujo de intermediarios a través de las vías metabólicas.

El estudio del metabolismo central de carbono en los microorganismos es de suma importancia, ya que a través de éste las células obtienen todos los esqueletos de carbono necesarios para la biosíntesis. Aunque las vías metabólicas centrales han sido dilucidadas casi completamente, aún falta mucho por conocer sobre su regulación. La meta final en un análisis de la regulación metabólica es determinar las bases moleculares de los eventos fisiológicos. Esta meta, requiere de un ambiente fisiológico para conducir el análisis y los métodos para establecer la relación de causa y efecto entre los efectores intra y extracelulares, los cambios moleculares en enzimas claves, y la alteración del flujo de metabolitos hacia vías del metabolismo intermediario.

Una de las metas más importantes de los biólogos es entender como trabajan las macromoléculas biológicas, con el objetivo práctico de crear nuevas actividades o especificidades. Los sistemas bacterianos involucrados en el metabolismo periférico (por ejemplo, catabolismo de carbohidratos, aminoácidos o nucleósidos; biosíntesis de compuestos secundarios y antibióticos; resistencia a antibióticos; u otros procesos de

desintoxicación) ofrece una fuente natural rica y accesible de genes y actividades catalíticas. El estudio de esos sistemas nos ayudará a definir dominios de proteínas involucrados en la unión al ADN, nucleótidos, coenzimas, etc., para entender y luego modificar propiedades de proteínas. Aun cuando los productos de los genes involucrados en una vía común están relacionados con los de muchas bacterias diferentes, es frecuente que la organización de los genes sea especie específica. Esta variabilidad, una característica general de todos los regulones del metabolismo periférico, contrastan fuertemente con la organización altamente conservada de operones relacionados con funciones esenciales. Los genes involucrados en el metabolismo periférico constituyen un subgrupo dinámico en el genoma bacteriano y pueden, por lo tanto, ser particularmente informativos para estudios de evolución (Deutscher *et al.*, 2002).

La mayoría de las bacterias, incluyendo *B. subtilis*, pueden utilizar una gran variedad de fuentes de carbono adaptando sus vías metabólicas para los continuos cambios a su alrededor, haciéndolas capaces de competir de manera eficaz con otros microorganismos. Como parte de una elaborada red de señales de transducción, *B. subtilis* puede expresar algunos regulones de manera temporal (Figura 2A). La mayoría de ellos son expresados durante o después de la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria del crecimiento. Muchas de las señales sensadas en su entorno, generan una respuesta que puede involucrar cambios en la síntesis de proteínas, en la regulación de la actividad enzimática, en movilidad y otros procesos (Figura 2B) (Postma, 1987; Fisher y Sonenshein, 1991; Steinmetz, 1993; Strauch y Hoch, 1992).

El metabolismo central de *B. subtilis* incluye: la vía de EMP, el TCA y de PP, que oxida glucosa 6-P a CO₂. También incluye a las vías anapleróticas que involucran reacciones de conexión entre vías, reacciones de flujo reverso y reacciones de relleno de pozas de metabolitos precursores que son utilizados para la biosíntesis (Neidhardt *et al.*, 1990). Aparentemente la vía central de Entner-Doudoroff (ED) inducible, por medio de la cual se metaboliza el gluconato, no está presente en *B. subtilis* (Klier y Rapoport, 1988). No posee

la vía del glioxilato, pero usa la piruvato carboxilasa y la enzima málica (Figura 6) para catalizar las reacciones anapleróticas para el TCA (Fortnagel, 1993; Hederstedt, 1993).

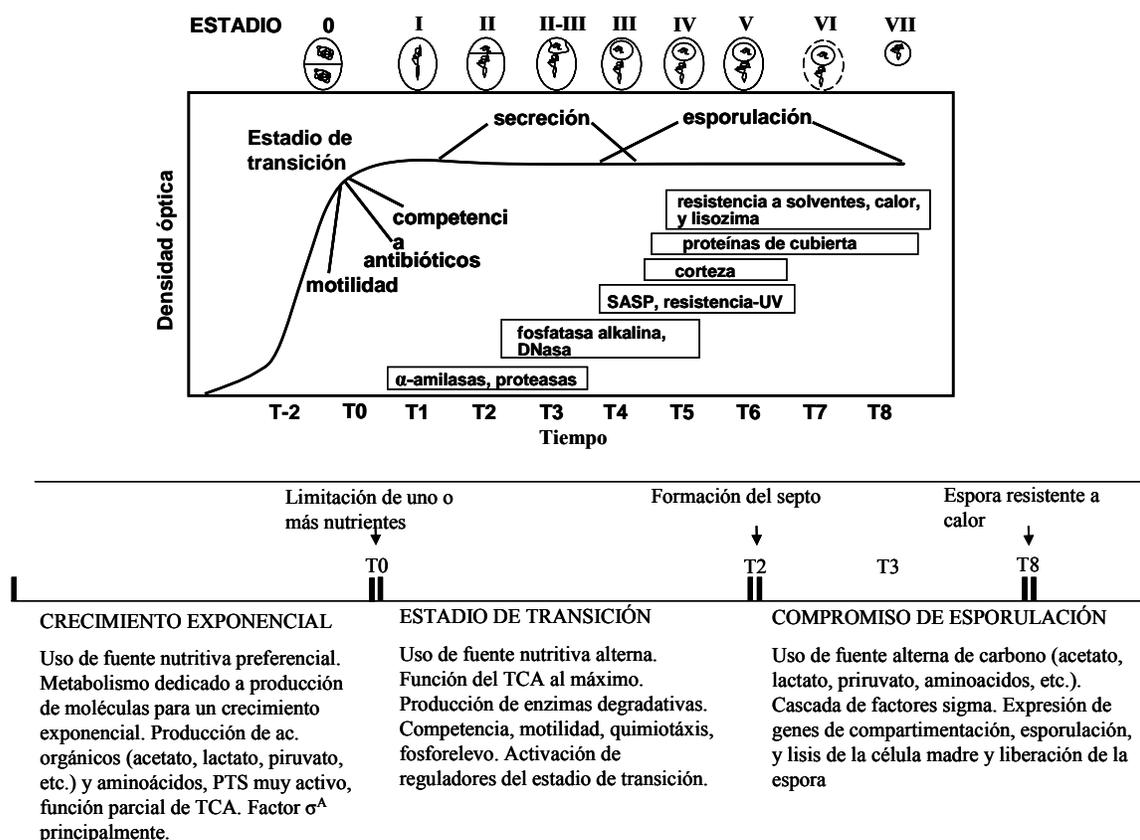


Figura 2. Esquema de las principales actividades metabólicas (A) y biosintéticas (B) de *Bacillus subtilis*.

Estas vías proveen a las células de los doce metabolitos precursores a partir de los cuales se sintetizan los 75-100 bloques primarios, coenzimas y grupos prostéticos por reacciones que emplean energía, poder reductor y fuentes de nitrógeno, azufre y unidades de carbono (Neidhardt *et al.*, 1990).

La regulación metabólica es un término usado para describir los fenómenos involucrados en el control del uso de energía a través de las vías del metabolismo intermediario. Sobre las bases de las propiedades cinéticas de enzimas reguladoras y/o los mecanismos que regulan sus concentraciones. Sobre un nivel fisiológico, involucra la identificación del

medio ambiente y de agentes extracelulares que regulen el flujo de intermediarios a través de vías específicas. A nivel molecular, le corresponde: 1) la identificación de la cantidad de enzimas control; 2) el análisis de las propiedades cinéticas de las enzimas reguladoras, y 3) el análisis de los mecanismos que controlan la concentración de tales enzimas.

El estudio de genes del metabolismo central en *B. subtilis* es de gran interés ya que a diferencia de *E. coli*, como se muestra en la Figura 2, durante la fase estacionaria es capaz de tener gran actividad metabólica y biosintética, que da lugar a la formación de una spora viable. En general, aún cuando los mecanismos involucrados se desconocen, la esporulación puede ser iniciada por una inhibición parcial de la síntesis de nucleótidos de guanina (Freese y Heinze, 1983). Aunque, los diferentes métodos de reducción del contenido de GTP inducen que no más de la mitad de las células esporulen, sugiriendo que otros factores y/o señales están también involucrados (Sonenshein, 1989). La esporulación normalmente resulta a partir de una disminución del crecimiento en un medio nutritivo, o como una respuesta estricta. En la última, el déficit de un amino ácido causa la producción de nucleótidos de guanina altamente fosforilados, los cuales sirven como una señal potente para la diferenciación. Tres de las respuestas inducidas más importantes son la disminución de RNA y síntesis de proteínas, síntesis de proteasas intracelulares y extracelulares, y el inicio de hidrólisis intensa (cambio) de proteínas intracelulares (Freese y Heinze, 1983).

II.2.2 Nodo de fosfoenolpiruvato (PEP).

II.2.2.1 Consideraciones generales.

El nodo de PEP es de importancia vital para la fisiología general de *B. subtilis* y prácticamente para todos los sistemas biológicos. PEP es uno de los precursores metabólicos, además de que varios otros precursores se derivan directamente de PEP (Figuras 3 y 6). PEP es importante para la fisiología celular, debido a que es precursor en la biosíntesis de diferentes compuestos esenciales como: aminoácidos aromáticos, vitaminas y neurotransmisores. En plantas, la carboxilación de PEP por la enzima fosfoenolpiruvato

carboxilasa (Ppc) para producir oxaloacetato, es el primer paso en la reacción de fijación biológica de CO₂. Las plantas que fijan CO₂, a partir de PEP, se denominan plantas C₄. Existe otro tipo de fijación biológica de CO₂, donde la molécula final de este proceso es gliceraldehído 3-fosfato (G3P), una molécula de tres carbonos, las plantas que fijan CO₂ por este proceso se denominan plantas C₃. En plantas C₄, la carboxilación de PEP por Ppc sólo cumple funciones como una vía anaplerótica, reemplazando el carbono tomado de TCA para funciones energéticas y de biosíntesis, como funciona en bacterias (ver sección II.2.5 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)).

PEP es sustrato de reacciones muy diversas, algunas de ellas revisten importancia particular para la biotecnología, debido a que forman parte de las vías metabólicas que dirigen la producción de metabolitos de interés. Por lo anterior, la manipulación del metabolismo a nivel del nodo de PEP ha sido sujeto de estudios diversos para lograr la redistribución de los mismos con el fin de aumentar la conversión de PEP en aminoácidos, solventes orgánicos como etanol y otros productos de fermentación, entre otros. Las vías relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos se consideran “rígidas” con respecto a la disponibilidad de PEP, debido principalmente a la inhibición alostérica por producto final de las primeras enzimas de la vía en particular. Por el contrario, otras enzimas participantes en el nodo de PEP, principalmente las piruvato cinasas (Pyk), presentan una regulación distinta y se comportan como “flexibles” a la modificación en la concentración de PEP o a las modificaciones en otros flujos que forman parte del nodo de PEP (Stephanopoulos *et al.*, 1998).

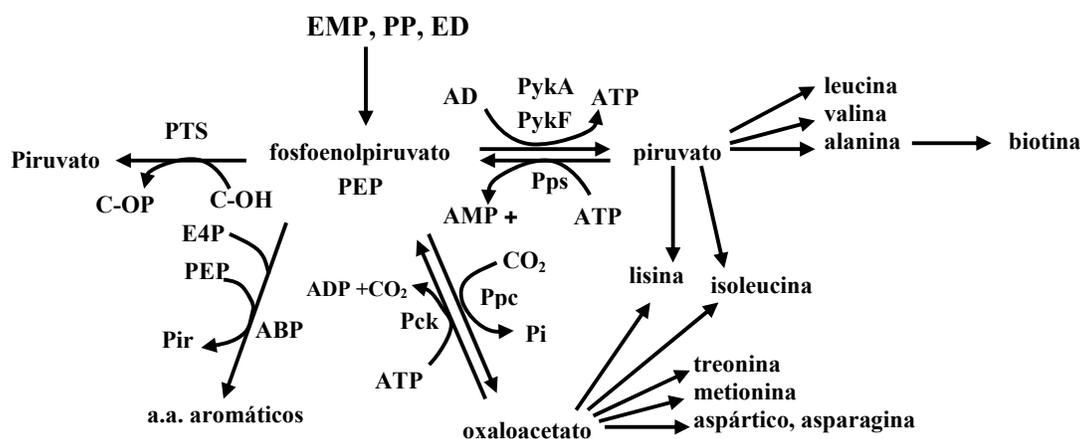


Figura 3. Algunas de las vías metabólicas que involucran PEP como sustrato. A partir de éste, se obtienen piruvato y oxaloacetato que también son intermediarios de la biosíntesis de otros aminoácidos y vitaminas. La utilización de PEP para cualquiera de las reacciones representadas en esta figura es esencialmente irreversible por la misma enzima. ABP = vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos.

El flujo de carbono a través de la enzima Ppc se puede catalogar como “rígido”. Se ha demostrado que Ppc se encuentra finamente regulada de forma negativa por ácido aspártico (aspartato), abundante en la fermentación anaeróbica de la glucosa, y positiva por ppGpp y Acetil-Co A (ACoA), abundantes en la fermentación aerobia de la glucosa. El flujo sobre Ppc responde principalmente a las condiciones de crecimiento, más que a modificaciones en los flujos de carbono del nodo de PEP o a su biodisponibilidad. La “rigidez” combinada con la “flexibilidad” de las diferentes vías que utilizan PEP ofrece retos importantes para los estudios de ciencia básica a nivel del nodo de PEP. En cuanto a la ingeniería del metabolismo para la biosíntesis de aminoácidos o derivados de los mismos, los estudios se han centrado no sólo a nivel de la modulación de la expresión de los genes que codifican para las enzimas de la vía biosintética específica, sino también en la incorporación de enzimas modificadas (homólogas a heterólogas), con propiedades alostéricas distintas que eviten la “rigidez” en la utilización de PEP para la producción de intermediarios de la vía biosintética (Stephanopoulos *et al.*, 1998; Neidhardt *et al.*, 1990).

II.2.3 Transporte activo de glucosa: sistema de fosfoenolpiruvato (PEP): fosfotransferasa de azúcares (PTS).

El sistema de fosfoenolpiruvato (PEP): fosfotransferasa de azúcares (PTS) es un sistema enzimático complejo responsable de la detección, transporte transmembrana, y fosforilación de sustratos azúcares en procariotas, tanto Gram-positivos como Gram negativos. Durante este proceso, el grupo fosfato del PEP es transferido a la molécula de glucosa generando PYR y glucosa 6-P (Figura 4A). Normalmente, PEP fosforila la enzima I (EI) de PTS, iniciando la cadena de transferencia del grupo fosforilo (Figura 4B). Luego la fosfohistidil-enzima I fosforila un residuo histidil en la proteína termoestable acarreadora de fosforilo de PTS, HPr. Esta fosfoproteína transfiere el grupo fosforilo al residuo histidil de una de las proteínas específicas de azúcar del PTS designada enzima (o dominio) IIA. La fosfoproteína IIA fosforila a la enzima (o dominio) IIB ya sea en un grupo cisteil o en un histidil, dependiendo de la enzima particular en estudio. La enzima (o dominio) IIC transfiere entonces el grupo fosforilo para internalizar el azúcar. Es este complejo de tres enzimas II, los dominios o proteínas IIA, IIB y IIC funcionan coordinadamente en el transporte y fosforilación de los azúcares utilizados como sustratos (Saier y Raizer, 1990; Postma *et al.*, 1993).

PTS es uno de los principales sistemas de transducción de señales en *B. subtilis*, funciona en la regulación de varios procesos fisiológicos bacterianos y está sujeto a un control de regulación elaborado. Trabajos recientes han revelado algunas características estructurales interesantes de los sistemas presentes en diversas especies bacterianas Gram positivas. La toma de carbohidratos por la bacteria puede ser regulada por cualquiera de los distintos mecanismos descritos a la fecha. Siete de estos mecanismos han sido discutidos por Saier (1985), Reizer *et al.* (1988) y Reizer y Peterkofsky (1987). Estos mecanismos incluyen: (i) competencia por una permeasa común, (ii) inhibición por azúcar-fosfato intracelular, (iii) inhibición por gradiente electroquímico de protón, (iv) regulación mediada por PTS involucrando la proteína IIA glucosa-específica, (v) competencia por fosfo-HPr, (vi)

regulación por fosforilación dependiente de ATP de un residuo seril regulador en HPr, y (vii) expulsión de azúcares intracelulares.

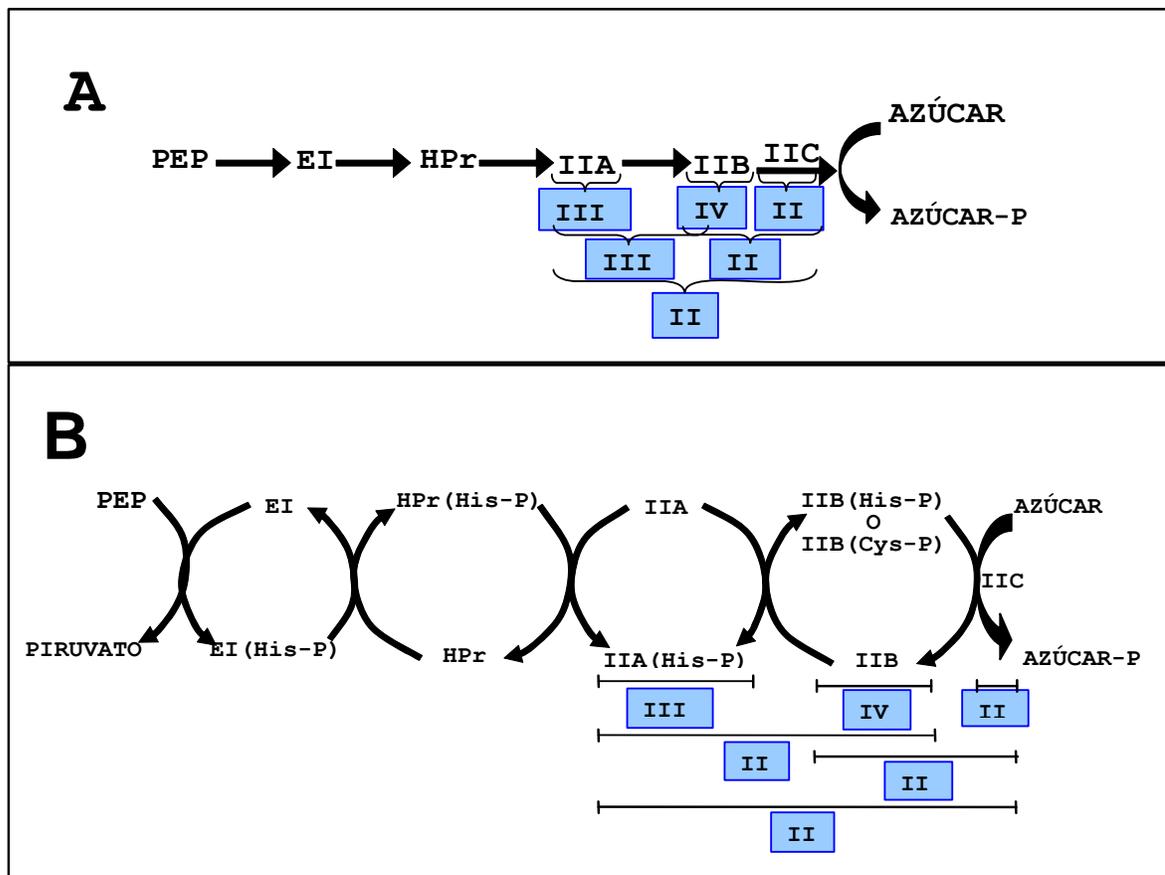


Figura 4. Reacciones en general de la transferencia del grupo fosforilo catalizadas por las proteínas del PTS. (A) Esquema lineal indicando las proteínas pero no la naturaleza de sus derivados. (B) Esquema de la reacción que ilustra la transferencia individual de grupos fosforilos y los residuos fosforilados dentro de cada proteína (dominios) dándoles una designación. Así IIA ha sido llamada enzima III, IIB ha sido llamada enzima IV, y la IIC ha sido llamada enzima II. Para algunos sistemas fusionaron los dominios IIA-IIB a los que se han referido como enzima III, la fusión de los dominios IIB-IIC ha sido llamada enzima II. Del mismo modo el estado de fusión de los dominios IIA, IIB y IIC, han sido llamados de manera colectiva como el complejo de enzima II (Saier y Reizer, 1990).

Además de las proteínas PTS generales EI y HPr, codificadas por *ptsI* y *ptsH* respectivamente (Gonzy-Tréboul y Steinmetz, 1987; Gonzy-Tréboul *et al.*, 1989), el genoma de *B. subtilis* codifica para 15 complejos EII azúcar específicos, los cuales incluyen al menos un representante de cada uno de las cuatro familias principales de

permeasas PTS: glucosa/sacarosa, lactosa, manosa y fructosa/manitol. Cerca de la mitad de los complejos EII contienen los tres dominios o proteínas EIIA, EIIB y la EIIC transmembranal y una EIID adicional para la manosa. Aún cuando PTS es considerado un sistema de transporte de carbohidratos, la velocidad del transporte obtenido con diferentes sistemas azúcar específicos puede variar en un rango amplio (Reizer *et al.*, 1999).

El transporte de glucosa por PTS da lugar a la glucosa 6-fosfato (y glucosa 1-fosfato) como el precursor(es) intracelular(es) para todos los pasos subsecuentes en la glicólisis (Figura 6). La glucosa induce una permeasa específica (enzima II^{Glc}). La capacidad de inducción declina después de que cesa el crecimiento exponencial en medio nutritivo de esporulación (NSM). Por lo tanto, la glucosa tiene que estar presente durante el crecimiento para reprimir la esporulación; si esta se adiciona al momento del inicio de la fase estacionaria o después, no se observa ninguna acción inhibitoria (Freese *et al.*, 1970). Mutantes deficientes en la enzima I no crecen azúcares transportados por PTS, y su esporulación en medios complejos no es inhibida por esos azúcares.

II.2.3.1 Mutantes en PTS

Para conservar los recursos celulares, la expresión de los casi cien genes del catabolismo de carbohidratos son inducidos solamente cuando el correspondiente carbohidrato está presente en el medio. En *B. subtilis* esta inducción puede ocurrir vía la inactivación de un represor mediada por el inductor, pero también puede ocurrir por activación transcripcional o por antiterminación. La mayoría de los genes y operones que codifican para el sistema de incorporación de carbohidratos, aparentemente tienen un sitio operador (sitio *cre*) necesario para la represión de CCR en la región del promotor, varios de estos sitios ya han sido demostrados experimentalmente (Tobisch *et al.*, 1999). El término de represión de catabolito por carbohidrato fue descrito por primera vez en *B. subtilis* a raíz de las observaciones de su crecimiento diáuxico en cultivo; en presencia de una fuente de carbono preferencial se encontró que reprimía la síntesis de enzimas necesarias para el transporte y metabolismo de una fuente de carbono menos favorable. Posteriormente se encontró que la

expresión de algunos operones era estimulada por la presencia de la fuente de carbono rápidamente metabolizable, y a este fenómeno se le llamó la activación de catabolito por carbohidrato (CCA). El segundo componente de CCR en *B. subtilis* es la proteína A de control de catabolito (CcpA) (Figura 5), que funciona tanto como represor en CCR o como activador transcripcional en CCA (Nicholson y Chambliss, 1985; Nicholson *et al.*, 1987; Henkin, 1996; Weickert y Adhya, 1992).

Como se puede ver en la Figura 5, HPr es la proteína reguladora central de la incorporación y metabolismo de carbohidratos. El complejo P-His-HPr, es formado cuando hay ausencia de carbohidratos rápidamente metabolizables, además fosforila y activa a GlpK (panel A). Tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos se lleva a cabo la estimulación de reguladores transcripcionales que contienen dominios de regulación de la actividad de PTS, que son dependientes de PEP y de la fosforilación catalizada por HPr y EI. Por el contrario, solamente en las bacterias Gram-positivas se forma el complejo P-Ser-HPr, formado en respuesta a la presencia de carbohidratos rápidamente metabolizables que interactúan con CcpA para hacer complejo con CCR/CCA y con las permeasas no-PTS para dar lugar a la exclusión por inductor (panel B). La delección de PTS y su cambio por un sistema distinto puede tener diferentes efectos sobre el metabolismo y fisiología de *B. subtilis*, como para cualquier otro modelo de estudio como *E. coli*, ya que algunos de sus componentes se comportan como reguladores generales tanto a nivel transcripcional como alostérico. De igual forma, una mayor disponibilidad de PEP en la célula podría acarrear consecuencias, principalmente en el metabolismo, ya que el PEP se comporta como inhibidor/activador alostérico de varias enzimas del metabolismo central (Figura 3 y 6). Esta hipótesis es difícil de verificar, debido principalmente a que los diversos estudios donde se demuestra el efecto alostérico de PEP sobre distintas enzimas, se realizaron bajo condiciones de ensayo *in vitro*, donde es posible que las condiciones particulares de cada componente del ensayo sean muy distintas a las que se encuentren *in vivo*. Igualmente, se ha demostrado que el recambio de moléculas energéticas *in vivo* (como PEP) es muy alto, de forma que inclusive en condiciones de no utilización de PEP por PTS, es probable que no se logre una condición

de aumento de la concentración intracelular real de PEP suficiente para concretar un efecto alostérico (Neidhardt *et al.*, 1990; Mendes *et al.*, 1996).

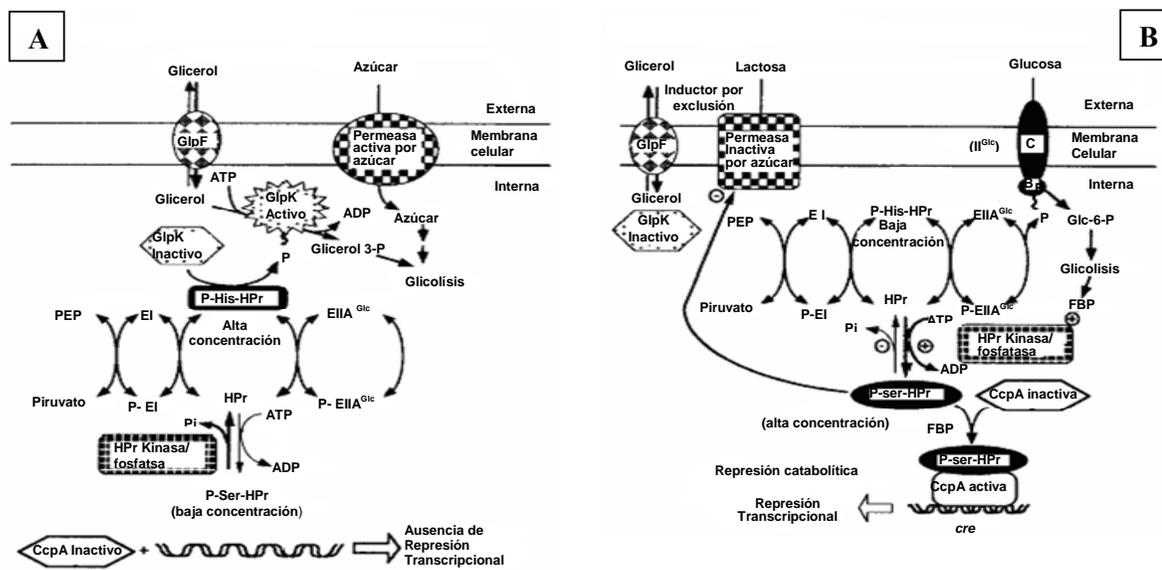


Figura 5. Principales mecanismos de regulación de la incorporación y metabolismo de carbohidratos en las bacterias Gram-positivas. Modificado de Deutscher *et al.* (2002)

Otra posible consecuencia de las mutaciones en *pts*, para el metabolismo y variaciones en la fisiología en general, podrían ser las características particulares del nuevo sistema de transporte. El cambio de expresión de un grupo de genes que codifica para proteínas de membrana (genes del sistema PTS y otras proteínas reguladas por él) por otro diferente, puede traer efectos variados sobre la composición de la membrana. Más aún, tener consecuencias sobre la fisicoquímica del proceso de transporte del azúcar y permeasas relacionadas, puede haber variaciones en el potencial de membrana, el cual está estrechamente relacionado con la concentración de iones. De esta forma el análisis a fondo de las variaciones en la fisiología y el metabolismo de las cepas de *B. subtilis* silvestre, *pts⁻*, *pfk⁻* y *pts⁻pfk⁻*, ofrece retos interesantes tanto para la biología celular como para la ingeniería de vías metabólicas.

II.2.4 Vía de Embden-Meyernhoff-Parnas (EMP) o vía glicolítica.

La vía glicolítica es la ruta central y constitutiva del metabolismo de los carbohidratos e incluye las reacciones enzimáticas que permiten la incorporación y la transformación de la glucosa, una molécula de seis átomos de carbono, en dos moléculas de piruvato, de tres átomos de carbono (Figura 6). En *B. subtilis* esta vía metabólica comprende la activación por fosforilación de la glucosa al ser transportada por PTS (Postma *et al.*, 1993) (ver sección II.2.3).

Las reacciones de glicólisis han sido extensamente estudiadas en *E.coli* y *Salmonella typhimurium*. En *Bacillus spp.*, la situación es aún más compleja que para estos dos organismos debido a que el crecimiento y la esporulación frecuentemente tienen diferentes requerimientos metabólicos (Gay *et al.*, 1973; Klier y Rapoport, 1988; Sonenshein, 1989). Hay aún muchas preguntas sin contestar sobre el flujo de carbono, especialmente en medios complejos. No solamente las reacciones glicolíticas son necesarias para el crecimiento celular, sino también para la formación de la endoespora, la cual durante la fase postexponencial requiere nutrientes de bajo peso molecular que frecuentemente son suplementados por las reacciones glicolíticas. Para mantener las pozas de ciertos metabolitos durante el crecimiento o esporulación y simultáneamente para prevenir la acumulación de metabolitos que interfieren en reacciones se requiere de una regulación fina (Klier y Rapoport, 1988).

En la Figura 6, están anotados los genes (ver Tabla I) que codifican para enzimas de las vías glicolítica y PP, y para enzimas que catalizan el transporte de algunos carbohidratos seleccionados y su conversión a intermediarios de las vías mencionadas.

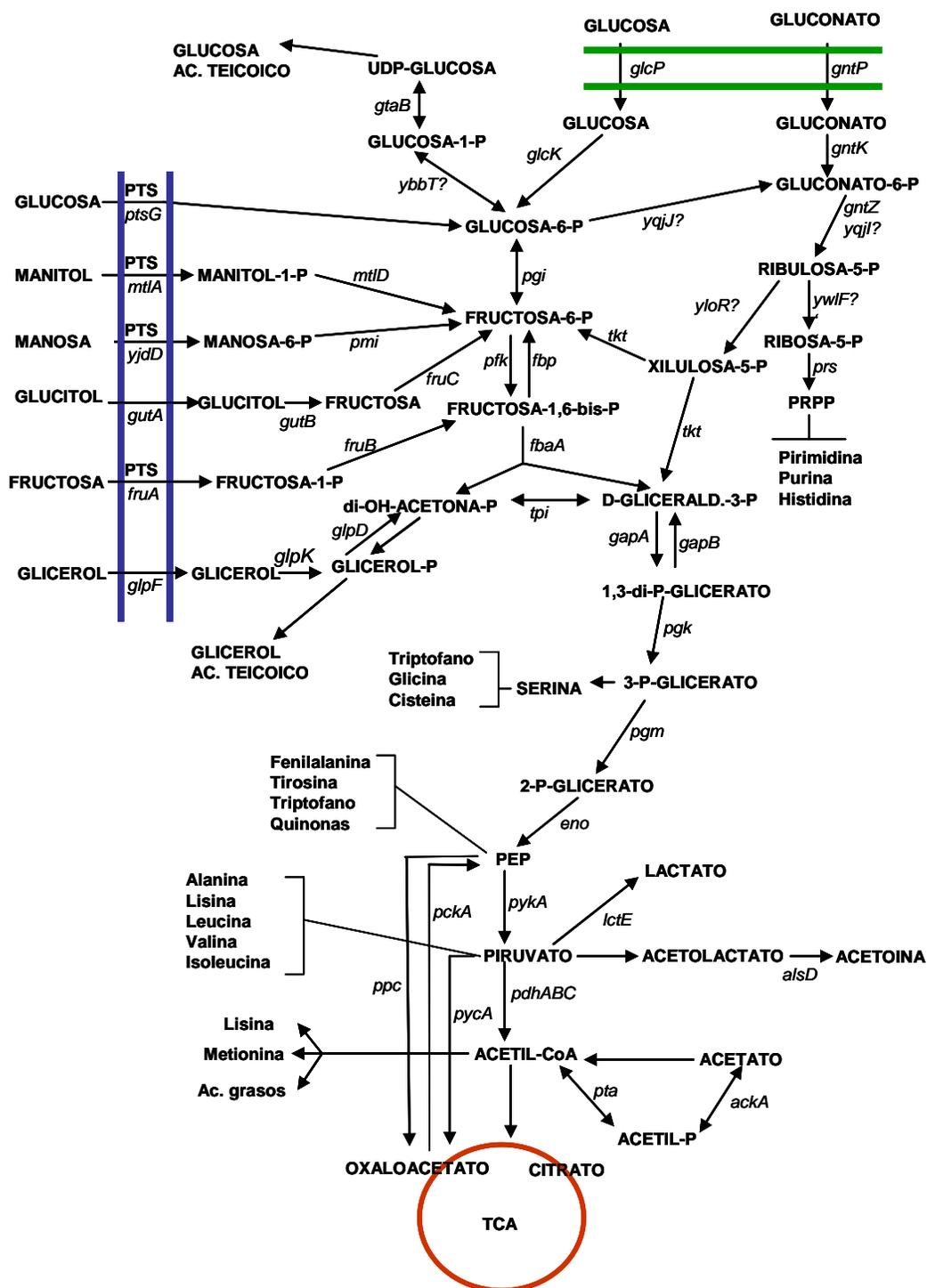


Figura 6. Metabolismo central de carbohidratos. Modificado de Deutschener *et al.* (2002)

Tabla I. Genes que codifican las enzimas involucradas en las vías metabólicas mostradas en la figura 6.

Gen	enzima
<i>ptsG</i>	EIICBA ^{Glc}
<i>mtlA</i>	EIICB ^{Mtl}
<i>mtlD</i>	manitol-1-P deshidrogenasa
<i>yjldD</i>	posible EIIBCA ^{Man}
<i>pmi</i>	manosa-6-P isomerasa (paralogos <i>dhS</i> y <i>yjdE</i>)
<i>fruA</i>	EIIABC ^{Fru}
<i>fruB</i>	1-fosfofructocinasa
<i>fruC</i>	fructocinasa (<i>vdjE</i> y <i>ydhR</i> ?)
<i>gutA</i>	asumido como simporte de glucitol/H ⁺
<i>gutB</i>	glucitol deshidrogenasa
<i>glpF</i>	facilitador de glicerol
<i>glpK</i>	glicerol cinasa
<i>glpD</i>	glicerol deshidrogenasa
<i>glcP</i>	glucosa permeasa
<i>glcK</i>	glucosa cinasa
<i>gntP</i>	gluconato permeasa
<i>gntK</i>	gluconato cinasa
<i>pgi</i>	fosfo glucosa isomerasa
<i>pfk</i>	6- fosfofructo cinasa
<i>fbp</i>	fructosa-1,6-bifosfatasa
<i>fbaA</i>	fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (paralogo <i>iolJ</i>)
<i>tpi</i>	triosa fosfato isomerasa
<i>gapA</i>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa glicolítica
<i>gapB</i>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa gluconeogénica
<i>pgk</i>	3-fosfoglicerato cinasa
<i>pgm</i>	fosfoglicerato mutasa
<i>eno</i>	enolasa
<i>pykA</i>	piruvato cinasa
<i>yqjJ</i>	posible glucosa-6-P deshidrogenasa
<i>gntZ</i>	gluconato-6-P deshidrogenasa
<i>ywlF</i>	posible ribosa-5-P isomerasa
<i>prs</i>	ribosa-P pirofosfocinasa
<i>yloR</i>	posible ribulosa-5-P epimerasa
<i>tkt</i>	transcetolasa
<i>ybbT</i>	posible fosfoglucomutasa
<i>alsS</i>	α -acetolactato sintasa
<i>alsD</i>	α -acetolactato descarboxilasa
<i>pdhABCD</i>	complejo piruvato deshidrogenasa
<i>pta</i>	fosfotransacetolasa
<i>ackA</i>	acetato cinasa
<i>acsA</i>	acetil-CoA sintetasa
<i>pycA</i>	piruvato carboxilasa

La glicólisis es una de las vías metabólicas más conservadas en los organismos vivos (Dandekar *et al.*, 1999). Las funciones de las enzimas glicolíticas en *B. subtilis* han sido determinadas experimentalmente o fueron deducidas a partir de su similitud con enzimas glicolíticas conocidas de otras bacterias (Fortnagel, 1993; Kunst *et al.*, 1997). Sin embargo, las vías de glicólisis/gluconeogénesis de *B. subtilis* contienen algunas particularidades. Por ejemplo, la fructosa-1,6-bifosfatasa (Fujita *et al.*, 1998) no muestra similitud con ninguna otra fructosa-1,6-bifosfatasa conocida. Además, *B. subtilis* posee dos enzimas gliceraldehído-3-P deshidrogenasas codificadas por *gapA* (anteriormente *gap*) y *gapB*, las cuales tienen un 60% de identidad de secuencia. Las mutaciones en *gapA* evitan el crecimiento en fuentes de carbono glicolíticas, mientras que las mutantes *gapB* no crecen en fuentes de carbono gluconeogénicas (Fillinger *et al.*, 2000).

El crecimiento vegetativo en *B. subtilis* es conducido por la vía de EMP (Figura 6) con la formación aeróbica de ácidos orgánicos como lactato, acetato, etc. Este incremento de biomasa demanda oxígeno de forma paralela al incremento de la población, siendo éste período de crecimiento exponencial por fisión binaria muy corto. El segundo incremento de la demanda de oxígeno ocurre cuando el pH empieza a elevarse, que es cuando inicia la desaparición del acetato del medio, el cual está asociado con la inducción de enzimas de TCA y ciclo del glioxilato. La demanda de oxígeno disminuye después de que terminó de elevarse el pH y permanece a un nivel bajo hasta que ocurre la esporulación, con la formación de una spora refractil (Hanson *et al.*, 1963; Neidhardt *et al.*, 1990). Para el estudio de las consecuencias de las limitaciones y acumulaciones de diferentes metabolitos, se han aislado mutantes de *B. subtilis* bloqueadas en varios pasos de la vía glicolítica o de reacciones secundarias. Ha sido bien caracterizado su defecto enzimático y la influencia de los bloqueos metabólicos sobre el crecimiento y desarrollo celular (Fortnagel, 1993). El grupo más completo de estas mutantes ha sido colectado por Ernst Freese, Meter Fortnagel y “The Genetic Stock Center” (The Ohio State University). Es importante mencionar que no existe una colección comparable para ninguna otra bacteria Gram positiva.

II.2.4.1 Análisis de caso de estudio: Fosfofructocinasa

II.2.4.1.1 Generalidades.

Las vías metabólicas están controladas por pasos enzimáticos cuyas propiedades individuales determinan la velocidad sobre los procesos metabólicos. Por esto, es necesario identificar que enzimas controlan los procesos metabólicos relevantes y también poder determinar como las alteraciones en esos niveles afectan el flujo de interacciones metabólicas dentro de la célula (Walsh y Koshland, 1984; Klier y Rapoport, 1988; Neidhardt, 1990). Debido a su posición estratégica en la vía glicolítica y a la reacción dependiente de ATP, es que se considera que la fosfofructocinasa tiene una posición clave junto con la piruvato cinasa y la hexocinasa, para controlar el flujo de carbono a lo largo de toda las secuencias de reacciones enzimáticas en la vía glicolítica, en casi todo tipo de células. Poco se sabe del metabolismo bacteriano, específicamente lo relacionado a la enzima glicolítica fosfofructocinasa (Pfk; Fructosa 6-fosfato-1-cinasa, EC 2.7.1.11) en *E. coli*, y prácticamente nada en *B. subtilis*. Esta enzima ha sido purificada y caracterizada de varias fuentes y tiene una serie de atributos que la hacen de particular interés.

En general Pfk tiene actividad definida como altamente conservada en la vía glicolítica, y está presente en Bacteria, Eukarya y Archaea. Es bien sabido que las Pfk de mamíferos y de levaduras tienen más del doble del tamaño de sus contrapartes en bacterias. La estructura tetramérica de la Pfk bacteriana presenta una conformación muy similar a las Pfk diméricas de los mamíferos. Las Pfk caracterizadas hasta el momento se agrupan en tres familias: a) la familia PfkA, integrada por las bien conocidas Pfk dependientes de ATP de eucariotas superiores, junto con las Pfk dependientes de ATP y pirofosfato (PPi) de bacterias (incluyendo las *Crenarchaea* dependientes de pirofosfato de *Thermoproteaus tenax*) y las Pfk dependientes de PPi de las plantas; b) la familia PfkB, ejemplificada por la Pfk menos dependiente de ATP de *E. coli* (Pfk2), pero que también incluye al menos una enzima *Crenarchaea* en *Aeropyrum pernix* y tentativamente; c) la familia llamada PFKC, la cual contiene las Pfk dependientes de ADP únicas del género *Euryarchaea* de *Pyrococcus* y *Thermococcus*, las cuales por análisis de secuencias aparentemente también se encuentran

en las especies metanogénicas como *Methanococcus janaschii* y *Methanosarcina mazei*. Los subtipos de Pfk utilizan tanto ATP, ADP o PPi como donador primario del grupo fosforilo, y comparten la habilidad para catalizar la transferencia del grupo fosfato a la posición 1 de la fructosa 6-fosfato (fru-6-P), el cual es sustrato para varias vías metabólicas. Debido a su posición estratégica al inicio de la vía glicolítica y a la reacción dependiente de ATP, esto le da una posición importante para controlar el flujo a través de toda la secuencia enzimática. Por ejemplo, las Pfk de eucariotas superiores controladas alostericamente son un tópico estándar de los libros de texto de bioquímica, pues representa a una de las enzimas más reguladas conocidas hasta el momento, con por lo menos 23 efectores alostéricos. Los estudios en Pfk de eucariotas han revelado que su deficiencia en músculo da lugar a una miopatía o enfermedad muscular metabólica, y en eritrocitos da lugar a eritroenzimopatía que ocasiona anemia hemolítica, así como a un desorden autosómico recesivo llamado enfermedad de Tarui (glucogenosis tipo VII). Recientemente, se ha reportado la identificación de mutaciones múltiples incluyendo defectos en edición, cambios de marco de lectura y mutaciones sin sentido en seis grupos étnicos diferentes estableciendo la heterogeneidad genética de la enfermedad. Aun no se conoce una correlación obvia entre el genotipo y el fenotipo de la expresión de la enfermedad (Bloxham *et al.*, 1973; Allert *et al.*, 1991; Nakajima, 1995; Ronimus y Morgan, 2001; Koebmann *et al.*, 2005).

II.2.4.1.2 Características bioquímicas de las fosfofructocinasas.

El estudio más extenso de Pfk en bacterias se ha llevado a cabo principalmente en *E. coli*, *Lactococcus lactis* y *B. stearothermophilus*. Se ha encontrado que establece un paradigma de regulación enzimática, por un lado el PEP inhibe alostericamente a Pfk disminuyendo la afinidad que la enzima despliega por su sustrato, la fru-6-P. En *B. subtilis* al igual que en *L. lactis* y otros *Bacillus*, Pfk, Pyk y Ldh son codificadas en un operón. Mutantes obtenidas por interrupción de Pfk en *L. lactis* muestran que la reducción del 40% de la actividad de fosfofructocinasa da lugar a tres o cuatro veces mas concentración de metabolitos “upstream” (glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato), indicando que el control ejercido por

Pfk sobre la concentración de estos metabolitos es elevada.

II.2.4.1.3 Mutantes en las fosfofructocinasas.

En *B. subtilis*, a la fecha existen contados reportes de hace casi 40 años, por lo que el estudio de Pfk ha sido prácticamente nulo. Los reportes al respecto son colaterales, casi a modo de hallazgo, a estudios sobre mutantes en esporulación o transporte obtenidos por transducción de fago, u obtenidos por mutagénesis con metanosulfonato, las cuales fueron obtenidas por su fenotipo de resistencia, auxotrofías o sensibilidad a fagos. Estos trabajos sugieren la presencia de mutaciones adicionales e inestables llevadas a cabo por la transducción de fagos (Takahashi, 1963; Freese *et al.*, 1970, 1972; Gay *et al.*, 1983; Fraenkel, 1992; Llanos *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 2001). Los reportes de las mutantes defectivas de Pfk de *B. subtilis* obtenidas de esta manera, señalan que no son capaces de catabolizar fructosa 6-fosfato, cuando son crecidas en medios usando 5g/L de glucosa. Sin embargo, pueden crecer en fructosa, la cual puede entrar vía fructosa 1-fosfato y fructosa 1,6-bifosfato o bien vía fructosa 1-fosfato y fructosa 6-fosfato. Además, crecen en glicerol o malato con tiempos de duplicación reducidos, pero no crecen en glucosa o manosa como única fuente de carbono. Las mutantes muestran retrasos en los tiempos de esporulación en medio nutritivo de esporulación y este retraso es aun más evidente en presencia de glucosa (Freese *et al.*, 1974). Otros azúcares como la fructosa, manosa, glucosamina o glicerol inhiben significativamente la esporulación en estas mutantes. Sin embargo, no se conoce si estos retrasos son debidos a la falta de Pfk o al conjunto de mutaciones presentes en estas cepas, por lo que es importante contar con mutantes y estudios en enzimas claves en fondos genéticos bien definidos.

II.2.5 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

El TCA o ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico (CAC), es una vía central del metabolismo de intermediarios. Tiene varias funciones en bacterias aerobias como la

generación de ATP. Junto con el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (PDHC), oxida piruvato completamente y proporciona a los sistemas de respiración unidos a membrana con reducción de equivalentes. Otra función importante es suplementar intermediarios como por ejemplo 2-oxoglutarato, succinil coenzima A (CoA), y oxaloacetato para el anabolismo. También son generados algunos de los intermediarios por procesos de catabolismo periférico como la degradación de aminoácidos. Además, componentes del ciclo de Krebs facilitan la toma de cationes divalentes. El citrato y el isocitrato actúan como acarreadores de Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} y otros iones metálicos. Durante cada vuelta completa del TCA, un grupo acetilo en forma de ACoA entra al ciclo siendo condensado a oxaloacetato, produciendo un citrato y CoA (Figura 7). En ocho pasos involucrando la acción de 10 enzimas, los dos átomos de carbono de la entrada del grupo acetilo son liberados como CO_2 y el oxaloacetato es regenerado. La reducción de equivalentes en la forma de NAD (P) H son generados en los pasos con piruvato, isocitrato, 2-oxoglutarato y malato como sustrato. En el paso de succinato a fumarato, son transferidos dos electrones directamente a la cadena respiratoria por ejemplo a menaquinona.

Además de producir precursores, produce poder reductor y energía en forma de $NADH+H^+$, $NADPH+H^+$ y $FADH_2$. La reoxidación de $NADH+H^+$ y $FADH_2$ se lleva a cabo por dos procesos que dependen del aceptor final de electrones: a) en metabolismo fermentativo o anaeróbico, la reoxidación se lleva a cabo por la reducción de compuestos orgánicos, y b) en metabolismo de tipo respiratorio o aerobio la reoxidación se lleva a cabo mediante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, donde el aceptor final de electrones es el oxígeno.

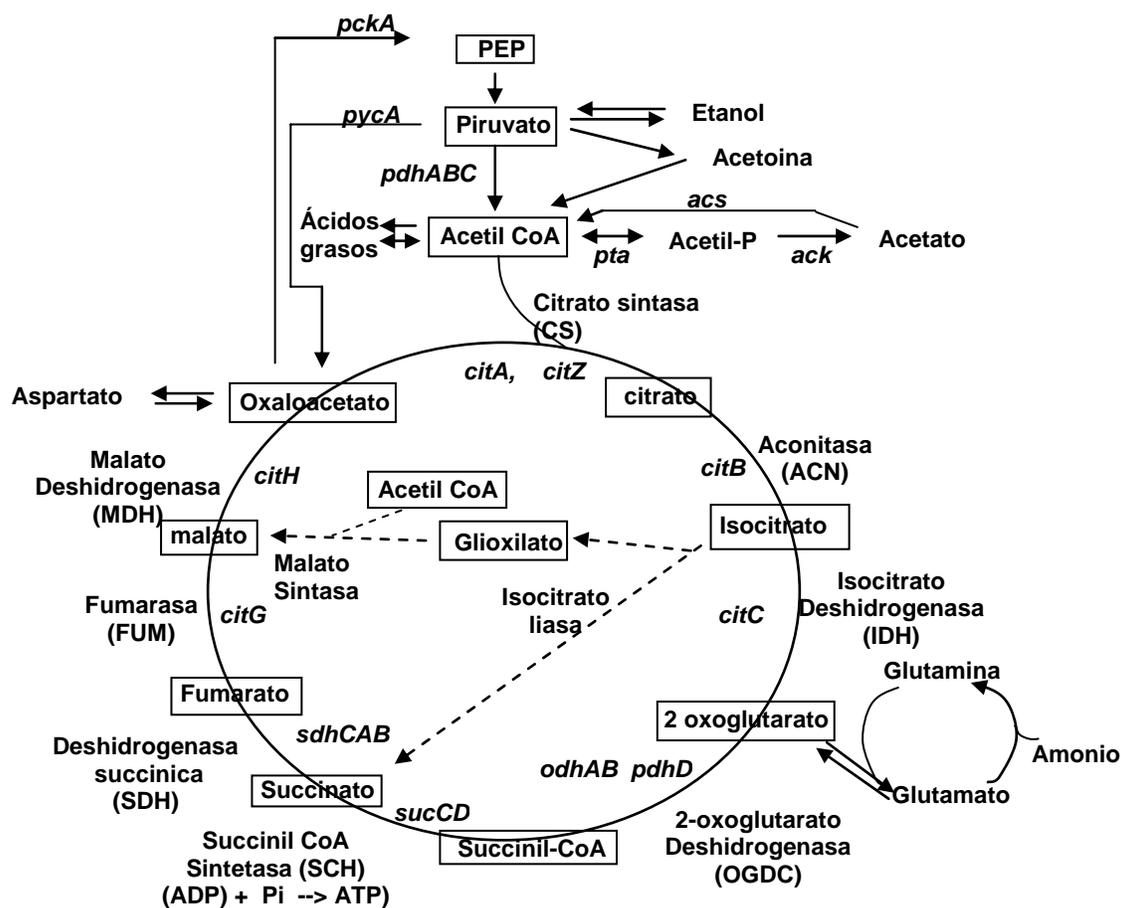


Figura 7. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos y vías relacionadas con él. La vía desde acetil coenzima A (acetil-CoA) a oxaloacetato se muestra como ocurre en *B. subtilis*. El paso a glioxilato, indicado por la línea punteada, está ausente en *B. subtilis*. Se muestran en *itálicas* los genes que codifican para enzimas relevantes. El oxaloacetato que inicia el ciclo es generado por piruvato carboxilasa (codificada por *pycA*); la conversión de oxaloacetato a PEP por gluconeogénesis es mediado por PEP carboxicinasa (codificado por *pckA*). Durante el crecimiento fermentativo, el piruvato es convertido a lactato, etanol, acetoina y acetato. La producción de acetato es catalizada por fosfotransacetolasa y acetato cinasa, codificadas por *pta* y *ackA*, respectivamente. La reacción de acetato cinasa está acoplada a la síntesis de ATP. La utilización de acetato está mediada por acetil-CoA sintetasa, producto del gen *acs*. Modificado de Sonenshein, 2002).

Como parte de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, se genera gran cantidad de ATP a partir de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 , así que para *B. subtilis* como para otros aeróbicos, los nucleótidos reducidos en forma de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 son la fuente principal de energía a nivel de metabolismo (Willecke *et al.*, 1973; Archibald y Duong, 1984; Brutsche y Braun, 1997; Krom *et al.*, 2000).

In vivo, diferentes enzimas del TCA pueden estar en agregados organizados o “metabolones”, los cuales favorecen el transporte de intermediarios entre el sitio activo de enzimas sucesivas (Srere, 1990). Tales agrupaciones multienzimáticas que incluyen a la fumarasa, malato deshidrogenasa, citrato sintasa, aconitasa e isocitrato deshidrogenasa han sido encontradas en lisados de varias especies bacterianas, incluyendo *B. subtilis* (Barnes y Weitzman, 1986).

Solamente las tres primeras reacciones del TCA, las que involucran los ácidos tricarbónicos, son necesarias para la síntesis de 2-oxoglutarato y de ahí a la biosíntesis de glutamato. Debido a que el glutamato es enormemente abundante (~100 mM en células de *B. subtilis*) y es la fuente de otros componentes celulares, esta enzima y los genes que las codifican están sujetos a regulación especial, lo cual refleja su papel en el metabolismo de la energía y el carbono, la síntesis de glutamato y esporulación.

Cuando la célula crece en succinato, fumarato o malato, o aminoácidos como glutamato, glutamina, aspartato, asparagina, arginina, prolina, ornitina o histidina como la única fuente de carbono, convierte los sustratos a oxaloacetato, el cual luego entra a la vía glicolítica reversa (gluconeogenesis) después de la conversión a PEP vía PEP-carboxilasa (Figuras 6 y 7). Finalmente, la gluconeogénesis produce los esqueletos de carbono necesarios para la síntesis de fosfolípidos, vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular (Diesterhaft y Freese, 1973).

II.2.6 Productos de la fermentación de glucosa.

La conversión de glucosa hasta piruvato a través de la vía EMP, genera dos moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Para mantener el flujo en esta vía, se deberá regenerar la forma oxidada de este cofactor (NAD^+), y esto se logra mediante la respiración aeróbica (el oxígeno es el aceptor final de electrones en este caso), o mediante la oxidación de compuestos orgánicos que posteriormente serán excretados por la célula en un proceso conocido como fermentación. El metabolismo fermentativo se presenta principalmente en condiciones de anaerobiosis

(ver Sección II.2.5 TCA); en ausencia de oxígeno, otros aceptores de electrones como moléculas de carbono, pueden ser reducidas para regenerar los cofactores oxidados requeridos en el metabolismo central.

B. subtilis durante mucho tiempo se ha visto como un aerobio estricto, pero estudios recientes han mostrado que también puede crecer anaeróbicamente, tanto por utilizar nitrato o nitrito como aceptor de electrones o por fermentación en ausencia de aceptores de electrones (Nakano y Hulett, 1997; Nakano y Zuber, 1998). El grupo de *B. subtilis* (grupo II del género *Bacillus*) principalmente usa nitrato como aceptor alternativo de electrones. La mayoría de las especies de este grupo utiliza otro aceptor de electrones conocido, como lo puede ser el fumarato, N-óxido trimetilamina, y dimetilsulfóxido bajo condiciones anaeróbicas, pero el crecimiento fermentativo es relativamente pobre (Shariati *et al.*, 1995). Por lo tanto, se considera que las bacterias del grupo II ocupan una posición intermedia entre los aerobios facultativos verdaderos del grupo I de *Bacillus spp* y los aerobios estrictos del grupo III y IV (Shariati *et al.*, 1995; Priest, 1993).

Las especies microbianas usan varios mecanismos para sensar y responder a alteraciones en el estado redox. *B. subtilis* también puede responder a cambios en la disponibilidad de oxígeno y en estado redox por cambios en la dirección metabólica a favor de la anaerobiosis. Este cambio entre el metabolismo aerobio y anaerobio en *B. subtilis* está regulado principalmente a nivel transcripcional y en algunos casos por modulación de la actividad enzimática (Lynch y Lin, 1996; Bauer *et al.*, 1999; Sawers, 1999; Semenza, 1999).

En las vías de fermentación de *E. coli*, la conversión de piruvato a ACoA está catalizada por piruvato formato liasa (PFL), en vez del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDHC) que funciona durante el crecimiento aerobio. El cambio de PDH a PFL es importante para evitar el exceso de formación de NADH bajo condiciones fermentativas, de este modo no es reoxidado por la vía respiratoria. En contraste, *B. subtilis* aparentemente carece de PFL y en su lugar utiliza PDH para el crecimiento fermentativo anaerobio (Figura

8). El piruvato estimula la fermentación en *B. subtilis*, el cual parece estar relacionado a la función de PDH durante la fermentación (Nakano *et al.*, 1997), pues se ha sugerido que el piruvato es requerido para la expresión completa de *pdhAB* (Ye *et al.*, 2000).

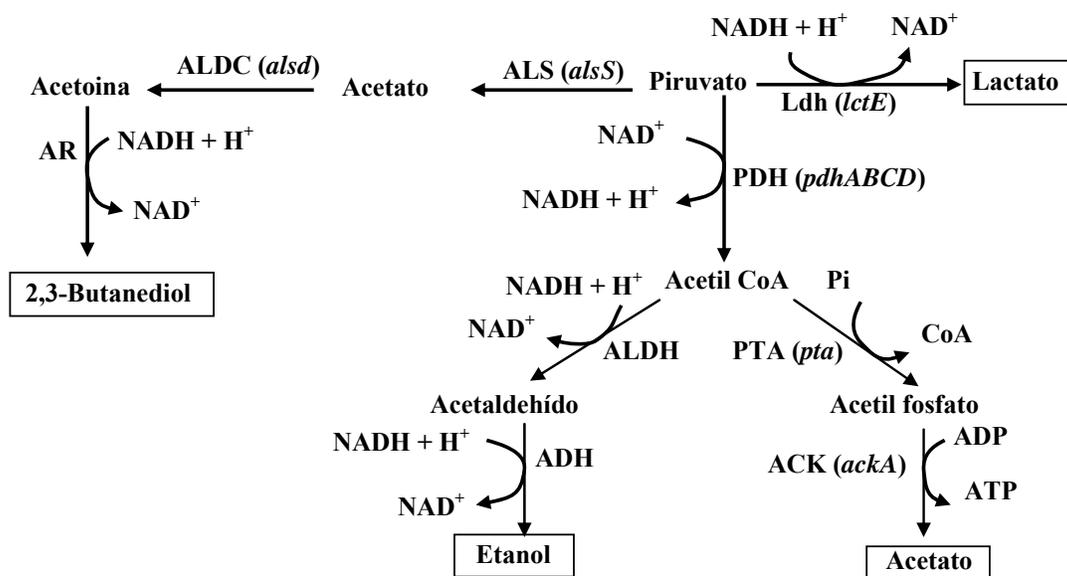


Figura 8. Vías de fermentación de *B. subtilis*. Se muestran los productos finales de la fermentación en el recuadro. En paréntesis se muestran los genes conocidos que codifican enzimas involucradas en la fermentación. Abreviaturas: ACK, acetato cinasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDC, α-acetolactato descarboxilasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; ALS, α-acetolactato sintasa; AR, acetoin reductasa; Ldh, L-lactato deshidrogenasa; PTA, fosfotransacetilasa; CoA, coenzima A. Modificado de Nakano y Zuber (2002).

B. subtilis lleva a cabo una fermentación mixta ácido-butanediol bajo condiciones anaeróbicas (Figura 6 y 8), los productos identificados incluyen etanol, lactato, acetoina y 2,3-butanediol (Nakano *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2000). Cuando se agrega piruvato en concentración alta, se ha observado la excreción de acetoina (Cruz *et al.*, 2000), lo cual puede deberse a la alta producción de acetato (Speck y Freese, 1973). Este proceso de fermentación acetona-butanol-etanol, de importancia industrial, es revisado a detalle en las revisiones de Young y Cole (1993) y Mitchell (1998). El paso clave en el proceso de operación de la fermentación es la reoxidación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ que es producido por glicólisis.

B. subtilis exhibe una respuesta compleja y variada en la fase de crecimiento postexponencial. Existen pocos estudios sobre la fisiología de *B. subtilis* o la regulación de los genes en la célula en fase estacionaria de cultivos crecidos en condiciones anaeróbicas. En el llamado metabolismo secundario, muchos genes que son requeridos para la producción de antibióticos son inducidos por anaerobiosis (Ye *et al.*, 2000). Estos incluyen genes necesarios para la producción de subtilosina A (una bacteriocina antilistérica) (*sbo-alb*), los únicos estudiados en anaerobiosis (Babasaki *et al.*, 1985; Zheng *et al.*, 1999), el antibiótico sublancina (*sunA* y *yollJK*) (Paik *et al.*, 1998) y los genes de biosíntesis de poliketidos (*pksB-I*) (Albertini *et al.*, 1995).

En condiciones anaeróbicas *B. subtilis* no esporula eficientemente (Hoffmann *et al.*, 1995). La pieza clave de la esporulación Spo0A, aparentemente es funcional al menos en parte, debido a que la expresión anaeróbica del operón *sbo-alb* requiere la liberación de la represión mediada por la proteína AbrB, un evento dependiente de Spo0A. Algunos cambios metabólicos causados por un cambio en la anaerobiosis probablemente es el responsable del defecto en la esporulación. Sin embargo, hasta el momento no se ha publicado información al respecto.

III. Justificación

El estudio del papel e importancia de la enzima PfkA en el metabolismo no se ha visto tan favorecida en microorganismos como en el caso de modelos eucariotas. El conocimiento es escaso en modelos bacterianos y en *B. subtilis* su estudio es prácticamente nulo. El estudio de Pfk en *B. subtilis* se ha llevado a cabo de manera colateral y de forma accidental en estudios sobre transporte en esta bacteria. Estos trabajos sugieren la presencia de mutaciones inestables adicionales al del gen de *pfkA*, debido a que fueron llevados a cabo por transducción con fagos. Como se sabe, las mutaciones múltiples de este tipo hacen que se enmascaren algunos de los resultados haciendo poco claro el impacto específico de la mutación de Pfk en la fisiología, además de desconocerse su impacto real en el metabolismo.

En este sentido es que en este trabajo nos proponemos clonar el gen que codifica para la enzima Pfk (*pfkA*), así como de mutantes por interrupción en un sitio único de la secuencia primero a nivel de plásmido para luego transferir el gen interrumpido al cromosoma, utilizando cepas de *B. subtilis* con fondos genéticos bien conocidos. La caracterización en diferentes fondos genéticos y medios de cultivo de las cepas obtenidas, nos permitirá conocer el impacto de la deficiencia de dicha enzima en la fisiología de *B. subtilis*. Los datos obtenidos nos permitirán enriquecer el conocimiento sobre el papel de esta enzima clave del metabolismo y su relación con otros sistemas como PTS.

IV. Hipótesis

La ausencia de la enzima PfkA incrementa el tiempo de duplicación celular con la consecuente modificación de la producción de ácidos orgánicos y esporas.

V. Objetivos

V.3 Objetivo General

Evaluar la interrupción del gen cromosomal *pfkA* sobre el crecimiento, esporulación y producción de ácidos orgánicos en *B. subtilis*

V.3.1 Objetivos Particulares

- 1.- Obtener la cepa mutante *pfkA* de *B. subtilis*.
- 2.- Determinar el efecto de la inactivación de *pfkA* en la actividad de las enzimas codificadas por el operon *pfkA-pykA*.
- 3.- Obtener la mutación *pfkA* en fondo carente de PTS
- 4.- Determinar los parámetros cinéticos y porcentaje de esporulación de cepa silvestre y mutantes en *pfkA* en medios de cultivo rico y mínimo.
- 5.- Determinar el efecto de las mutantes en *pfkA* sobre la producción de ácidos orgánicos.

VI. Material y Métodos

VI.1 Cepas bacterianas y vectores.

Todas las cepas bacterianas y plásmidos usados están listados en la Tabla II. Para la amplificación de plásmidos se usó la cepa JM101 de *E. coli*, la cual fue transformada siguiendo los procedimientos estándares (Sambrook y Russell, 2001). Las cepas carente de PTS se obtuvieron al transferir el genotipo $\Delta(pts'XHP)::ermC$ de la cepa MM3 (Crutz *et al.*, 1990) a la cepa MM2 (usada como silvestre), de acuerdo a los procedimientos estándares (Harwood y Cutting, 1990). Las mutantes de PTS son incapaces de crecer en glucosa como única fuente de carbono. Finalmente, el gen *pfkA* insercionalmente inactivado fue incorporado a la cepa Δpts (ver abajo). Los antibióticos fueron usados a las concentraciones de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina; 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de eritromicina y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de espectinomicina.

VI.2 Análisis teórico del motivo (“motif”) de transcripción.

Con el fin de analizar la presencia de motivos de transcripción en los dos genes del operón: *pfkA-pykA*, usamos el programa de cómputo de base de datos de regulación de transcripción en *B. subtilis* (de sus siglas en inglés, DBTBS) aplicando una p con valores de 0.1 y 0.5. Este programa busca motivos conservados de diferentes extensiones entre “regiones intergénicas corriente arriba” (de las siglas en inglés UPIR) de genes homólogos de bacterias Gram-positivas. El genoma usado como templete fue *B. subtilis subespecie subtilis* 168, el número total de genes usados fue de 4106 y el número de genes agrupados fue de 711 (17% del total) (Sierro *et al.*, 2008).

Tabla II. Cepas y plásmidos.

Cepa o plásmido		Genotipo relevante	Fuente
<i>B. subtilis</i>			
	MM2 (WT)	$\Delta(nprE) hisA glyB$ derivada de 168	Ferrari <i>et al.</i> , 1986.
	MM3	<i>tprC2 sacR::lacZ</i> $\Delta(pts'XHI)::erm$	Crutz <i>et al.</i> , 1990
	EMP06	MM2 pero <i>pfkA::sp</i>	Este trabajo
	MM4	MM2 pero <i>sacR::lacZ</i> $\Delta(pts'XHI)::erm$	Este trabajo
	EMP07	MM4 pero <i>pfkA::sp</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>			
	JM101	<i>supE thi (lac proAB)</i> (F' <i>traD36 proAB lacI^qZ M15</i>)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
Plásmidos			
	pDG1726	<i>sp</i> gene de <i>Staphylococcus aureus</i>	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995.
	pE512	pT7Blue con fragmento <i>pfkA-pykA</i> de 512 pb	Este trabajo
	pEH5	pE512 pero <i>pfkA::sp</i>	Este trabajo

VI.3 Cultivos y preparación de muestras.

El medio Luria-Bertani (LB) y el medio triptosa sangre agar base (TBAB) o medio MB fueron usados de manera rutinaria como medio de crecimiento de las cepas *E. coli* y *B. subtilis*, respectivamente (Sambrook *et al.*, 2001). Las cepas fueron crecidas aeróbicamente durante 72 horas en matraces de 2.8 L de capacidad con 500 ml de medio en agitación orbital a 300 rpm y 37°C. El medio para esporulación Schaeffer (SSM) (Anexo XI.2.1) fue usado para el estudio de las cinéticas, actividad enzimática y determinación de ácidos orgánicos a una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.8-0.9, T0, T2, T4. Para la determinación del proceso de esporulación en medio SSM se tomaron las muestras en los tiempos T4, T8 y T15. Además se utilizó medio mínimo Spizizen (SMM) (Anexo XII.2.2) suplementado con 2 g L⁻¹ glucosa como única fuente de carbono. Para la preparación de los inóculos, las cepas fueron crecidas en matraces con medio rico o medio mínimo suplementado con glicina, histidina, triptofano y metales traza (Harwood y Cutting, 1990). Los datos presentados son el promedio de al menos tres experimentos independientes. Para mayor detalle de los medios y suplementos, ver Anexo XI.2.

VI.4 Construcción de cepa mutante en *pts*.

La cepa mutante en *pts* se obtuvo por medio de la metodología de congresión (construcción de la cepa “isogénica”) descrita por Harwood y Cutting (1990) con ligeras modificaciones. En este procedimiento de transformación de un paso, la cepa MM2 se creció en medio MB (ver Anexo Xi.2) con agitación orbital a 300 rpm y a 37°C hasta que el cultivo alcanzó la fase logarítmica tardía (estadio de transición). La movilidad celular se revisó en el microscopio y se utilizó como marcador de la fase de competencia, se agregó aproximadamente 1 µg de ADN genómico de la cepa MM3 y se incubó por 1 hr. Las células se colectaron por centrifugación y el paquete celular se resuspendió en 0.2 ml de solución SC (0.15 M NaCl y 0.01M citrato de sodio) a pH 7. Se sembró 0.1 ml de suspensión no diluida en cajas con medio TBAB y eritromicina a concentración de 15 µg ml⁻¹. La extracción del ADN se llevó a cabo usando el protocolo modificado de Harwood y Cutting (1990). El paquete celular de un cultivo de aproximadamente 18 h a 37°C en agitación continua a 300 rpm, se resuspendió en solución amortiguadora (150 mM NaCl, 60 mM Tris pH 8, 15 mM EDTA pH 8). Para la extracción se utilizó lisozima 10 mg ml⁻¹, RNasa 10 mg ml⁻¹, SDS al 12.5% y proteinasa K 10 µg ml⁻¹. La purificación se realizó utilizando fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitando con NaCl 5M – isopropanol (Sambrook *et al.*, 2001).

VI.5 Construcción de la mutación en *pfkA* por inserción de cassette de resistencia.

Para la construcción de la mutante en *pfkA* se utilizó una clona de la biblioteca genómica de *B. subtilis* en fago lambda *gt11* que contiene un fragmento de *pfkA* y el gen completo de *pykA*. Se amplificó por PCR un fragmento de 512 pb que comprende 257 pb de la región final del gen *pfkA* y 255 pb de la región inicial del gene *pykA* (Figura 10). El fragmento obtenido de 512 pb fue subclonado como producto de PCR en un plásmido de nuestro laboratorio sin el sitio *HindIII* derivado de pT7Blue, y digerido con *EcoRV*, al que nombramos pE512. Este plásmido fue transformado, según protocolo del kit pT7Blue

(Novagen Inc.) usando la cepa de *E. coli* JM101, para lo cual se prepararon células competentes usando el protocolo según Sambrook *et al.* (2001). Las células transformadas fueron seleccionadas sembrando en medio LB conteniendo ampicilina y X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactopiranosido) e incubado a 37°C por 24 h. Las transformantes fueron sembradas en las mismas condiciones para corroborar las colonias seleccionadas. La purificación del plásmido se llevó a cabo mediante el kit de GlassMAX de GIBCO BRL (Gaithersburg, USA) según método sugerido por el proveedor. El fragmento clonado en el plásmido pT7Blue(R) (Novagen) se corroboró por PCR, utilizando *Taq* polimerasa (AmpliTaq™, Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, CT) y los oligonucleótidos pT7F y pT7R (Tabla III). También se corroboró por digestión con las enzimas de restricción *HindIII*, *AccI* y *EcoRV* y secuenciación.

La secuencia obtenida fue analizada con el programa DNASTar (LasserGene, Inc.). Se realizó un mapeo teórico con enzimas de restricción para localizar sitios únicos probables para la interrupción del gen. El plásmido pDG1726 (Guérout-Fleury *et al.*, 1995) que contiene el marcador de resistencia para espectinomicina (*sp*), un fragmento de 1.1 Kb, fue transformado y purificado usando la misma estrategia mencionada arriba. El cassette de *sp* de 1.1 Kb fue obtenido por digestión del plásmido con la enzima *HindIII*, para luego llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA) a 85 voltios por 2.5 h. Luego de teñir con bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 0.5 µg ml⁻¹, el gel fue lavado con agua destilada y visualizando con luz UV para identificar y cortar la banda de 1.1 Kb del gel, la cual fue machacada y tratada con fenol según método descrito por Sambrook *et al.*, (2001) para luego purificar por GlassMAX.

Para interrumpir el gen de *pfkA* el plásmido pE512 se digirió con *HindIII* y se purificó para eliminar la enzima de restricción. Una vez que se obtuvo el plásmido linealizado se llevó a cabo una reacción de ligación estándar usando T4 ADN ligasa siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Novagen Inc.), para lo cual se usaron 50 ng del plásmido y 100 ng del fragmento con el cassette de *sp*. La reacción de ligado fue transformada en células competentes de *E. coli* JM101. La selección de las transformantes se realizó como se mencionó al inicio de esta sección.

El plásmido con *pfkA* interrumpido por el cassette *sp*, llamado pEH5 (ver Tabla II), fue

usado para obtener la interrupción en cromosoma del gen *pfkA* de las cepas de *B. subtilis* silvestre y Δpts usando el procedimiento de transformación de un paso basado en el evento de doble recombinación homóloga (Harwood y Cutting, 1990), mencionado en la sección VI.4. El experimento se llevó a cabo tanto usando 1 μg de ADN del plásmido tanto circular como linearizado, sin diferencia en la eficiencia de transformación. Las recombinantes que contenían la mutación, seleccionada por resistencia a espectinomicina, fueron sembradas en dos ocasiones y crecidas en medio líquido para obtener ADN cromosomal usando el mismo protocolo mencionado en la sección VI.4, para posteriormente realizar amplificación por PCR y corroborar su interrupción.

VI.6 Amplificación por PCR.

Para corroborar la interrupción en cromosoma del gene *pfkA* se diseñaron los oligonucleótidos PFKintF que van desde el nucleótido 733 de *pfkA* y PYKintR que va desde el nucleótido 880 de *pykA* (Tabla III). La obtención del ADN cromosomal de las cepas fue realizado según se menciona en la sección VI.4. Se utilizó la enzima *Taq* polimerasa y el protocolo de reacción se llevó a cabo siguiendo las indicaciones recomendados por el fabricante con ligeras modificaciones como se menciona en seguida. La solución de reacción con 1 μg de ADN de cada cepa mutante y las cepas control, sin la interrupción de *pfkA*, fueron sometidas a un ciclo inicial de desnaturalización por 1 min a 95°C. Los tubos fueron colocados en hielo por 5 min para adicionar la enzima (2 U.I. por reacción). Después se sometieron a 30 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C y 120 segundos a 72°C. Por último se dió un ciclo de extensión terminal de 10 min a 72°C. Se corroboró la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt a concentración de 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y visualizado con luz UV.

VI. 7 Fermentación.

Para la realización de las cinéticas de crecimiento se partió de una asada de cultivo de los viales de almacenamiento de cada una de las cepas que se estirió en cajas Petri con medio LB y se incubó a 37°C por 12 h. Luego de tener crecimiento de colonias aisladas, una sola colonia se inoculó en un tubo de ensaye con 3 ml de medio Schaeffer y se creció aproximadamente por 18 h. De este preinoculo se tomó 1 ml para preparar el inóculo en 30 ml hasta alcanzar una DO_{600} 0.5. Las células fueron lavadas y utilizadas para inocular un matraz Fernbach de 2800 ml de capacidad conteniendo 500 ml de medio Schaeffer o medio mínimo Spizizen a pH 7. En todos los experimentos realizados, los matraces fueron inoculados con el mismo número de células y el estudio se realizó a 37°C y agitación orbital de 300 rpm, llevando a cabo un seguimiento hasta por 72 h. La concentración celular se determinó midiendo la turbidez de los cultivos a DO_{600} en un espectrofotómetro. A lo largo de los cultivos se monitoreo que no hubiese contaminación en los matraces. El medio para esporulación Schaeffer fue usado para el estudio de las cinéticas, actividad enzimática, determinación de ácidos orgánicos a DO_{600} de 0.8-0.9, y a los tiempos T0, T2, T4, y para el proceso de esporulación a T4, T8 y T15.

VI.8 Determinación de proteínas.

La concentración de proteína celular por mililitro de cultivo a DO_{600} de 0.8 se hizo mediante el procedimiento descrito por Lowry y colaboradores (1951) utilizando los reactivos: A (5% $CuSO_4$ en 1% tartrato de Na-K), B (2% Na_2CO_3 en 0.1N NaOH), C (B +A) y D (solución 1:1, Folin Ciocalteu + agua) (ver Anexo XI.3). La curva patrón fue determinada usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar a concentraciones de 0 a 600 $\mu g\ ml^{-1}$ (Sigma Co., St Louis, MO). Dicha curva estándar quedó definida con una correlación entre datos del 99.94%.

VI.9 Actividad enzimática de fosfofructocinasa

Para el análisis de actividad de fosfofructocinasa de las cepas de *B. subtilis* silvestre y mutante *pfkA*, las células se crecieron en medio Schaeffer a DO_{600} de aproximadamente 0.8. Veinticinco mililitros fueron centrifugados y llevados a 1 ml para el ensayo de Pfk. El paquete celular fue lavado con solución amortiguadora (50 mM Tris-acetato, 0.1 mM EDTA, 50% glicerol, 1 mM ditioneitol; pH 7.5) luego resuspendida y sonicada tres veces por 40 s con intervalos de 30 s según el método reportado por Solem y Jensen (2002). Las preparaciones que se sonicaron se mantuvieron en hielo todo el tiempo. Después de la sonicación el detritus celular y las células intactas fueron removidas por centrifugación a 20,000 g a 4°C por 20 min, para obtener el extracto celular. Como medida del grado de ruptura celular se hicieron determinaciones de la DO a 280 nm.

La actividad de Pfk fue llevada a cabo por una reacción acoplada, en la cual la producción de FBP conduce a la oxidación de NADH como lo reporta Fordyce *et al*, (1982) excepto por ligeras modificaciones en las concentraciones finales en la mezcla de ensayo que fueron de 1mM ATP, 1 mM fructosa 6-fosfato, 0.2 mM NADH, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM NH_4Cl . La reacción se estandarizó usando 0.3 U de triosa fosfato isomerasa (Tpi) por ml, 1 U de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GapA) por ml, y 0.3 U de aldolasa (Fba) por ml. La velocidad de reducción de NAD fue determinada por medición espectrofotométrica de la velocidad del cambio a A_{340} , manteniendo el espectrofotómetro (Beckman) a 25°C. A los resultados obtenidos de la actividad enzimática se les aplicó una regresión lineal para convertir los cambios de absorbancia (A_{340}) a actividad enzimática.

La actividad se reportan como unidades internacionales (UI) de enzima por miligramo de proteína ($U.I\ mg^{-1}$). Una UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de fructosa 1-6 bifosfato por minuto por miligramo de proteína. Los datos son presentados como el promedio de al menos tres experimentos independientes, y para cada experimento se realizó una curva de calibración de reacción usando de 1 a 5 unidades de enzima Pfk comercial. Todos los reactivos utilizados fueron de la casa comercial SIGMA. La fórmula utilizada para la obtención de la actividad enzimática específica total se encuentra citada en anexo XI.4.

VI.10 Actividad enzimática de piruvato cinasa

Para el análisis de actividad de Pyk de las cepas de *B. subtilis* silvestre y mutante *pfkA*, las células se crecieron en medio Schaeffer a DO_{600} de aproximadamente 0.8. Veinticinco mililitros fueron centrifugados y llevados a 1 ml de paquete celular para el ensayo de Pyk, el cual fue tratado básicamente según el método reportado por Diesterhaft y Freese (1972) con ligeras modificaciones. Utilizando solución amortiguadora de lavado (50 mM Tris-acetato pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoetanol) y en solución fría de sonicado (50 mM Tris-acético pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoetanol, 2 mM PEP). La muestra se mantuvo todo el tiempo en cama fría y fue sometida a periodos de sonicado a frecuencia de 18 micrones de amplitud por 15 s con un total de 1.5 min, sin contar los intervalos de reposo 30 s. Luego de sonicada, la muestra fue centrifugada a 37,000 g por 20 min a 4°C y se usó inmediatamente para realizar la determinación de actividad. Como medida del grado de ruptura celular se hicieron determinaciones de la DO a 280 nm. La reacción para la determinación de actividad enzimática específica de Pyk está acoplada a la formación de piruvato y la reacción catalizada por la enzima Ldh, esencialmente como se reporta en Malcovati y Valentini (1982) con ligeras modificaciones en las concentraciones: 50 μ M Tris-acetato pH 7, 250 μ M KCl, 10 μ M $MgCl_2$, 5 μ M ADP, 0.3 μ M NADH, 4 μ M PEP, 1 μ M AMP, 1 μ M FBP. La reacción se estandarizó usando 2.75 U Ldh en un volumen final de 1 ml. La velocidad de reducción de NAD fue determinada por medición espectrofotométrica de la velocidad del cambio de A_{340} , manteniendo el espectrofotómetro (Beckman) a 25°C. En ambas determinaciones de actividad enzimática se aplicó una regresión lineal para convertir los cambios de absorbancia (A_{340}) a actividad enzimática. La actividad se reporta como unidades internacionales (UI) de enzima por miligramo de proteína ($UI\ mg^{-1}$). Una UI se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol de piruvato o fructosa 1-6 bifosfato respectivamente, por minuto por miligramo de proteína. Los datos son presentados como promedio de al menos tres experimentos independientes y para cada experimento se realizó una curva de calibración de reacción usando de 1 a 10 unidades de

enzima Pyk comercial (SIGMA). La formula utilizada para la obtención de la actividad enzimática específica total se encuentra citada en anexo X.4.

VI.11 Determinación de ácidos orgánicos por HPLC.

Las células de las muestras del cultivo de cada cepa fueron eliminadas por centrifugación y los sobrenadantes fueron filtrados usando membranas con un tamaño de poro de 0.45 μm . La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo con un equipo Agilent serie 1100 con una bomba isocrática, usando una longitud de onda a 210/230 nm, y para la separación de los analitos se utilizó una columna ZORBAX 300 SB-C18 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Las soluciones concentradas y las diluciones de los estándares de cada ácido carboxílico (piruvato, acetato y lactato) fueron preparados usando agua ultrapura.

Las concentraciones usadas para cada uno de los estándares que sirvieron para hacer la curva de calibración fueron de 0.012, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 y 0.2 g L^{-1} . Se determinó el tiempo de retención promedio de cada uno de los estándares y la curva de calibración se obtuvo graficando en el eje Y la concentración y en el eje X el área de las unidades de absorbancia máxima (mAU). Como solución amortiguadora de corrimiento se utilizó 25 mM fosfato de potasio pH 3 y 0.3 % acetonitrilo. Todos los reactivos fueron grado HPLC de Sigma (St. Louis, MO, USA). Se llevó a cabo un HPLC fase reversa inyectando alícuotas de 20 μl de los filtrados y la fase móvil fue bombeada a 0.5 ml min^{-1} en el modo isocrático, manteniendo la columna a una temperatura aproximada de 25°C.

Los ácidos orgánicos en cada una de las muestras tomadas de cada una de las cepas fueron identificados en base a su tiempo de retención, tomando como referencia el obtenido con los estándares. Las áreas de mAU de cada uno de los ácidos carboxílicos determinados en las muestras fueron extrapoladas a cada una de las curvas estándares después de restar los valores presentes en el medio de cultivo solo. Los valores de los piruvato y acetato fueron obtenidos a 230 nm y el valor para el lactato fue a 210 nm y todos fueron expresados en g L^{-1} . Todas las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado, realizándose un análisis

estadístico para calcular que las desviaciones estándares relativas no fueron mayores del 10%.

VI.12 Determinación de ácidos orgánicos por GC/MS.

Cada muestra fue derivatizada con BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) y TMCS (trimetilclorosilano) como lo recomienda el fabricante (Supelco, Bellefonte, PA). Las concentraciones usadas de cada uno de los estándares que sirvieron para hacer la curva de calibración fueron de 10, 30, 50, 100 y 300 µg/L. Se determinó el tiempo de retención promedio de cada uno, tomando como referencia a las especies iónicas más abundantes y significativas por la técnica de ionización por impacto electrónico (EI). La curva de calibración para cada uno se obtuvo graficando en el eje Y la concentración del estándar, y en el eje X el área bajo los picos del ión más abundante representativo del ácido orgánico. Dos microlitros de cada muestra fueron aplicadas a un espectrómetro gases/masas (GC/MS) TurboMass Gold (PerkinElmer) usando una columna RTX-5 Sil (30 m, 0.32 mm). El puerto de inyección y la línea de transferencia fue mantenida a 250°C y la temperatura del horno se incremento usando una rampa de temperatura programado a 70°C x 1 min: 25 grado/min a 170°C x 1 min, y 35 grado/min a 270°C x 1 min. Los ácidos orgánicos en cada una de las muestras tomadas de cada una de las cepas fueron identificados en base a su tiempo de retención tomando como referencia el obtenido con los estándares. Las áreas del pico del ión más abundante representativo de cada uno de los ácidos carboxílicos determinados en las muestras fueron interpoladas a cada una de las curvas estándares. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado, realizándose análisis estadístico para calcular las desviaciones estándares no fueron mayores del 10%.

VI.13 Medición de esporas resistentes a calor.

La determinación del porcentaje de esporas resistentes a calor en cultivos celulares en diferentes puntos de la curva de crecimiento (T4, T8 y T15), fueron llevadas a cabo usando el

procedimiento descrito por Nicholson y Setlow (1990), con ligeras modificaciones. Se tomó medio de cultivo de cada uno de los puntos muestreados para diluir 10 veces en solución amortiguadora para esporas (10 mM K_2HPO_2 , 50 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) a pH 7.4 (ver Anexo X.2.6). A partir de esta dilución inicial se llevaron a cabo las diluciones subsiguientes, se sembró 0.1 ml de cada una de ellas por duplicado. Cada una de las diluciones restantes se colocó en un baño con agua a 80° C por 10 minutos y se sembró de la misma manera. Después de incubar toda la noche a 37° C, por conteo de colonias se determinó la proporción de sobrevivencia al tratamiento por calor.

VI.14 Evaluación de datos.

El procesamiento de los datos generados en la caracterización de las diferentes cepas bacterianas en los diferentes medios de cultivo, fueron procesados usando el software estadísticos Sigma Plot, Sigma Stat, Excel.

VII. Resultados

VII. 1 Análisis teórico del motivo de transcripción.

La matriz de motivos disponibles en DBTBS son el resultado del agrupamiento de regiones conservadas de diferentes tamaños entre las regiones intergénicas corriente arriba (UPIR), basadas en genes homólogos de bacterias Gram-positivas. Las UPIR de cada subgrupo conteniendo más de 2 miembros son alineados usando el programa Clustal W y basados en la información del contenido, se calcula el grado de conservación de al menos 300 posiciones de los alineamientos representando los nucleótidos directamente corriente arriba del inicio de la secuencia del gen (Sierro *et al.*, 2008). Usando este programa DBTBS seleccionando un valor de $p=0.01$, localizamos los motivos de transcripción teóricos en la UPIR entre los genes *pfkA* – *accA* (acetil CoA carboxilasa) (Figura 10) y encontramos sitios de unión de factores de transcripción como DegU y ResD. Al realizar el análisis usando un valor de $p=0.05$ encontramos los sitios de unión para AhrC, Fur, HrcA y un sitio adicional para DegU. En la UPIR de *pykA* – *pfkA* no encontramos ningún motivo a los valores de p usados, pero sí se localizó el sitio Shine Dalgarno (SD) mostrado por Muñoz *et al.* (1997). Adicionalmente, usando el mismo programa, localizamos dos motivos hexaméricos, uno a -163 del punto de inicio de *pfkA* y el otro a -54 del punto de inicio de *pykA*. Utilizando la secuencia completa de *pfkA* y aplicando un valor de $p=0.05$, encontramos sitios de unión para factores de transcripción tales como AbrB, PucR, MntR, CodY, FNR, SigA, SigD, SigF y dos sitios para SigB; pero ninguno a $p=0.01$.

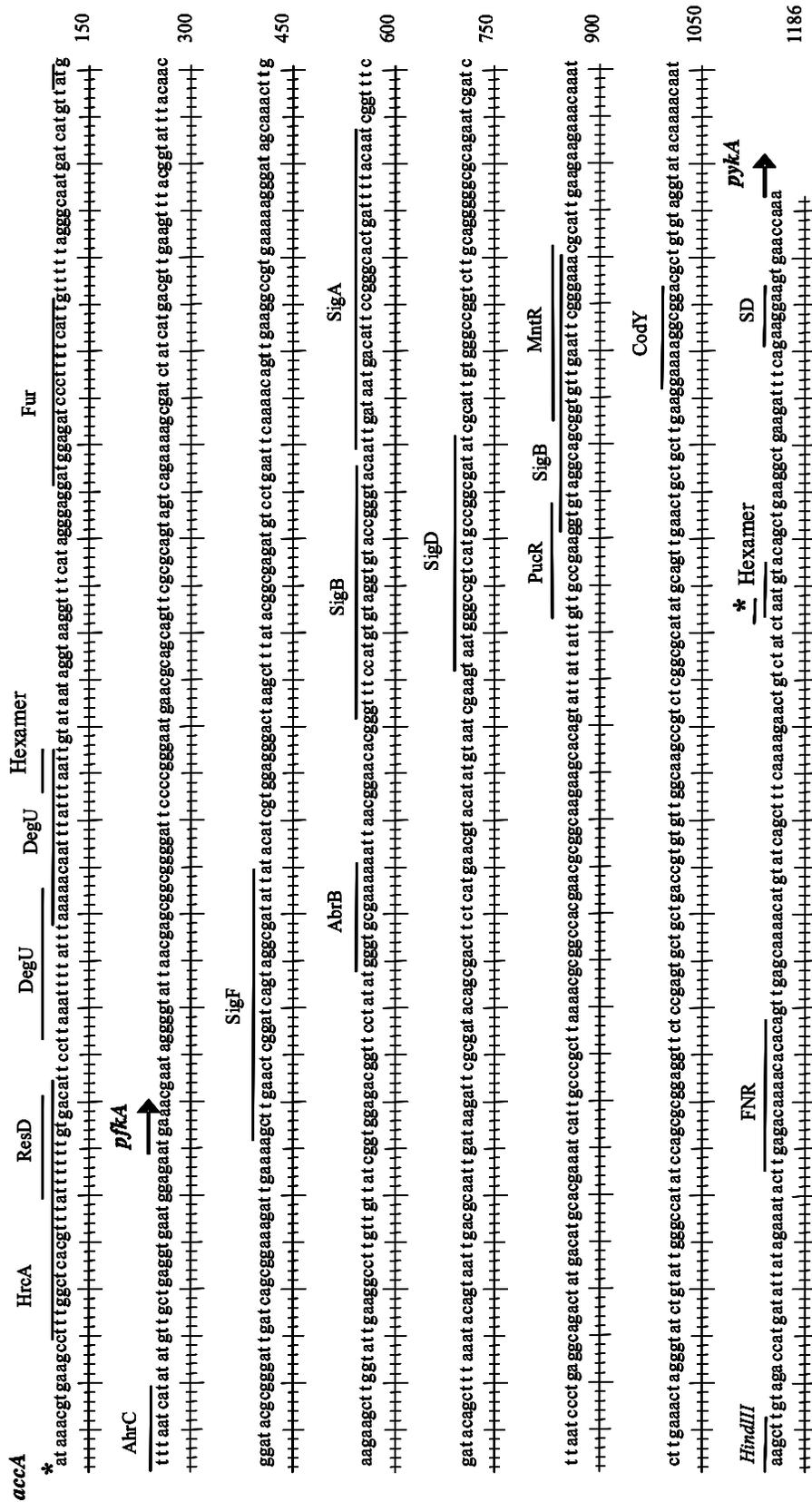


Figura 9. Localización de los sitios teóricos de transcripción usando el programa DBTBS. En la región intergénica de *accA-pfkA*: HrcA, ResD, degU, motivohexamérico, Fur y AhrC. En la secuencia del gen *pfkA*: SigF, AbrB, SigB, SigA, SigD, PucR, SigB, MntR, CodY, FNR, motivo hexamérico y sitio de corte *HindIII*. La región intergénica *pfkA-pykA*: Shine Dalgarno (SD). *accA*, acetil CoAcarboxilasa; *pfkA*, fosfofructocinasa; *pykA*, piruvato cinasa. El asterisco señala el final de la secuencia del gen.

VII.2 Construcción de la mutante *pfkA*.

Se determinó la secuencia del fragmento *pfkA-pykA* clonado en el plásmido pE512 y el análisis teórico de dicha secuencia mostró que posee un sitio de corte único para la enzima de restricción *Hind*III en el fragmento de *pfkA* (Figura 11). En este sitio único de restricción se insertó el fragmento de 1.1 Kb que tiene el marcador de resistencia para espectinomicina (*sp*), obtenido por digestión con *Hind*III del plásmido pDG1726 (Guérout-Fleury *et al.*, 1995) y al plásmido con *pfkA* interrumpido se le llamó PEH5 (Figura 12). La interrupción del gen en el plásmido PEH5, se corroboró por selección con *sp* así como por amplificación de fragmento por PCR usando los oligos pT7F y pT7R descritos en sección VI.5 (Figura 13). La interrupción en cromosoma del gen *pfkA* en las cepas de *B. subtilis* se obtuvo por doble recombinación homóloga del fragmento con el gen interrumpido en plásmido PEH5 y se corroboró por marcadores de resistencia a antibióticos y PCR. Para la amplificación del fragmento *pfkA-pykA*, se diseñaron el oligonucleótido sentido PFKA y el antisentido PYKA (Tabla IV). El producto amplificado por PCR fue de 1142 pb para la cepa silvestre (Figura 14), en contraste con el fragmento de 2242 pb observado para las mutantes en *pfkA* (EMP06 y EMP07).

Tabla IV. Oligonucleotidos

Nombre	Secuencia	Referencia
pT7F	5'-GACCATGATTACGCCAAGCTC-3'	Este trabajo
pT7R	5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTG-3'	Este trabajo
PFKintF	5'-CTGTATTGGGCCATATCCAGC-3'	Este trabajo
PYKintR	5'-CCGCACGAGTCGGACGCGGGT-3'	Este trabajo

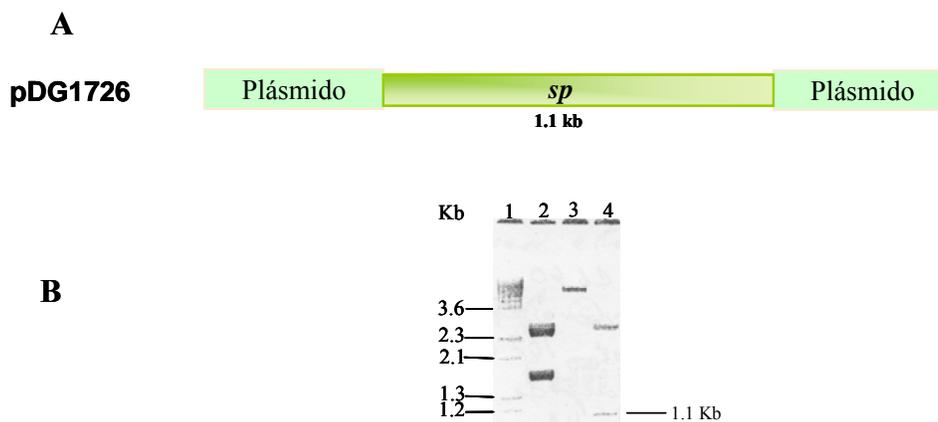


Figura 11. A) Plásmido pDG1726 con fragmento de 1.1 Kb que contiene el gen *sp* que codifica para la enzima que degrada el antibiótico espectinomicina. B) Gel de agarosa: carril 1, marcador de peso molecular; carril 4, banda del fragmento de *sp*.

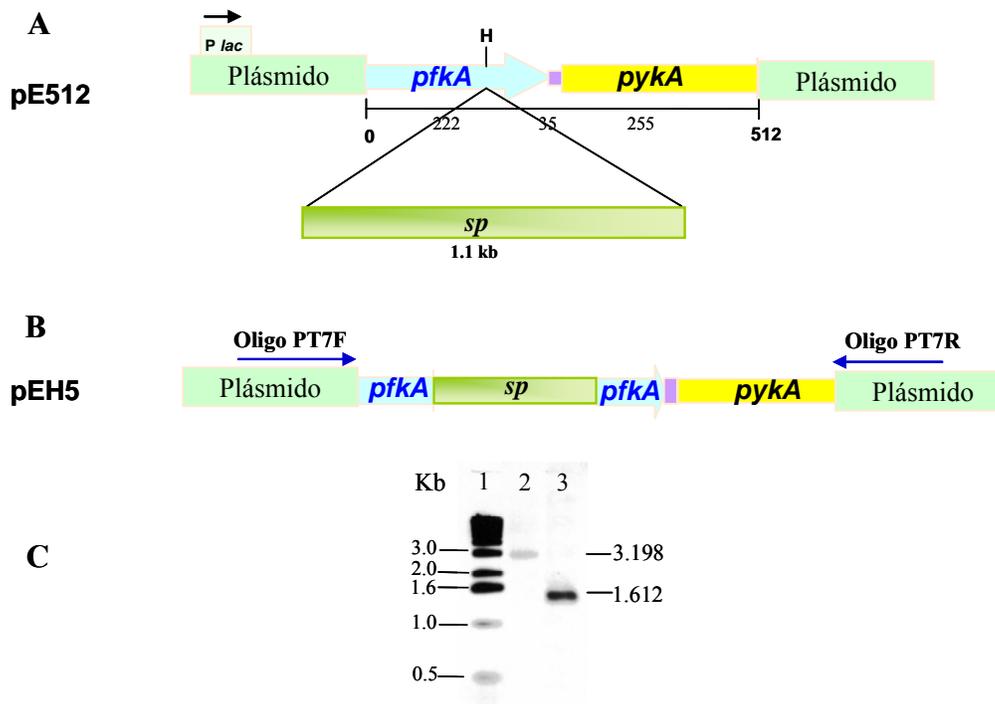


Figura 12. A) Plásmido pE512 con fragmento *pfkA*. B) Obtención de la interrupción de *pfkA* con cassette de resistencia a espectinomicina. C) Gel de agarosa: carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, plásmido pEH5; carril 3, fragmento amplificado por PCR con interrupción de *pfkA*.

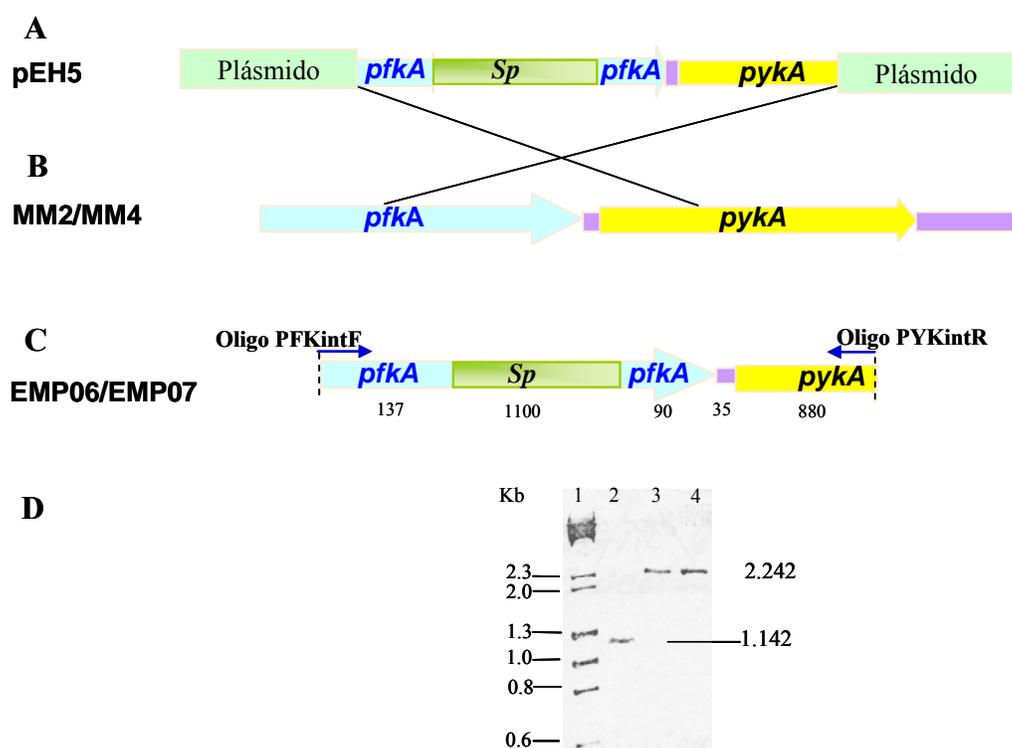


Figura 13. A) Plásmido con *pfkA* interrumpido con *sp*. B) Operón *pfkA-pykA* en cromosoma de cepas silvestre y *pts*. C) Obtención de la mutación *pfkA* en cromosoma. D) Gel de agarosa: carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, fragmento amplificado de 1.142 Kb sin interrupción de *pfkA*; carril 3 y 4, fragmento de amplificación de 2.242 Kb a partir de cromosoma con *pfkA* interrumpido

VII. 3 Actividad enzimática.

El gen *pfkA* y el gen *pykA* de *B. subtilis* están en el mismo operón (Muñoz *et al.*, 1997). Debido a que *pykA* se encuentra inmediatamente corriente abajo del gen *pfkA* (Figura 14), fue necesario determinar si la interrupción cromosomal de *pfkA* afectaba la función del gen *pykA*. La interrupción del gen *pfkA* fue corroborada por la actividad enzimática muy baja de Pfk medida a partir de extracto crudo de la cepa mutante *pfkA*. La actividad específica de Pfk en la cepa silvestre fue de 0.4 ± 0.07 UI mg^{-1} de proteína mientras que para la cepa mutante *pfkA* fue de 0.02 ± 0.06 UI mg^{-1} de proteína. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la actividad específica de PykA fue similar tanto en la cepa silvestre (0.6 ± 0.08 UI mg^{-1} de proteína) como en la mutante en PfkA (0.7 ± 0.09 UI mg^{-1} de proteína).

VII. 4 Caracterización de los cultivos.

Para evaluar el efecto de la inactivación del gene *pfkA* en los fondos genéticos silvestre y Δpts en el crecimiento celular se llevaron a cabo cultivos en dos medios diferentes: SSM y SMM con glucosa (2 g L^{-1}) como única fuente de carbono. Como se puede ver en la Figura 15A, la mutación *pfkA* afectó el crecimiento celular aún en el medio rico Schaeffer. En este medio el tiempo de generación de la mutante *pfkA* fue 43.5% más alto que el de la cepa silvestre (Tabla III). Es interesante observar que la mutación *pts pfkA* causó un incremento discreto en el tiempo de generación (19%) comparado con la cepa silvestre, la cual fue muy similar al crecimiento mostrado por la mutante *pts*.

El efecto de la inactivación de *pfkA* fue más evidente cuando las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono, como se ve reflejado en la fase lag o de adaptación prolongada (Figura 15B). Como se puede ver en la Tabla III, la mutante *pfkA* tiene un tiempo de generación 45% más alto que el de la cepa silvestre. A diferencia del cultivo en medio rico, las mutantes *pts* y *pts pfkA* mostraron un crecimiento muy bajo en medio mínimo.

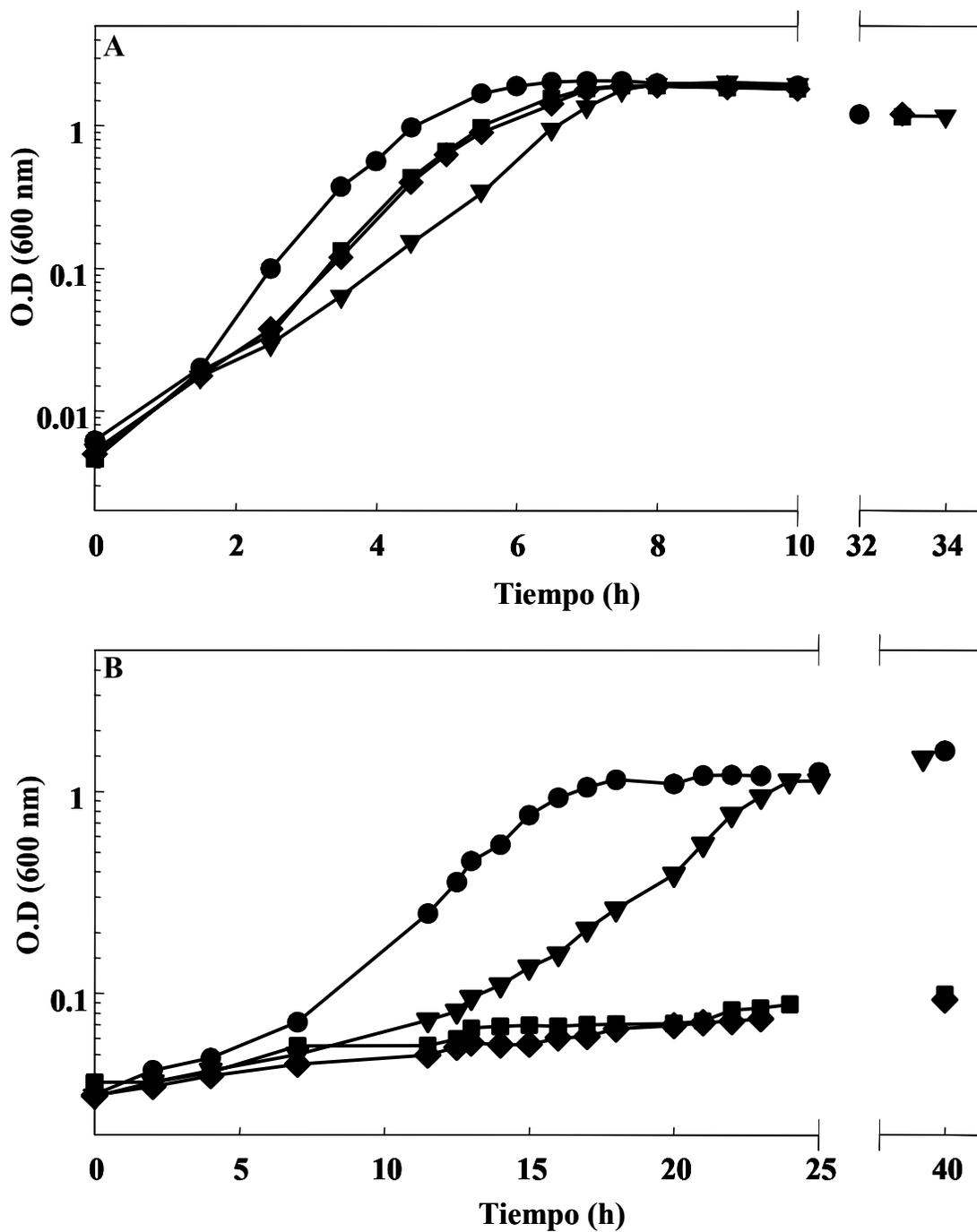


Figura 14. Cinética de crecimiento. A) En medio de esporulación Schaeffer, y B) Medio mínimo Spizizen (ver texto). Cepas silvestre ●, *pfkA::sp* ▼, *pts* ■, *pts pfkA::sp* ◆.

VII. 5 Determinación de la esporulación.

Para estudiar el impacto de la mutación *pfkA* en la esporulación, se cuantificó el porcentaje de esporas en diferentes puntos de la curva de crecimiento después de que los cultivos han alcanzado la fase estacionaria. No se observaron esporas a tiempo iniciales cuando las cepas fueron crecidas en medio mínimo con glucosa. Sin embargo, en medio de esporulación Schaeffer se obtuvieron resultados interesantes. Como se muestra en la Tabla IV, en los puntos de los tiempos iniciales, la mutante *pfkA* produjo más esporas que la cepa silvestre. Sin embargo, a T15, ambas cepas alcanzaron el mismo porcentaje de esporulación. Asimismo, la mutante *pts* produjo menos esporas en todos los tiempos muestreados en comparación con las otras cepas, excepto por la cepa silvestre a T8, la cual mostró un 13.4% de esporas. Es interesante observar que a T4, la doble mutante *pts pfkA* produjo alrededor de diez veces más esporas que las formadas por la mutante *pfkA*, y casi 23 veces más esporas que la cepa silvestre. Sin embargo a T15 la doble mutante *pts pfkA* produjo alrededor de 1.7 veces más esporas que las formadas por la mutante *pfkA* y la cepa silvestre.

Tabla IV. t_{DS} y esporulación

Cepa	Genotipo Relevante	t_D (min) ^a		% de esporulación ^b		
		SSM ^b	SMM ^c	T4	T8	T15
WT	$\Delta(nprE)$ <i>hisA glyB</i> derivada de 168	37.2 (\pm 1.62)	120 (\pm 3.80)	0.07(\pm 0.08)	13.4(\pm 0.80)	32.4(\pm 0.78)
<i>pfkA</i>	MM2 pero <i>pfk::spc</i>	53.4 (\pm 1.68)	174 (\pm 3.32)	0.19(\pm 0.01)	27.3(\pm 0.60)	30.1(\pm 0.57)
<i>pts</i>	MM2 pero $\Delta(pts'XHI)::erm$	43.1 (\pm 1.40)	ND ^d	0.01(\pm 0.00)	19.0(\pm 0.66)	19.0(\pm 0.53)
<i>pfkA pts</i>	MM4 pero $\Delta(pts'XHI)::erm$, <i>pfk::spc</i>	44.3 (\pm 1.90)	ND ^d	1.60(\pm 0.06)	22.2(\pm 0.57)	51.3(\pm 0.45)

^a Datos presentados como el promedio de al menos tres experimentos independientes.

^b SSM = Medio de esporulación Schaeffer.

^c SMM = Medio mínimo Spizizen.

^d ND = No determinado.

VII.6 Impacto de la mutación *pfkA* sobre la formación de ácidos orgánicos.

Con el fin de evaluar el impacto de las mutaciones en algunos de los ácidos orgánicos más importantes producidos por *Bacillus*, se utilizó HPLC para determinar el perfil de la formación de los piruvato, acetato y lactato, y en diferentes puntos de la curva de crecimiento en medio rico. Los tiempos de retención establecidos para cada uno de los controles fueron: piruvato, 3.6 min; acetato, 4.0 min y; lactato, 4.3 (Figura 16).

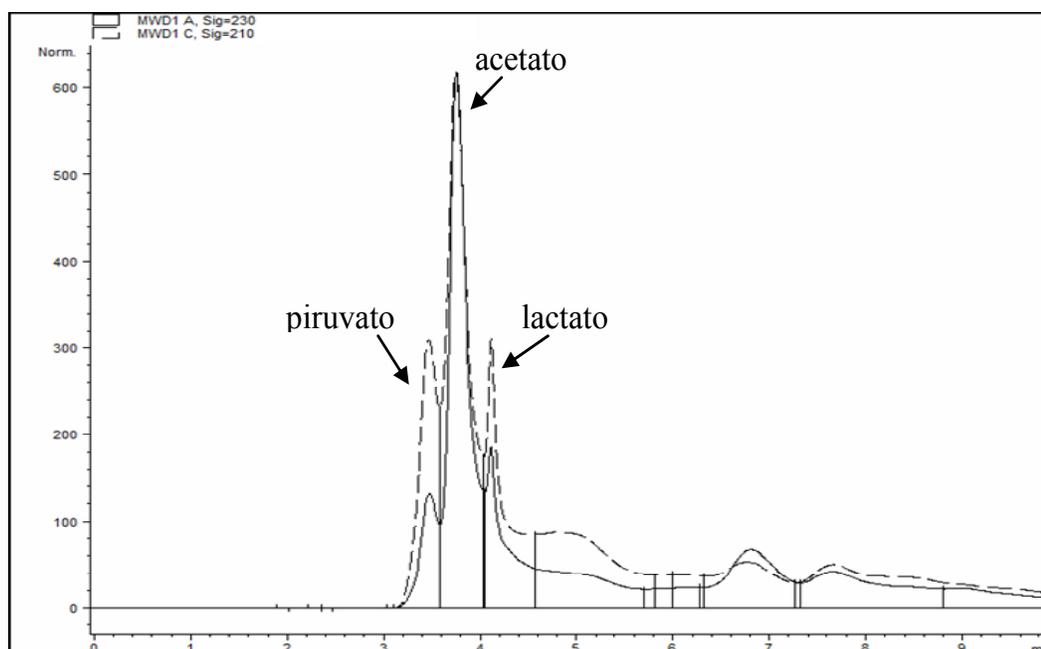


Figura 15. Tiempos de retención de los ácidos carboxílicos por HPLC. Normalización de escala de las lecturas a 210 nm (línea punteada) y a 230 nm (línea continua), usando medio de cultivo enriquecido con estándares comerciales.

Como se muestra en la Figura 17, solamente las mutantes *pfkA* y *pts* mostraron niveles detectables de lactato. La cepa mutante *pfkA* mostró los valores más altos en todos los tiempos muestreados excepto por la fase media logarítmica en la que el nivel fue de cero. La cepa mutante *pts* mostró lactato solamente a T0, cuando la concentración fue 62.3% más baja que los niveles mostrados por la mutante *pfkA* en el mismo tiempo.

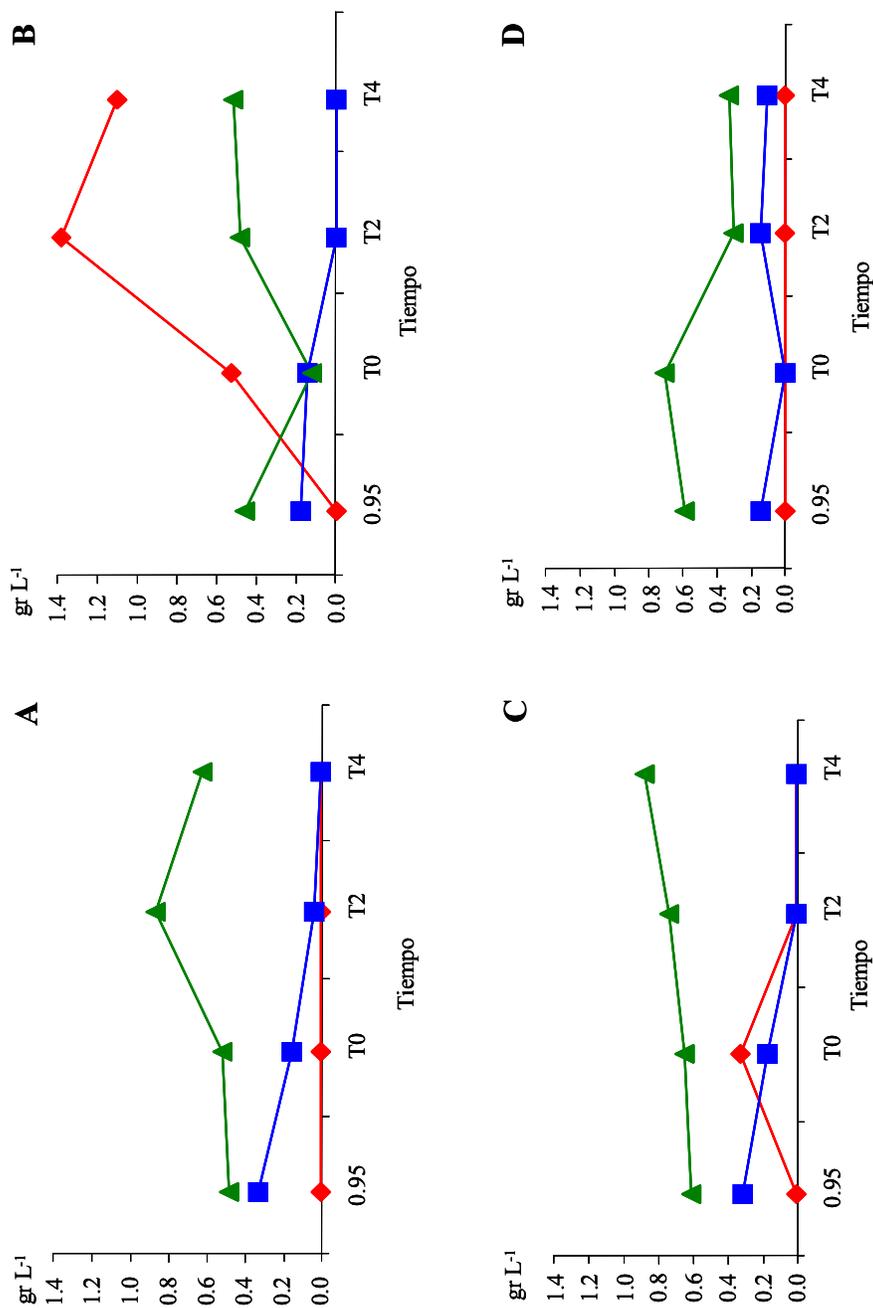


Figura 16. Determinación de ácidos orgánicos por HPLC. Fermentación en lote en medio Schaeffer de las cepas silvestre (A), mutante *pfs* (B), mutante *pfs* (C), mutante *pfs* (D). Las muestras de los cultivos fueron tomadas en la fase media exponencial (DO₆₀₀ 0.85 o 0.95) y fase estacionaria (T0, T2 y T4). —♦— ácido láctico; —■— ácido piruvico y —▲— ácido acético.

Es interesante observar que la concentración de piruvato en todas las cepas, excepto para la mutante *pts pfkA*, tiende a disminuir un 10-20% a través del tiempo. En la fase media logarítmica la mutante *pfkA* y la doble mutante *pts pfkA* mostraron valores más bajos de piruvato que los mostrados por la cepa silvestre, 54.5% y 42.4% respectivamente. En T0, los valores del piruvato fueron muy similares en todas las cepas (silvestre, 0.15; *pfkA* 0.14; *pts* 0.17 g L⁻¹) excepto para la doble mutante *pts pfkA*, en la cual no se detectó piruvato. En comparación con la fase logarítmica media, en T0 las cepas silvestre y *pts* mostraron un decremento del 54.0% y la mutante *pfkA* de un 22.2%. En T2, la doble mutante produjo 73.33% más piruvato que la cepa silvestre y en T4 la doble mutante *pts pfkA* fue la única cepa con valores detectables (0.11 g L⁻¹).

Los valores obtenidos para acetato (Figura 17) fueron mayores que los otros ácidos carboxílicos probados, excepto en la cepa *pfkA* a T0 (0.13 g L⁻¹). Contrario al perfil del piruvato, el acetato mostró valores similares (dentro de 10-20%) entre los tiempos muestreados excepto para la mutante *pts*, la cual mostró una aparente acumulación progresiva. El acetato fue el producto principal de fermentación producido por la cepa silvestre así como por las mutantes *pts* y *pts pfkA*. La cepa *pfkA* mostró valores de acetato bajos, especialmente a T0 comparado con la mayoría de las cepas en todos los puntos, pero mostró valores más altos que la doble mutante *pts pfkA* a T2 (36.7%), ya T4 (34.6%).

El uso de HPLC lleva a cabo la separación, identificación y cuantificación de los ácidos carboxílicos presentes en el medio de cultivo, y la señal obtenida permite llevar a cabo el análisis cuantitativo exacto a nivel de nanogramos. Pero no existe un detector universal y sensible para llevar a cabo un análisis cualitativo por HPLC. En cambio las técnicas espectroscópicas como MS combinada con GC proporciona información más compleja para la identificación de los ácidos carboxílicos. Estas en general se relacionan con sus características estructurales específicas, basadas en la detección de un espectro de la relación masa/carga de los iones en fase gaseosa. El análisis GC/MS de las muestras, presentó abundancia relativa de especies iónicas significativas para el derivado TMS-ácido carboxílico comparado con su control (Figura 18). Esto nos permitió corroborar con

sensibilidad alta y potente criterio de pureza la identificación de lactato y acetato realizada en HPLC.

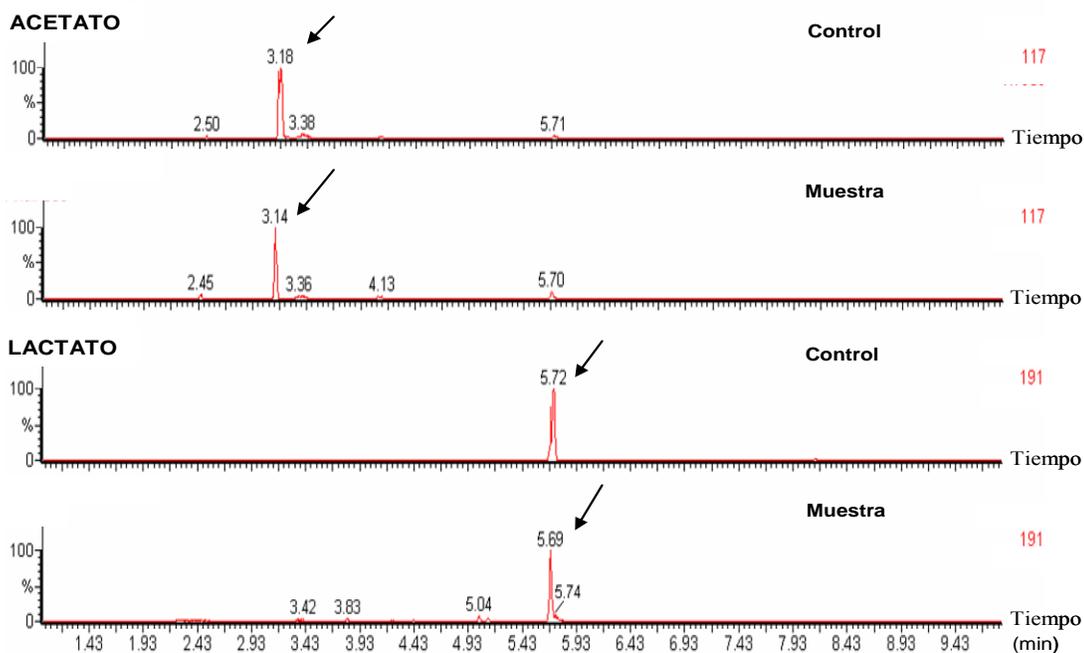


Figura 17. Tiempos de retención del ión determinante de ácidos carboxílicos por GC/MS. La flecha indica el ión más abundante y significativo en el control y en la muestra de cultivo.

Para el derivado TMS-acetato, fueron los iones $M^+ + H = 133$, $M^+ = 132$, $M^+ - CH_3 = 117$, $M^+ - 2CH_3 = 102$, $M^+ + H - 3CH_3 = 88$. Para el derivado TMS-lactato las especies iónicas fueron $M^+ = 234$, $M^+ - H = 223$, $M^+ - CH_3 = 219$, $M^+ - 2CH_3 = 204$, $[M^+ - C_6H_{15}O_3Si_2]^+ = 191$, $[M^+ - C_5H_{11}O_3Si]^+ = 147$ y se tomó como representativo el ión 191. Por otro lado, para la determinación de piruvato, obtuvimos una señal muy baja en el MS, lo que nos impidió obtener un cálculo con buena correlación para cada una de las concentraciones.

La figura 19, muestra el valor de abundancia relativa del ión representativo de lactato y de acetato, en cada una de las muestras que también fue analizadas por HPLC. La gráfica obtenida de esta manera muestra cierta tendencia similar a la mostrada por HPLC, a pesar de las diferencias en las concentraciones resultantes del tratamiento de cada una de las muestras para el análisis por GS/MS.

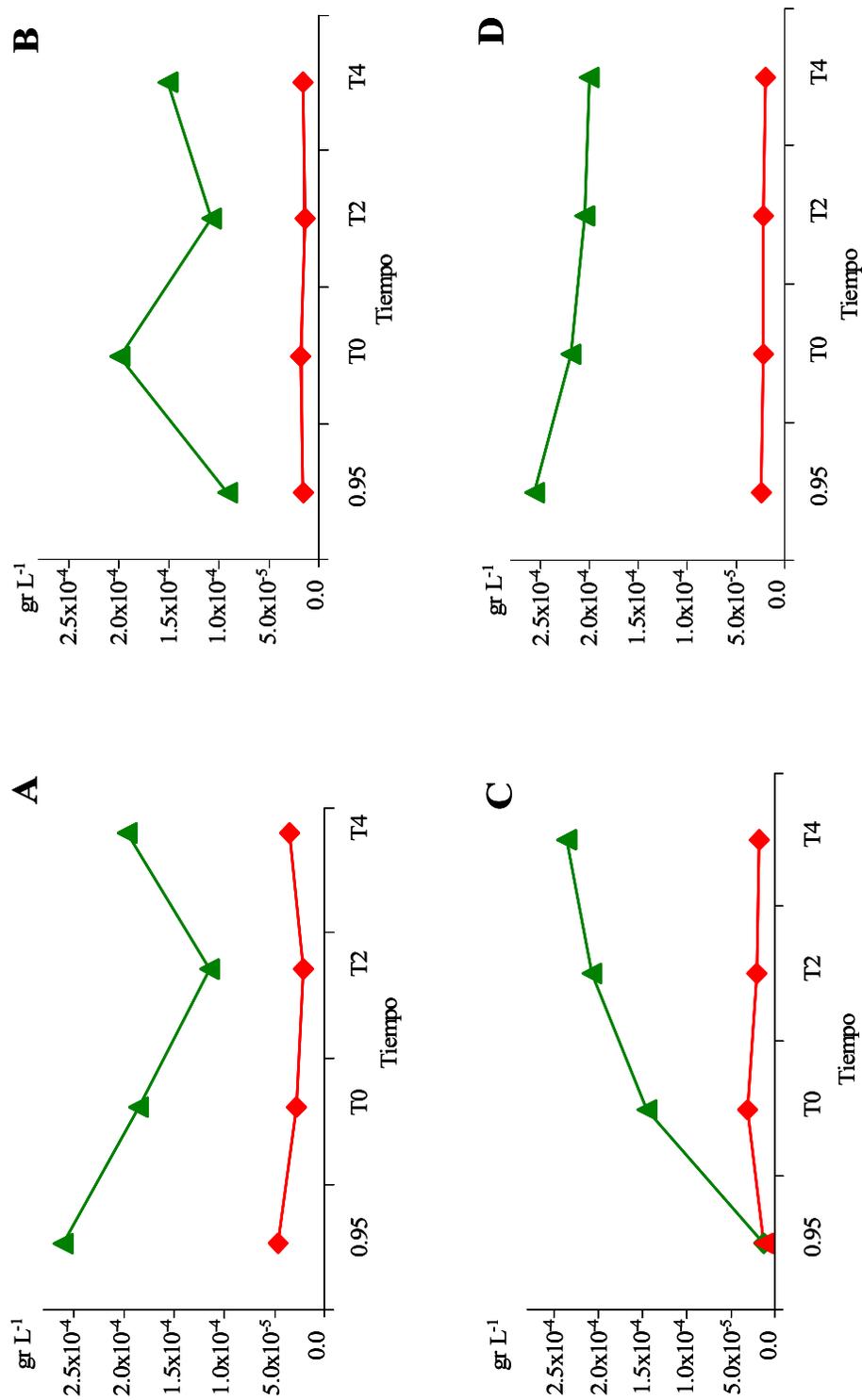


Figura 18. Determinación de ácidos orgánicos por GC/MS. Cepas silvestre (A), mutante *pfkA* (B), mutante *pts* (C), mutante *pts pfkA* (D). Las muestras de los cultivos fueron tomadas en la fase media exponencial (OD_{600} 0.85 o 0.95) y fase estacionaria (T0, T2 y T4). —♦— ácido láctico; —▲— ácido acético

VIII. Discusión

El propósito de este estudio fue investigar el efecto metabólico y fisiológico de la inactivación de *pfkA* tanto en el fondo genético silvestre como del carente de PTS de *B. subtilis*. A pesar de que el gen *pykA* está inmediatamente corriente debajo del gene *pfkA* formando un operón constitutivo en *B. subtilis* (Muñoz *et al.*, 1997), la actividad de piruvato cinasa de la cepa mutante *pfkA* fue muy similar a la mostrada por la cepa silvestre. Resultados similares fueron obtenidos con las cepas mutantes de *Lactococcus lactis* en la cual el promotor del operon *las*, que está formado por *pfk*, *pyk*, and *ldh*, fue remplazado por un promotor sintético. Los resultados mostraron que disminuyó dos veces la actividad de Pfk, mientras que las actividades de PykA y de LDH permanecieron cercanas a las mostradas por la cepa silvestre (Andersen *et al.*, 2001).

Resulta interesante ver que en el análisis teórico usando el programa DBTBS, los motivos de transcripción en el operón *pfkA pykA* de *B. subtilis* sugieren un motivo hexamérico corriente arriba de los genes *pfkA* y *pykA* que puede tener funciones reguladoras. Del mismo modo, la secuencia de *pfkA* sugiere la presencia de sitios de unión de factores de transcripción para proteínas de estrés, las cuales son inducidas en respuesta a diferentes condiciones ambientales tales como choque térmico, reguladores pleiotrópicos, limitaciones de glucosa y oxígeno o estrés oxidativo. Como ha sido señalado por Sierro y colaboradores (2008), las regiones conservadas indican potenciales sitios de unión de factores de transcripción menores o especializados, los cuales se unen típicamente solo a algunos sitios del genoma; alternativamente, pueden indicar sitios de unión blanco de reguladores globales, lo cual ocurre menos frecuente. En este sentido la co-ocurrencia de los motivos encontrados en nuestro análisis pudiera proporcionar información interesante acerca de la coregulación por algunos factores de transcripción. *B. subtilis* hace uso extensivo de factores σ secundarios para activar coordinadamente grupos de genes bajo condiciones celulares específicas. El análisis de la secuencia genómica de *B. subtilis* ha mostrado que ésta codifica para al menos 7 miembros de la familia de funciones extracitoplásmicas (ECF) los cuales no habían sido identificados antes de la secuenciación

genómica (Helmann, 2002). Estudios adicionales podrían ayudar a entender la relación entre estos factores y la activación de genes.

La ausencia de la actividad de PfkA tiene un fuerte impacto en la fisiología de *B. subtilis*. El tiempo de generación de la mutante en *pfkA* en el fondo genético silvestre se encontró significativamente más elevado en medio mínimo con glucosa a 2 g L^{-1} , la cual es la fuente de carbono y energía preferencial de *B. subtilis*. Sin embargo, al final del cultivo la mutante *pfkA* alcanzó una densidad óptica muy similar a la de la cepa silvestre. Por otro lado, cuando la mutante *pfkA* se creció a 5 g L^{-1} no se observó crecimiento. Este último resultado coincide con los generados por las mutantes obtenidas por mutagénesis con metil metanosulfonato, debido a que las mutantes *pfkA* fueron incapaces de crecer en este medio mínimo con glucosa a 5 g L^{-1} (Freese *et al.*, 1972). Similarmente, la mutante *pfkA* obtenida por transducción del bacteriófago PSB1, es incapaz de crecer en Medio C suplementado con 5 g L^{-1} glucosa (Gay y Delobbe, 1977; Gay *et al.*, 1983). Esta cepa, sin embargo tiene mutaciones adicionales en los genes *purB*, *sacA* y *metC*, y posiblemente en otros genes que pudieran interferir con los efectos metabólicos y fisiológicos directamente relacionados con Pfk. Las cepas en las cuales las enzimas EI, HPr, and EIII^{Glc} de PTS fueron inactivados ($\Delta ptsXHI$) mostraron crecimiento residual en glucosa, lo cual apoya la posibilidad de que exista un sistema adicional de incorporación de glucosa en *B. subtilis* como lo sugiere Gonzy-Tréboul *et al.*, (1991). Los candidatos independientes a PTS para la toma de glucosa son los transportadores de glucosa GlcP y GlcU (Paulsen *et al.*, 1998). La glucosa intracelular originada del transporte de glucosa independientemente de PTS o de la degradación de disacáridos es fosforilada por la glucosa cinasa (Stülke y Hillen, 2000).

Considerando que el medio Schaeffer es un medio rico y que varios aminoácidos pudieran dar lugar a ácidos carboxílicos (por ejemplo, piruvato y lactato) sin la participación de cinasas catabólicas, los efectos observados en las mutantes *pfkA* fueron inesperados. Todas las cepas mostraron tiempos de generación más bajos en medio rico que en medio mínimo. Sin embargo, el incremento en el tiempo de generación de la mutante *pfkA* en relación a la cepa silvestre fue muy similar tanto en medio mínimo como en medio rico (43% en SSM vs. 45% en SMM). Un incremento en la concentración de azúcares fosfato corriente arriba de la vía

glicolítica como pueden ser glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato pudieran explicar los cambios en la fisiología de la célula, debido a que estos compuestos pueden ser tóxicos a altas concentraciones (Fraenkel, 1968). Es posible que el flujo de carbono en la mutante *pfkA* pudiera ser redirigido a la vía de las pentosas, la cual puede ser usada para el catabolismo de la glucosa en *B. subtilis* (Sauer *et al.*, 1996). La vía de las pentosas sirve para dos funciones principales: proporciona NADPH necesario para reacciones anabólicas y generar precursores para la biosíntesis de triptófano y nucleótidos (Fortnagel, 1993; De Wulf, 1998; Sonenshein, 2002). Las mutantes de *L. lactis* (*las*) con una actividad de Pfk reducida también mostraron disminución en el crecimiento en medios complejos cuando fueron comparadas con la cepa silvestre, lo que sugirió la acumulación de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato (Andersen *et al.*, 2001).

Los efectos de las mutantes *pfkA* y/o PTS pudieran también ser debidos a cambios en las pozas de PEP y FBP de *B. subtilis*, los cuales a su vez pudieran afectar la regulación de ciertas enzimas alostéricas. A ciertas concentraciones PEP es un inhibidor de la actividad de Pfk (Fordyce *et al.*, 1982), proporcionando un mecanismo de regulación del flujo glicolítico. En *B. stearothermophilus*, se ha mostrado que PEP inhibe alostericamente a Pfk por disminución de la afinidad de la enzima a su sustrato, la fructosa 6-fosfato (Kimmel y Reinhart, 2000).

El incremento en la poza de PEP se ha usado para producir compuestos de importancia biotecnológica. Cepas de *E. coli* carentes de PTS, han sido modificadas adicionalmente por la introducción de mutaciones en los genes *pyk* con el fin de incrementar el aporte intracelular de PEP para la producción de DAH (P) (Gosset *et al.*, 1996). Además, PTS juega un papel en muchos aspectos diferentes de la fisiología de la célula bacteriana. Las funciones primarias incluyen toma de azúcares, transporte y fosforilación, mientras que las funciones secundarias incluyen una variedad de ramificaciones de la regulación metabólica y transcripcional (Saier, 2001). PTS también es requerido para la quimiotaxis (Stock *et al.*, 1989). Esto también es posible ya que el transporte y catabolismo de otros carbohidratos no evaluados en este trabajo como por ejemplo fructosa, pudieran estar siendo afectados en las mutantes PTS. Mutantes de *B. subtilis* en *ptsH* (defectiva in HPr) son incapaces de usar fructosa o maltosa, y crecen muy lentamente con glucosa (Stülke *et al.*, 1995). Una mutación sencilla en PTS (*crr*)

de *E. coli* (defectiva en EIII^{Glc}) lleva a cabo una represión de manera simultánea para cuatro sistemas catabólicos/transporte (glicerol, lactosa, maltosa y melobiosa) (Saier y Roseman, 1976).

A pesar de las mutaciones en *pfkA* y en PTS, todas las cepas fueron capaces de alcanzar la misma densidad óptica final en medio Schaeffer. Estos resultados sugieren que finalmente todas las cepas, son capaces de obtener suficientes bloques de biosíntesis presentes en el medio de cultivo. La presión de selección natural ha forzado a *B. subtilis* a desarrollar una red de adaptación complicada y altamente sofisticada para el balance de la expresión de los genes con las condiciones ambientales.

En cualquier organismo, la utilización eficiente de las fuentes de energía y carbono es importante para una competencia exitosa en ambientes naturales. Sin embargo, cuando las células están adaptándose a cambios en su ambiente, estas llevan a cabo un cambio en la síntesis de proteínas, predominantemente de aquellas que son vitales para la respuesta adaptativa al estrés impuesto. Para evitar el desperdicio de nutrientes, las células estresadas frecuentemente detienen la producción de proteínas no esenciales. La mayoría de proteínas involucradas en la fase adaptativa continúan siendo abundantes y es frecuente que aún se encuentren en niveles suficientes para continuar llevando a cabo sus funciones celulares (Bandow y Hecker, 2007).

Dentro de las funciones celulares los procesos de esporulación son muy complejos y son gobernados de manera estricta por redes de regulación que coordinan las señales intra y extracelulares relacionadas con: el suplemento de nutrientes, el estado metabólico de la célula, la densidad celular y la posición de la bacteria en el ciclo celular (Ireton *et al.*, 1993; Perego y Hoch, 1996). Este fenómeno es aceptado universalmente como un modelo base de la diferenciación bacteriana. Un aspecto del control fisiológico de estas redes es el papel metabólico y de señalización del TCA. Existe una fuerte correlación entre TCA y esporulación que se refleja en el hecho de que las enzimas de TCA están inducidas al máximo (Fortnagel y Freese, 1968; Craig *et al.*, 1997). Se presume que tal inducción de TCA al final de la fase de crecimiento exponencial permite a las células de la fase

estacionaria metabolizar completamente productos secundarios de la glicólisis como piruvato, lactato, acetato y acetoína, produciendo así energía, poder reductor y biosíntesis de intermediarios para la biosíntesis de RNA, proteínas, peptidoglicanos y lípidos necesarios para la formación de la espora (Matsuno *et al.*, 1999)

Cuando las cepas de nuestro estudio fueron crecidas en medio mínimo con glucosa no se observaron esporas a tiempo iniciales. Esos resultados eran los esperados pues como se sabe una fuente de carbono rápidamente metabolizable como la glucosa puede suprimir el establecimiento de la esporulación hasta que la fuente de carbono es completamente consumida (Freese *et al.*, 1972).

La inactivación de PfkA en un fondo genético silvestre causó cambios en el tiempo y porcentaje de células que se fueron a esporulación en medio de esporulación Schaeffer, sugiriendo que PfkA es necesaria para la esporulación normal de *B. subtilis*. Estos resultados sugieren que una deficiencia en PfkA, da señales a la célula para la formación temprana de esporas, sin provocar cambios en el porcentaje final de esporas. Estos resultados difieren de los obtenidos con la cepa mutante *pfkA* obtenida por mutagénesis química por Freese *et al.* (1972), ya que las mutantes esporularon normalmente en medio de esporulación amortiguado con fosfatos (NSMP) y suplementado con metionina y triptofano. En contraste, células mutantes carentes de enzimas del ciclo de Krebs como la citrato sintasa, aconitasa e isocitrato deshidrogenasa, han mostrado ser defectivas en la iniciación de la esporulación y en la expresión de genes controlados por Spo0A~P (Ireton *et al.*, 1995). La doble mutante *pts pfkA* mostró resultados interesantes ya que se obtuvo una alta concentración de esporas, especialmente en tiempos iniciales (T4), en comparación con todas las otras mutantes. La habilidad de muchos microorganismos, entre ellos *Bacillus*, para producir altas concentraciones de esporas en un corto periodo de tiempo de cultivo es comercialmente atractivo para el desarrollo de productos tales como bio-insecticidas (Brar *et al.*, 2006).

Los pasos enzimáticos centrales que unen a los intermediarios de los pasos iniciales de las vías de la glicólisis y de pentosas fosfato hacia el ciclo de Krebs son necesarios para la degradación de azúcares a ácidos orgánicos del ciclo de Krebs, pero también son necesarios para las reacciones en dirección opuesta. *B. subtilis* puede usar compuestos gluconeogénicos como única fuente de carbono y energía para proveer a la célula con glucosa-6-fosfato, ribosa-5- fosfato y glicerol-3- fosfato, los cuales son requeridos para la biosíntesis de diversas macromoléculas (Stülke y Hillen, 2000; Deutscher *et al.*, 2002).

Debido a que Pfk y PTS son nodos de regulación importantes en glicólisis, la interrupción de Pfk y PTS y su concomitante alteración de los metabolitos intermediarios, pudieran representar un estrés general para la célula, de manera similar a las señales de estrés y de carencia de nutrientes incluyendo sales, ácidos, estrés térmico o limitación de energía en general, descrito por Vijay *et al.* (2000).

Al utilizar glucosa como fuente de carbono, se ha descrito que por cada dos moléculas de PEP producidas en la vía glicolítica, una es usada por PTS para la internalización de la glucosa para producir glucosa-6-fosfato y piruvato, mientras que la otra molécula de PEP puede ser metabolizada por la piruvato cinasa para producir más piruvato. El incremento del 50% de la concentración de piruvato en la fase media logarítmica de *pfkA* comparada con la de la cepa silvestre, se vio reflejado en el incremento de los valores del lactato observado en la mutante *pfkA* crecida en medio rico. Estos resultados sugieren que en ausencia de fosfofructocinasa la glucosa-6-P, pudiera ser redireccionada hacia la vía de las pentosas y pudiera entrar nuevamente a la vía glicolítica como gliceraldehído-3-P, el cual continúa a través de la glicólisis para formar piruvato (Figura 6). Adicionalmente, diferentes aminoácidos como alanina, lisina, valina, isoleucina y leucina, presentes en el medio rico como es el medio Schaefer, pueden dar lugar a la formación de piruvato. El piruvato es un compuesto clave para el TCA, y también puede ser reducido a lactato y otros compuestos como el acetato, acetyl-CoA, etanol, acetolactato, diacetil, acetoina y 2, 3-butanediol (Nakano *et al.*, 1997). La LDH cataliza la reducción de piruvato con la simultánea oxidación de una molécula de NADH por molécula de piruvato reducido (Cruz *et al.*, 2000).

El NAD^+ regenerado es liberado para servir como una coenzima a la gliceraldehído 3-fosfato (Salway, 1999). De esta manera la glicólisis continúa, pero el lactato se acumula.

En el presente trabajo el acetato fue identificado como el mayor producto de fermentación en la cepa silvestre en medio rico, como ha sido descrito en la literatura para *E. coli* y *B. subtilis* (Ponce, 1999; Presecan-Siedel *et al.*, 1999). Sin embargo, esta molécula fue también el mayor metabolito secundario detectable durante el crecimiento de las mutantes *pts* y *pts pfkA*. El lactato no fue detectado en ninguno de los tiempos excepto en T0 para la cepa mutante *pts*. Este resultado sugiere que en medio rico, aún en ausencia del sistema PT, el acetato es el metabolito principal de la conversión del piruvato a ACoA, y de la reacción de dos pasos catalizada por fosfotransacetilasa (Pta) y acetato cinasa (Ack). Debido a que una molécula de ATP es producida por cada molécula de acetato, esta es la vía de fermentación más eficiente energéticamente hablando. La síntesis de acetato permite la fosforilación a nivel de sustrato sin la regeneración de NADH; sin embargo, las vías que conducen a lactato no pueden ser usadas para la conservación de la energía. Esta observación es concordante con los altos niveles de acetato producidos por la mutante *pfkA*, la cual mostró los tiempos de generación más altos en los cultivos realizados en el medio Schaeffer.

Asimismo, una vez que el pH del medio ha caído por debajo de cierto límite, la bacteria hace un cambio hacia la formación de solvente, como el etanol, lo cual permite la regeneración de NADH pero no la producción de un ATP extra (Dürre *et al.*, 2002). Un medio rico como el SSM, contiene intermediarios del ciclo de Krebs y precursores de la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos. Por lo tanto, la producción de energía por glicólisis y la formación de acetato puede estar acoplada al anabolismo bajo estas condiciones, aún cuando la producción de energía no este al máximo como ha sido mencionado por Dauner *et al.* (2001).

Se ha propuesto que los organismos heterótrofos como *B. subtilis* tienen una ventaja selectiva si son optimizados hacia una elevada síntesis de ATP más que hacia un elevado rendimiento de ATP, porque esto les permite competir exitosamente con otras células que

tienen un metabolismo más bajo (Pfeiffer *et al.*, 2001). Se han observado patrones similares de regulación de las vías metabólicas centrales cuando se comparan patrones de expresión global de *E. coli* crecidas en glucosa o en acetato (Oh *et al.*, 2002).

Un aspecto interesante a considerar es que la ausencia de PfkA pudiera cambiar los niveles de compuestos fosforilados en la célula, por lo tanto afectar enzimas reguladas por este metabolito intermediario como Pyk y Ldh (Fordyce, 1982). La Pfk también pudiera estar involucrada en algunos aspectos del metabolismo celular tales como los asociados a funciones adicionales del PTS. Este trabajo y estudios actualmente en progreso concernientes a un microarreglo fenotípico y al análisis de transcriptoma en *Bacillus* pudieran ayudar a aclarar el papel de la Pfk en el metabolismo del carbono y la fisiología de la célula.

IX. Conclusiones

La inactivación del gen *pfkA* en el genoma de *B. subtilis* no afectó la actividad de la enzima piruvato cinasa que se encuentra en el mismo operón.

La ausencia de la enzima fosfofructocinasa mostró un fuerte impacto en la fase exponencial del crecimiento de *B. subtilis*, viéndose afectado en un 43% en medio rico y en un 45% en medio mínimo, lo que sugiere que PfkA es un gen clave de la glicólisis no solo en medio mínimo sino también en medio rico.

El sistema PTS es indispensable para el crecimiento de las cepas silvestres y mutantes en *pfkA* en medio mínimo con glucosa.

Las mutantes *pfkA* y *pts* en la fase estacionaria alcanzaron la misma densidad óptica final que la cepa silvestre en los medios mínimo y rico, lo que sugiere que finalmente todas las cepas fueron capaces de obtener suficientes bloques biosintéticos para crecer.

La inactivación del gen *pfkA* en el fondo genético silvestre causó cambios tanto en el tiempo como en el porcentaje de esporas en medio rico, sugiriendo que PfkA es necesaria en la esporulación normal de *B. subtilis*.

En medio rico la inactivación de PTS en el fondo genético silvestre y carente de *pfkA* provocó cambios importantes en el porcentaje de esporas, así como en el perfil y concentración de ácidos orgánicos analizados, piruvato, acetato y lactato.

La cepa silvestre y mutantes *pts* y *pts pfkA* produjeron acetato como el principal producto de fermentación ácido-mixta, la cual es la vía de fermentación más eficiente a nivel energético.

La mutante *pfkA* mostró altos niveles de lactato junto con acetato lo que sugiere que se dieron modificaciones metabólicas importantes que promovieron por un lado la regeneración del NAD para la continuación de la glicólisis, así como una síntesis eficiente de ATP a nivel de sustrato.

La cepa silvestre y las mutantes *pfkA* y *pts* mostraron el mismo perfil de aumento gradual de piruvato y de acetato en las últimas fases, a diferencia de la doble mutante en donde la concentración de acetato disminuyó en T2 y T4 mientras el piruvato aumentó.

Alto nivel de esporas de la mutante *pts pfkA* coincide con la disminución de la producción de acetato.

X. Perspectivas

Estudiar la posibilidad de que la fosfofructocinasa pudiera cambiar los niveles de compuestos fosforilados en la célula por lo tanto afectar las enzimas reguladas por su metabolito intermedio.

La PfkA también pudiera estar involucrada en algunos otros aspectos del metabolismo celular como los relacionados con PTS.

La realización de ensayos de microarreglos fenotípicos y análisis de transcriptoma pudieran ayudar a clarificar el papel de PfkA en el metabolismo del carbono y fisiología de la célula.

Estudiar el efecto de la mutación en *pfkA* en la redirección del flujo de carbono y utilización de vías alternativas para el catabolismo de glucosa.

XI. Literatura citada

Albertini, A.M., T. Caramori, F. Scoffone, C. Scotti y A. Galizzi 1995. Sequence around the 159 degree region of the *Bacillus subtilis* genome: *pksX* locus spans 33.6 kb. *Microbiology* 141:299-309.

Allert, S., I. Ernest, A. Poliszczak, F.R. Opperdoes y P.A.M. Michels. 1991. Molecular cloning and analysis of two tandemly linked genes for pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 200: 19-27.

Anagnostopoulus, C. y J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81:741-746.

Andersen, H.W., C. Solem, K. Hammer y P. Jensen. 2001. Twofold reduction of phosphofruktokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and glycolytic flux. *J. Bacteriol.* 183(11): 3458-3467.

Archibald, F. S. y M.N. Duong. 1984. Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 158:1-8.

Babasaki, K., T. Takao, Y. Shimonishi y K. Kurahashi. 1985. Subtilosina A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochem.* 98:585-603.

Bandow, J.E. y M. Hecker. 2007. Proteomic profiling of cellular stresses in *Bacillus subtilis* reveals cellular networks and assists in elucidating antibiotic mechanism of action. *Prog. Drug Res.* 64(79): 80-101.

Barnes, S. J. y P.D.J. Weitzman. 1986. Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster. *FEBS Lett.* 201:267-270.

Bauer, C. E., S. Elsen y T.H. Bird, 1999. Mechanisms for redox control of gene expression, *Ann. Microbiol.* 53: 495-523.

Bloxham, D.P., M.G. Clark, P.C. Holland y H.A. Lardy. 1973. Inactivation of phosphofruktokinase by 6-mercapto-9- β -D-ribofuranosylpurine 5'-triphosphate. *Biochemistry.* 12(8):1596-601.

Boer S. A. y B. Diderichsen. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl. Biotechnol.* 36: 1-4.

Brar, S.K., M. Verma, R.D. Tyagi, J.R. Valéro y R.Y. Surampalli. 2006. Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water Res.* 40(6): 1310-1320.

Brutsche, S., y V. Braun. 1997. SigX *Bacillus subtilis* replaces the ECF sigma factor FecI of *Escherichia coli* is inhibited by RsiX. *Mol. Gen. Genet.* 256:416-425.

Burbulys D, K.A. Trach y JA.Hoch. 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* 64: 545-52.

Burkholder, P.R., y N. H. Giles. 1947. Induced biochemical mutation in *Bacillus subtilis*. *Am. J. Botany* 34; 345-348.

Chibazakura, T., F. Kawamura y H. Takahashi. 1991. Differential regulation of spo0A transcription in *Bacillus subtilis*: glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. *J Bacteriol.* 173:2625-32.

Clarke, S y J. Mandelstam. 1980. Dissociation of an early event in sporulation from chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol.*121(2):487-90.

Craig, J.E., M.J. Ford, D.C. Blaydon y A.L. Sonenshein. 1997. A null mutation in the *Bacillus subtilis* aconitase gene causes a block in Spo0A-phosphate-dependent gene expression. *J. Bacteriol.* 170:7351-7359.

Crutz, A.M., M. Steinmetz, S. Aymerich, R. Richter y D. LeCoq. 1990. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*; an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 172:1043-1050.

Cruz Ramos, H., T. Hoffmann, M. Marino, H. Nedjari, E. Presecan-Siedel, O. Dressen, P. Glaser y D. Jahn. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expresión. *J. Bacteriol.* 182:3072-3080.

Dandekar, T., M.S. Schuster, B. Snel, M. Huynen y P. Bork. 1999. Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* 343, 115-124.

Dauner, M., T. Storni y U. Sauer. 2001. *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J. Bacteriol.* 183(24): 7308–7317.

DBTBS, Available from <http://dbtbs.hgc.jp>.

De Wulf, P. 1998. Presence of the ribulose monophosphate pathway in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 144(Pt 3): 596–597.

- Deutscher, J., A. Galinier y I. Martin-Verstraete. 2002. Carbohydrate uptake and metabolism. En: Sonenshein, A. Hoch y J. Losick, R (eds), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. Wahington, C.D. pp 129-150.
- Deutscher, J., E. Kuster, U. Bergstedt, V. Charrier y W. Hillen. 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 15(6): 1049–1053.
- Diesterhaft, M., y E. Freese. 1973. Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 248:6062-6070.
- Diesterhaft, M.D. y E. Freese. 1972. Pyruvate kinase of *Bacillus subtilis* *Biochim. Biophys. Acta.* 268:373-380.
- Dubnau, D. 1991. the regulation of the genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5:11-18.
- Dürre, P., Böhringer, M., Nakotte, S., Schaffer, S., Thormann K. y B. Zickner. 2002. Transcriptional regulation of solvent genesis in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4(3): 295–300.
- Emmerling, M., J.E. Baley y U. Sauer, 2000. Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioengineer.* 67(5): 623-627.
- Errington, J., y R.G. Wake 1991. Chromosome strand segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5:1145-1149.
- Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Reviews.* 57:1-33.
- Ferrari E., S.M.H. Howard y J.A. Hoch. 1986. Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J. Bacteriol.* 166:173-179.
- Ferrari E. y J.A. Hoch. 1989. Genetics. In Harwood C. R. (ed). *Bacillus* biotechnology. Vol. 2. Plenum Press, New York. USA. pp 57-72.
- Ferrari E., A.S. Jarnagin y B.F. Schmidt. 1993. Commercial Production of extracellular enzymes. En: Sonenshein, A.L., J.A. Hoch y R. Losick (eds). *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp 917-939.

- Fillinger, S., S. Boschi-Muller, S. Azza, E. Dervyn, G. Branlant y S. Aymerich. 2000. Two glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a non photosynthetic bacterium. *J. Biol. Chem.* 275:14031-14037.
- Fisher, S.H. y A.L. Sonenshein. 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol.* 45:107-35. Review.
- Fisher, S.H. 1999. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Mol Microbiol.* 32:223-32.
- Fitz-James, P. y E. Young. 1969. Morphology of sporulation. En: Hurst, A. y G.W. Gould (eds.). *The bacterial spore*. London: Academic Press Inc. (London) Ltd. pp. 39-72.
- Flindt, M.H.L. 1969. Pulmonary disease due to inhalation of derivatives of *Bacillus subtilis* containing proteolytic enzyme. *Lancet.* ii:1177-81.
- Fordyce, A.M., C.H. Moore y G.G. Pritchard. 1982. Phosphofructokinase from *Streptococcus lactis*. *Methods Enzymol.* 90(Pt E): 77-82.
- Fordyce, A.M., V.L. Crow y T.D. Thomas. 1984. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 48(2): 332-337.
- Fortnagel, P y E. Freese. 1968. Analysis of sporulation mutants. II. Mutants blocked in the citric acid cycle. *J. Bacteriol.* 95:1431-1438.
- Fortnagel, P. 1993. Glycolysis. En: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch y R. Losick. (eds.). *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC. pp. 171-180.
- Foster S.J y K. Johnstone. 1990. Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. *Mol Microbiol.* 4:137-41.
- Fraenkel, D.G. 1968. The accumulation of glucose 6-phosphate from glucose and its effect in a *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 243(24): 6451-6457.
- Fraenkel, D.G. 1992. Genetics and intermediary metabolism. *Annu. Rev. Genet.* 26:159-177.
- Freese, E., W. Klofat y E. Galliers. 1970. Commitment to sporulation and induction of glucose-phosphoenolpyruvate transferase. *Biochim, Biophys. Acta* 222:265-289.
- Freese, E. 1972. Sporulation of bacilli, a model of cellular differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 7: 85-124. Review.

- Freese, E., Y. Oh, E.B. Freese, M.D. Diesterhaft y O. Prasad. 1972. Suppression of sporulation of *Bacillus subtilis*. En: Spores V. Halvorson, H.O., R. Hanson y L.L. Campbell (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 212-221.
- Freese, E. y J. Heinze. 1983. Metabolic and genetic control of bacterial sporulation. En: A. Hurst y G.W. Gould (eds.). The bacterial spore. Vol. 2. London: Academic Press Inc. (London) Ltd. pp. 101- 172.
- Fujita, Y., K.-I. Yoshida, Y. Miwa, N. Yanai, E. Nagakawa y Y. Kasahara. 1998. Identification and expesion of the *Bacillus subtilis* fructose-1, 6-bisphosphatase gene (*fbp*). J. Bacteriol. 180:4309-4313.
- Garrigues, C., P. Loubiere, N.D. Lindley y M. Cocaign-Bousquet. 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. J. Bacteriol. 179(17): 5282–5287.
- Gay, P., P. Cordier, M. Marquet y M. Delobbe. 1973. Carbohydrate metabolism and transport in *Bacillus subtilis*. A study of *ctr* mutations. Mol Gen. Genet. 121:355-368.
- Gay, P. y A. Delobbe. 1977. Fructose trasport in *Bacillus subtilis*. Eur. J. Biochem. 79(2): 363-373.
- Gay, P., H. Chalumeau y M. Steinmetz. 1983. Chromosomal localization of *gut*, *fruC*, and *pfk* mutations affecting genes involved in *Bacillus subtilis* D-Glucitol catabolism. J. Bacteriol. 153(3): 1133-1137.
- Gonzy-Tréboul, G. y M. Steinmetz. 1987. Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: cloning of the region containing the *ptsH* and *ptsI* genes and evidence for a *crr*-like gene. J. Bacteriol. 169:2287-2290.
- Gonzy-Tréboul, G., M. Zagorec, M.-C. Rain-Guion y M. Steinmetz. 1989. Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH*, and the 5'-end of *ptsI* genes and evidence for a *ptsHI* operon. Mol. Microbiol. 3:103-112.
- Gonzy-Tréboul G., J.H. de Waard, M. Zagorec y P.W Postma. 1991. The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for IIGlc and IIIGlc domains. Mol Microbiol. 5:1241-9.
- Gordon, R.E., W.C. Haynes y C.H.-H. Pang. 1973. The genus *Bacillus*. United States Departament of Agriculture, Washington, D.C.
- Gosset, G., Yong-Xiao, J. y A. Berry. 1996. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Indus. Microbiol. 17:47-52.

Grossman A.D y R. Losick. 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 85(12):4369-73.

Grossman, A.D. 1991. Integration of developmental signals and the initiation of sporulation in *B. subtilis*. Cell. 65:5-8.

Guérout-Fleury, A.M., K. Shazand, N. Frandsen y P. Stragier. 1995. Antibiotic resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. Gene. 167:335-336.

Haldenwang, W.G. y R. Losick. 1979. A modified polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. Nature 283:256-260.

Hanson, R.S y D.P. Cox. 1967. Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. J Bacteriol. 93:1777-87.

Hanson, R.S., V.R Srinivasan y H.O. Halvorson. 1963. Biochemistry of sporulation: I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cell. J. Bacteriol. 85:451-460.

Harwood, C.R. y M. Cutting (ed.). 1990. Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley and Sons, USA.

Harwood, C.R. y A.R. Archibald. 1990. Growth, maintenance and general techniques. En: C.R. Harwood y M Cutting (ed). Molecular biological methods for *Bacillus*. pp. 435-439. John Wiley and Sons, USA. pp.1-19.

Harwood, C.R. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: Molecular biological and industrial workhorses. TIBTECH 10:247-256.

He, X., Y.T. Shyu, S. Nathoo, S.L. Wong y R.H Doi. 1991. Construction and use of a *Bacillus subtilis* mutant deficient in multiple protease genes for the expression of eukaryotic genes. Ann N Y Acad Sci. 27:69-77.

Hederstedt, L. 1993. The Krebs cytric acid cycle. En: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch y R. Losick (eds.). *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp.181-197

Helmann, J.D. 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. Adv Microb Physiol. 46:47-110. Review.

Henkin, T.M., F.J. Grundy, W.L. Nicholson y G.H. Chambliss. 1991. Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a *trans*-acting gene product homologous to the *E coli lacI* and *galR* repressors. Mol. Microbiol. 5(3):575-584.

Henkin, T.M. 1996. The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Lett. 135:9-15.

Hitchins, A.D. 1978. Polarity and topology of DNA segregation and septation in cells and sporangia of the bacilli. *Can J Microbiol.* 24(10):1104-34. Review.

Hoch, J.A. 1971. Genetic análisis of pleiotropic negative sporulation mutants in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 105:896-901.

Hoch JA. 1993. Regulation of the onset of the stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Adv Microb Physiol.*35:111-33. Review.

Hoffmann, T., B. Troup, A. Szabo, C. Hungerer y D. Jahn. 1995. The anaerobic life of *Bacillus subtilis*. Cloning and characterization of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:219-225.

Ireton, K., D.Z. Rudner, K.J. Siranosian y A.D. Grossman. 1993. Integration of multiple developmental signal in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes & Development.* 7:283-294.

Ireton, K., S. Jin, A.D Grossman y A.L. Sonenshein. 1995. Krebs cycle function is required for activation of the Spo0A transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28;92(7):2845-9.

Jolliffe, L.K., R.J. Doyle y U.N. Streips. 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 25:753-63.

Kambourova, M., M. Tangney y F.G. Priest. 2001. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1004-1007.

Keynan, A. y N. Sandler. 1983. Spore research in historical perspective. En: Hurst, A. y G.W. Gould (eds.). *The bacterial spore.* Vol. 2. London: Academic Press Inc. (London) Ltd. pp. 1-48.

Kimmel, J.L. y G.D. Reinhart. 2000. Reevaluation of the accepted allosteric mechanism of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(8): 3844-3849.

Klier, A.F. y G. Rapoport. 1988. Genetics and regulation of carbohydrate catabolism in *Bacillus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 42:65-95.

Koebmann, B, C. Solem y P.R. Jensen. 2005. Control analysis as a tool to understand the formation of the las operon in *Lactococcus lactis*. *FEBS J.* 272(9):2292-303.

Krom, B.P., J.B. Warner, W.N. Konings, J.S. Lolkema. 2000. Complementary metal ion specificity of the metal-citrate transporters CitM and CitH of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182:6374-6381.

Kunkel, B. 1991. Compartmentalized gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. Trends in Biotechnol. 7:167-172.

Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M.G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S.C. Briginell, Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Danie, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Hasahara, Y., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hoson, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauer, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Medallo, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognini, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H. Yoshikawa, H.F. Yoshikawa, E. Zumstein y A. Danchin. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature. 390(657): 249–256.

Lin, E.C.C. 1987. Disimilatory pathways for sugars, polyols, and carbohydrates. En: Neidhart, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 244-284.

Lindsay, D., F.M. Mosupye, V.S. Brözel y A. von Holy. 2000. Cytotoxicity of alkaline-tolerant dairy-associated *Bacillus* spp. Letters in Appl. Microbiol. 30:364-369.

Llanos, R.M., C.J. Harris, A.J. Hillier y B.E. Davidson. 1993. Identification of a novel operon in *Lactococcus lactis* encoding three enzymes for lactic acid synthesis: phosphofructokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase. J. Bacteriol. 175:2541-2551.

Losick, R., P. Youngman y P.J. Piggot. 1986. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Annu. Rev. Genet. 20:625-669.

Losick, R. y P. Stragier. 1992. Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* 355:601-604.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein determination with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Ludwig, H., G. Homuth, M. Schmalisch, F.M. Dyka, M. Hecker y J. Stülke. 2001. Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Molecular Microbiology*. 41(2):409-422.

Lynch, A.S. y E.C.C. Lin. 1996. Responses to molecular oxygen. En: Neidhart, F.C., J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umbarger (ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, vol. 1. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp. 1526-1538

Malcovati, M. y G. Valentini. 1982. AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 90 Pt E:170-9.

Markuszewski, M.J., K. Otsuka, S. Terabe, K. Matsuda y T. Nishioka. 2003. Analysis of carboxylic acid metabolites from the tricarboxylic acid cycle in *Bacillus subtilis* cell extract by capillary electrophoresis using an indirect photometric detection method. *J. Chromatography A*. 1010(1):113–121.

Mason, P.W., D.P. Carbone, R.A. Cushman y A.S. Waggoner. 1981. The importance of inorganic phosphate in regulation of energy metabolism of *Streptococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 256(4): 1861–1866.

Matsuno, K., T. Blais, A.W. Serio, T. Conway, T.M. Henkin, A.L. Sonenshein. 1999. Metabolic imbalance and sporulation in an isocitrate dehydrogenase mutant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:3382-3391.

Maurizi, M.R. y R.L. Switzer. 1980. Proteolysis in bacterial sporulation. *Curr. Top. Cell. Regul.* 16:163-224.

Mendes, P., D.B. Kell y H.V. Westerhoff. 1996. Why and when channelling can decrease pool size at constant net flux in a simple dynamic channel. *Biochim. Biophysica Acta.* 1289:175-186.

Mitchell, W.J. 1998. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Adv. Microb. Physiol.* 39:31-130.

Mongkolsuk, S., N.P.Jr. Ambulos y P.S. Lovett, 1984. Chloramphenicol-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* is independent of the chloramphenicol acetyltransferase structural gene and its promoter. *J Bacteriol.* 60:1-8.

- Mountain, A, N.H. Mann, R.N. Munton y S. Baumberg. 1984. Cloning of a *Bacillus subtilis* restriction fragment complementing auxotrophic mutants of eight *Escherichia coli* genes of arginine biosynthesis. *Mol Gen Genet.* 197:82-9.
- Muñoz, M-E., S. Le Borgne, F. Bolívar y F. Valle. 1997. Molecular cloning of the gene that codes for the pyruvate kinase of *Bacillus subtilis*, primary characterization of a strain carrying this gene insertionally inactivated. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 39, 129-140.
- Nagai, T., L.S. Phan Tran, Y. Inatsu y Y. Itoh. 2000. A new IS4 family insertion sequence, IS4Bsul, responsible for genetic instability of poly-gamma-glutamic acid production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182:2387-2392.
- Nakajima, H. 1995. Phosphofruktokinase (PFK). *Nippon Rinsho.* 53(5):1241-6. Review.
- Nakano, M.M. y F.M. Hulett. 1997. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *FEMS Microbiol. Lett.* 157:1-7.
- Nakano, M.M., Y.P. Dailly, P. Zuber y D.P. Clark. 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth in *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for the growth. *J. Bacteriol.* 179:6749-6755.
- Nakano, M.M. y P. Zuber. 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* 52:165-190.
- Nakano, M.M. y P. Zuber. 2002 The Krebs citric acid cycle. En: *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives. From Genes to Cells. Sonenshein, A.L., J.A. Hoch y R. Losick. American Society for Microbiology Press, Washington, DC. pp. 151–162.
- Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, M. Scheachter (eds.). 1990. Physiology of bacterial cell. A molecular approach. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Nicholson, W.L. y G.H. Chambliss. 1985. Isolation and characterization of a *cis*-acting mutation conferring catabolite repression resistance to α -amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 161:875-881.
- Nicholson, W.L., Y.K. Park, T.M. Henkin, M. Won, M.J. Weickert, J.A. Gaskell, G.H. Chambliss. 1987. Catabolite repression-resistant mutation of the *Bacillus subtilis* alpha-amylase promoter affect transcription levels and are in an operator-like sequence. *J. Mol. Biol.* 198:609-618.
- Nicholson, W.L. y P. Setlow. 1990. Sporulation, germination and outgrowth. En: Harwood, C.R. y M. Cutting (eds.). *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, USA. pp. 435-439.

- Oh, M.K., L. Rohlin, K.C. Kao y J.C. Liao. 2002. Global expression profiling of acetate-grown *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 277(15):13175–13183.
- Ostensvik, O., C. From, B. Heidenreich, K., O'Sullivan y P.E. Granum. 2004. Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the *B. cereus* and *B. subtilis* groups in Norwegian surface waters. *J. Appl. Microbiol.* 96:987-93.
- Paik, S. H., A. Chakicherla y J.N. Hansen. 1998. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and chemical and biological properties of, sublancin 168 a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* 273:23134-23142.
- Paulsen I.T, S. Chauvaux, P. Choi, M.H.Jr. Saier. 1998. Characterization of glucose-specific catabolite repression-resistant mutants of *Bacillus subtilis*: identification of a novel hexose:H⁺ symporter. *J Bacteriol.* 180(3):498-504.
- Pedersen, P.B., M.E. Bjørnvad, M.D. Rasmussen y J.N. Petersen. 2002. Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus sp.* *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 36:155-161.
- Perego, M. y J.A. Hoch. 1988. Sequence analysis and regulation of the *hpr* locus, a regulatory gene for protease production and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 170:2560-7.
- Perego, M., J-J. Wu, G.B. Spiegelman y J.A. Hoch. 1991. Mutational dissociation of the positive and negative regulatory properties of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Gene.* 100:207-212.
- Perego, M. y J.A. Hoch. 1996. Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. *Trends in Genetics.* 12(3): 97-101.
- Pfeiffer, T., S. Schuster y S. Bonhoeffer. 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science.* 292(5516): 504–507.
- Pierce, J.A., R.C. Robertson y T.H. Leighton. 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* 8:211-218.
- Piggot, P.J. y G. Coote. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol.* 110:305-315.
- Ponce, E. 1999. Effect of growth rate reduction and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *J. Bioscience and Bioengineering.* 87(6): 775-780.
- Postma, P.W. 1987. Phosphotransferase system for glucose and other sugars. En: Neidhardt, F.C., L.J. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H.E. Umberger (eds).

Escherichia coli and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. Vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Postma, P.W., J.W. Lengeler, G.R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543-594.

Presecan-Siedel E., A. Galinier, R. Longin, J. Deutscher, A. Danchin, P. Glaser, I. Martin-Verstraete. 1999. Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181(22):6889-97.

Price, V.L. y J.A. Gallant 1983. The glucose effect in *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem.* 134:105-7.

Priest, F.G. 1977 Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Review. *Bacteriol. Rev.* 41:711-753.

Priest, F.G. 1989. Products and applications. En: Harwood, C.R. (ed) *Bacillus*, Biotechnology handbooks, vol. 2. Plenum Press, New York. pp 293-322.

Priest, G.P. 1993. Systemics and ecology of *Bacillus*. En: Sonenshein, A.L., J.A. Hoch y R. Losick (eds.). *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, D. C. USA. pp 3-16.

Reizer, J. y A. Peterkofsky. 1987. Regulatory mechanism for sugar transport in Gram positive bacteria. En: Reizer, J. y A. Peterkofsky (eds.). Sugar transport and metabolism in Gram positive bacteria. Ellis Horwood, Chichester, England. pp. 333-364.

Reizer, J., J. Deutscher, F. Grenier, J. Thompson, W. Hengstenberg y M.H.Jr. Saier. 1988. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in Gram positive bacteria: properties, mechanism and regulation. *Crit. Rev. Microbiol.* 15:297-338.

Reizer, J., S. Bachem, A. Reizer, M. Arnaud, M.H.Jr. Saier y J. Stülke. 1999. Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis-the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 27:1157-1169.

Ronimus, RS. Y H.W. Morgan. 2001. The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles. *Extremophiles.* 5(6):357-73. Review.

Rowan, N.J., K. Deans, J.G. Anderson, C.G. Gemmell, I.S. Hunter y T. Chaithong. 2001. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus spp.* after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl Env Microbiol.* 3873-3881.

Ryter, A., P. Schaeffer y H. Ionesco. 1966. Cytologic classification, by their blockage stage, of sporulation mutants of *Bacillus subtilis* Marburg. *Ann. Inst. Pasteur (Paris).*

- Saier, M.H.Jr. y S. Roseman. 1976. Sugar transport. The *crr* mutation: its effect on repression of enzyme synthesis. *J Biol Chem.* 251(21):6598-605.
- Saier, M.H.Jr. (ed.). 1985. Mechanisms and regulation of carbohydrate transport in bacteria. Academic Press, Inc., Orlando Fla.
- Saier, M.H.Jr. y J. Raizer. 1990. Domain shuffling during evolution of the proteins of the bacterial phosphotransferase system. *Res. Microbiol.* 141:1033-1038.
- Saier, M.H.Jr. 1996. Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Res. Microbiol.* 147(6-7): 439-47. Review.
- Saier, M.H.Jr. 2001. The bacterial phosphotransferase system: structure, function, regulation and evolution. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3(3):325-7.
- Salinas, I., A. Cuesta, M.A. Esteban y J. Meseguer. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 19:67-77.
- Salway, J.G (ed.). 1999. Metabolism at a Glance. Second Ed. Blackwell Science. United Kingdom.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis (eds.). 2001. Molecular cloning. A laboratory manual, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sauer, U., V. Hatzimanikatis, H.P. Hohmann, M. Manneberg, A. van Loon y J.E. Bailey. 1996. Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl. Env. Microbiol.* 62(10): 3687–3696.
- Sawers, G. 1999. The aerobic/anaerobic interfase. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:181-187.
- Schaeffer, P., J. Millet y J.P. Aubert. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54:704-711.
- Schallmeyer, M., A. Singh y O.P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50:1-17.
- Schilling, O., O. Frick, C. Herzberg, A. Ehrenreich, E. Heinzle, C. Wittmann y J. Stülke. 2007. Transcriptional and metabolic responses of *Bacillus subtilis* to the availability of organic acids: transcription regulation is important but not sufficient to account for metabolic adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(2): 499–507.
- Semenza, G.L. 1999. Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 98:281-284.

- Setlow, P. 1981. Biochemistry of bacterial forespore development and spore germination. En: Levison, H.S., A.L. Sonenshein y D.J. Tipper (eds). Sporulation and germination. American Society for Microbiology, Washington D. C. pp. 13-28.
- Setlow, P. 1993. Spore structure proteins. En: Sonenshein, A.L., J.A. Hoch y R. Losick (eds.). *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp 801-809.
- Setlow, P. 1994. DNA structure, spore formation, and spore properties. En: Piggot, J.P., P.C., Moran y P. Youngman (eds.). Regulation of bacterial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp 181-194.
- Shariati, P., W.J. Mitchell, A. Boyd y F.G. Priest. 1995. Anaerobic metabolism in *Bacillus licheniformis*. NCIB 6346. Microbiology 141:1117-1124.
- Sierro N., Y. Makita, M.J.L. de Hoon y K. Nakai. 2008. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. Nucleic Acids Res. 36 (Database issue): D93-D96.
- Slepecky, A.R. 1992. What is a *Bacillus*. En: Doi, H.R. y M. Mc Gloughlin (eds.). Biology of the *Bacilli*: Applications to industry. Butter Worth-Heineman, Boston. pp 1-21.
- Solem, C. y P.R., Jensen 2002. Modulation of gene expression made easy. Appl. Environ. Microbiol. 68(5): 2397-2403.
- Sonenshein, A.L. 1989. Metabolic regulation of sporulation and other stationary phase phenomena. En: Smith, I., R.A. Slepecky y P. Setlow (ed.). Regulation of procariotic development. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 109-130.
- Sonenshein, A.L. 2002 The Krebs citric acid cycle. En: *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives. From Genes to Cells. Sonenshein, A.L., J.A. Hoch y R. Losick (eds.). American Society for Microbiology Press, Washington, DC. pp. 151-162.
- Speck, E.L. y E. Freese. 1973. Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 78:261-275.
- Spizizen, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 44:1072-1078.
- Srere, P.A. 1990. Citric acid cycle redux. Trends Biochem. Sci. 15:411-412.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. Molecular Microbiology. 56:845-857.

Steinmetz, M. 1993. Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation, and evolution. En: AL Sonenshein, JA Hoch, R Losick, (ed.). *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. pp. 157–70.

Stephanopoulos, G.N., A.A. Aristidou y J. Nielsen (eds.). 1998. Metabolic engineering, principles and methodologies. Academic Press, San Diego, Ca. USA.

Stock, J.B., A.J. Ninfa y A.M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53(4):450-90. Review.

Strauch, M.A. y J.A. Hoch. 1992. Control of postexponential gene expression by transition state regulators. En: *Biology of the Bacilli: Application to industry.* Doi, R.H., y M. McGloughlin (eds.). Butterworth-Heinemann MA, USA. pp.105-121.

Stülke, J. y W. Hillen. 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 849–880.

Stülke, J., I. Martin-Verstraete, V. Charrier, A. Klier, J. Deutscher y G. Rapoport. 1995. The HPr protein of the phosphotransferase system links induction and catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J. Bacteriol.* 177(23): 6928–36.

Takahashi, I. 1963. Transducing phages for *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol.* 1963. 31:211-7.

Talkington, C. y J. Pero. 1978. Promoter recognition by phage SPO1-modified RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:1185-118.

Thomas, T. D., D.C. Ellwood y V.M.C. Longyear. 1979. Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *J. Bacteriol.* 138(1): 109–117.

Thompson, J. 1978. In vivo regulation of glycolysis and characterization of sugar: phosphotransferase systems in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 136(2): 465–476.

Thompson, J. y D.A. Torchia. 1984. Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ¹⁴C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 158(3): 791–800.

Thompson, J. 1987. Sugar transport in lactic acid bacteria. En: *Sugar transport and metabolism in Gram-positive bacteria.* Reizer, J. y A. Peterkofsky (eds.). Chichester, England, Ellis Horwood Limited. pp. 13–38.

Titgemeyer, F. y W. Hillen. 2002. Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82(1-4): 59-71. Review.

Tobisch, S., D. Zühlke, J. Bernhardt, J. Stülke y M. Hecker. 1999. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:6996-7004.

Valle, F. y Ferrari, E. 1989. Subtilisin: A redundantly temporally regulated gene? En: Smith, I., R.A. Slepecky y P. Setlow (eds.). Regulation of prokaryotic development. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 131-146.

Vijay, K., M.S., Brody, E., Fredlund y C.W. Price. 2000. A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 35(1):180-8.

Waldburger, C., D., Gonzalez y G.H. Chambliss. 1993. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175:6321-7.

Walsh K., D.E. Koshland. 1984. Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles. The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *J Biol Chem.* 10; 259(15):9646-54.

Weickert, M.J. y S. Adhya. 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac represors. *J. Biol. Chem.* 267:15869-15874.

Willecke, K., E.M., Gries y P. Oehr. 1973. Coupled transport of citrate and magnesium in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 248:807-814.

Wong, S.L. 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:517-22.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira, J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33:103-119.

Ye, R. W., W., Tao, L., Bedzyk, T., Young, M., Chen y L. Li. 2000. Global Gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 182:4458-4465.

Young, M. y Cole, S. T. 1993. Clostridium. En: Sonenshein, A.L., J.A. Hoch y R. Losick (eds.). *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 35-63.

Zheng, G., L., Yan, Z., J.C., Vederas y Zuber, P. 1999. Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of antilisterial bacteriocin subtilisin. *J. Bacteriol.* 181:7346-7355.

XII. Anexos

XII.1 Lista de abreviaturas.

XII.1.1 Vías metabólicas:

ABP	Vía común de síntesis de aminoácidos aromáticos
ED	Vía Entner-Doudoroff
EMP	Vía Embden-Meyernhoff-Parnas
PP	Vía de las pentosas-fosfato
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ciclo de Krebs

XII.1.2 Enzimas:

Eda	2-ceto,3-desoxi, 6-fosfogluconato deshidratasa
Edd	6-fosfogluconato deshidratasa
GaIP	Permeasa de galactosa
Gdh	6-fosfogluconato deshidrogenasa
Glk	Glucocinasa
GltA	Isocitrato sintasa
Icd	Isocitrato deshidrogenasa
Mdh	Malato deshidrogenasa
Mez	Enzimas málicas
Pfk	Fosfofructocinasa
Pgi	Fosfoglucosa isomerasa
PK	Piruvato cinasa
Ppc	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
Pps	Fosfoenolpiruvato sintasa
PT	Fosfotransferasa
PTS	Sistema de transferencia de fosfato fosfoenolpiruvato: carbohidrato.
PykA	Isoenzima piruvato cinasa A (tipo II)
PykF	Isoenzima piruvato cinasa F (tipo I)
Rpe	Ribosafosfato epimerasa
Rpi	Ribosafosfato isomerasa
Tal	Transaldolasa
Tkt	Transcetolasa
Tpi	Triosafosfato isomerasa

Zwf

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

XII.1.3 Moléculas:

a.a	Aminoácido
ACoA	Acetilcoenzima-A
ADP	Adenosina 5'-difosfato
Ala	Alanina
AMP	Adenosina monofosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
Ap	Ampicilina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspartico
ATP	Adenosina trifosfatos
ATP	Adenosintrifosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
α CG	Alfacetoglutarato
BeEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina sérica bovina
CDP	Citidinadifosfato
Cis, Cys	Cisteína
CIT	Citrato
CoA	Coenzima-A
CTAB	Hexadecil trimetil bromuro de
amonio	
CTP	Citidinatrifosfato
EDTA	Ácido etilenaminotetracético
Gm	Gentamicina
GTP	Guanosina trifosfatos
Km, Kn	Kanamicina
NADH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido
PEP	Fosfoenolpiruvato
PYR	Piruvato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Sm	Estreptomina
6PG	6-fosfogluconato

XII.1.4 Diversos

DO	Densidad óptica
μ	Velocidad específica de crecimiento
MM	Medio mínimo

PCR
 T_D
 U.I

Reacción en cadena de la polimerasa
 Tiempo de duplicación
 Unidad internacional

XII. 2 Medios de cultivo y soluciones.

XII.2.1 Medio Schaeffer.

Nutrient Broth ----- 8 g

KCl-----1 g.

MgSO₄.7H₂O----- 0.13 g.

H₂O destilada----- Aforara 1 litro

Metales traza a agregar al medio

FeSO₄ 1 mM

NaSO₄ 1 mM

MnCl₂ 1 mM

Ajustar el pH a 7.0 – 7.4, esterilizar a 20 Lb./presión por 30 minutos.

XII.2.2 Medio Mínimo Spizizen

Na₂ HPO₄ . 7H₂O ----- 12.8 g.

KH₂PO₄ ----- 3.0 g.

NaCl ----- 0.5 g.

NH₄Cl ----- 1.0 g.

Ajustar el pH a 7.0 – 7.4, esterilizar a 20 Lb./presión por 30 minutos, enfriar a 50 °C y agregar las siguientes soluciones estériles.

MgSO₄ 1M

CaCl₂ 1M

XII.2.3 Medio Luria Bertani (LB)

Bacto triptona----- 10g.
 Bacto yeast/extract----- 5g
 NaCl----- 10g.
 NaOH (1M) ----- 1 ml
 pH----- 7.0 ± 7.2
 Para platos usar
 Agar 1.5%-----15g.

XII.2.4 Medio MB

Bacto triptona----- 10g.
 Bacto yeast/extract----- 5g
 NaCl----- 10g.
 MgCl₂ 6H₂O -----1 g.
 Para platos usar
 Agar 1.5%-----15g.

XII.2.5 Suplementos de medios de cultivo. Stock a concentración limitada

Glicina 2.0 µg/ml.
 Histidina 2.0 µg/ml.
 Triptofano 2.0 µg/ml.
 Agregar del stock 5 ml para 1 Lt.
 Fuente de carbono stock a 20% y 50%
 Glucosa 2.0 mg/ml y 5.0 mg/ml

Esterilizar la fuente de carbono por filtración o autoclave por 10 minutos.

XII.2.6 Buffer para esporas

K₂HPO₂ 1000 nM

KCl 1000 nM

MgSO₄.7H₂O 1000 nM)

Ajustar el pH a 7.0 – 7.4, esterilizar a 20 Lb./presión por 30 minutos.

XII.3 Reactivos para determinación de proteínas por el método de Lowry.

REACTIVO A: CuSO₄ . 5H₂O al 5% y Tartrato de Na-K al 1%

REACTIVO B: Na₂CO₃ al 2% en NaOH al 0.1N.

REACTIVO C: A 49 ml. de reactivo B agregar 1 ml. de reactivo A.

REACTIVO D: Solución 1:1 de reactivo de Folin ciocalteu y agua.

XI.4 Fórmula para obtención de actividad enzimática total (AE)

$$AE = \frac{\left[\frac{DO_i - DO_f}{\text{Tiempo}} \right] * \left[\frac{1000}{VM \text{ (ml)}} \right] * \left[\frac{1}{25} \right]}{(6.22) * (\text{mg proteína/ml})}$$

Donde: VM, es el volúmen de la muestras; DO_i, es la densidad óptica inicial; DO_f, es la densidad óptica final; FC (1/25) es el factor de concentración y; 6.22, es el coeficiente de extinción milimolar para NADH.

La fórmula también puede ser expresada de manera lineal como sigue:

$$AE = (OD_1 - OD_2) (t_2 - t_1)^{-1} (1000)(V_m)^{-1} 0.04 (6.22 P)^{-1}$$

Donde: OD₁ y OD₂ refieren a la densidad óptica de 1 cm de haz de luz UV a tiempo t₂ y t₁ respectivamente. V_m refiere a volumen de muestra en mililitros y P a mg de proteínas/ml.