

**REVISTA** de la **Sociedad Mexicana de**

# BIO**TECNOLOGIA**

**y Bioingeniería A.C.**



Revista de la Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería A.C.

ISSN-0188-4786

Nueva Era. Año 2008  
Volúmen 12 Número 2

REVISTA de la Sociedad Mexicana de  
**BIO TECNOLOGIA**  
y Bioingeniería, A.C.

---

**MESA DIRECTIVA**

Dra. Maria Luisa Villarreal Ortega  
**Presidenta**

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
**Vicepresidente**

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
**Secretaria**

Dra. Maria Soledad Córdova Aguilar  
**Tesorera**

Dra. Ana Carmela Ramos  
**Subsecretaria**

I.A. Alaide Jiménez Serna  
**Vocal Estudiante**

**COMITÉ EDITORIAL**

Dr. Sergio Sánchez Esquivel  
Instituto Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Luis Bernardo Flores Cotera  
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño  
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas  
UAMI

Dra. Romina Rodríguez Sanoja  
Instituto Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira  
Instituto Tecnológico de Mérida

**SUSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD**

Lic. Elydeé Cardeña Medina  
Tel./ Fax (01 55) 5849 5859  
smblotec@yahoo.com.mx

**FORMACIÓN EDITORIAL Y DISEÑO GRÁFICO**

Lic. Elydeé Cardeña Medina

**COORDINADOR EDITORIAL**

Lic. Elydeé Cardeña Medina

**BioTecnología**

ISSN 0188-476, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, Índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias

(CICU-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082518285000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. Tiraje 500 ejemplares.

## MACROOPORTUNIDADES DEL MICROMUNDO EN LA PENINSULA DE YUCATAN

La vida microbiana ha logrado adaptarse a ambientes con características tan adversas que hasta hace muy poco se pensaba que no era posible la vida en tales condiciones; basta mencionar a los habitantes de fuentes termales con temperaturas alrededor de los 100°C, de donde se aisló una polimerasa de ADN que permitió la automatización de la reacción en cadena de la polimerasa (quizá la técnica que más ha revolucionado a las ciencias biológicas), o los microorganismos capaces de utilizar la energía térmica de los respiraderos hidrotermales del fondo oceánico en los que no llega la luz solar, por lo que esos microorganismos son el sustento de todo un ecosistema. Podría decirse que más que adaptarse, los microorganismos han mantenido la capacidad de sobrevivir en tales ambientes extremos, pues en los albores de la vida esas deben haber sido las condiciones imperantes en el planeta.

De estos preceptos puede deducirse entonces que el estudio de la microdiversidad es decisivo para garantizar un desarrollo sustentable, ya que los microorganismos representan una fuente de riqueza inagotable.

La península de Yucatán, constituye una importante región de México, cuyos ecosistemas poseen características singulares debido a la existencia de áreas con diferentes determinantes ecológicos que son consecuencia directa de las condiciones hidrogeológicas de la zona. Por su situación geográfica y características edafoclimáticas, la península de Yucatán presenta ecosistemas de naturaleza cárstica (cenotes, cuevas, aguadas y manantiales), ambientes hipersalinos que incluyen un extenso sistema de lagunas costeras, manglares, arrecifes coralinos y salineras, así como una vegetación principalmente caducifolia que produce millones de toneladas al año de materia orgánica y que debe ser degradada por los consorcios microbianos del suelo.

En la costa, los arrecifes coralinos representan los ecosistemas más diversos, productivos y vulnerables de los mares. A pesar de que los arrecifes en el mundo ocupan el 0.2% del área marina, se estima que en ellos se lleva a cabo la reproducción de 1 a 9 millones de especies. Los microorganismos que habitan este ambiente particular se han considerado como fuentes importantes para la obtención de nuevos biopéptidos, biopolímeros, enzimas y antibióticos.

Otro grupo significativo de microorganismos presentes en ambientes extremos son los organismos que viven en lagos salobres y pozas salinas. Las compañías productoras de sal en la península tienen un área de alrededor de 2,500 hectáreas en donde se localizan las charcas para la cristalización de la sal común. En el fondo existen tapetes microbianos en el que habitan comunidades densas de arqueobacterias y bacterias halófilas de moderadas a extremas. Las eventuales aplicaciones de las bacterias halófilas se relacionan con el incremento en los rendimientos del petróleo y su uso en la industria alimentaria para el procesamiento y la maduración de productos cárnicos y marinos.

Uno de los ambientes más llamativos de la península de Yucatán para el estudio de la diversidad microbiana lo constituyen los cenotes. Sus aguas presentan microorganismos autóctonos característicos cuyas propiedades pueden variar dependiendo de la profundidad, pues a través de la columna de agua se establecen gradientes de temperatura, intrusiones salinas e incluso aguas prístinas donde los microorganismos deben haber evolucionado para adaptarse a condiciones oligotróficas extremas. En las capas más superficiales de los cenotes predominan las microalgas que tienen una innegable importancia puesto que, además de formar la base de las cadenas productoras de oxígeno, constituyen recursos importantes con aplicaciones potenciales en áreas como la acuicultura y farmacología. Sin embargo, la diversidad microbiana en las aguas más profundas de los cenotes o en los sedimentos depositados a lo largo de miles de años, permanece totalmente desconocida.

Estas condiciones tan particulares de la Península de Yucatán, hacen de la región un campo experimental idóneo para estudiar la estructura, función y dinámica poblacional de los consorcios microbianos que habitan en estos ambientes, en busca de propiedades biológicas de interés biotecnológico. El estudio de la diversidad y la ecología microbiana, así como la implementación de estrategias biotecnológicas blancas para la explotación de la macroriqueza del micromundo no son por tanto, tareas para las generaciones futuras; son quizá el principal reto para esta generación de microbiólogos, bioquímicos y biotecnólogos, que deben encontrar en el micromundo las pistas para descubrir el camino más adecuado a un futuro verdaderamente sustentable y así poder legar a las nuevas generaciones un mundo más limpio.

A fin de cuentas, este es un mundo de microbios y en estas microscópicas criaturas puede encontrarse la solución para muchos de los retos que enfrenta la humanidad.

Dra. Sara Solís Pereira (ssolis@itmerida.mx). División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida.

Dra. Marcela Zamudio Maya (zmaya@uady.mx) y Dr. Rafael Rojas Herrera (r.rojas@uady.mx). Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán.

## GUÍA DE AUTORES

La revista puede recibir trabajos de revisión así como de investigación original en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

El idioma oficial de la revista es el Español, pero en casos especiales se podrán recibir contribuciones en Inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Se recomienda que los trabajos completos tengan entre 5 y 15 páginas (de 1000 a 4000 palabras) escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones de trabajos originales y revisiones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml,  $\mu$ l) de peso (kg, g, mg,  $\mu$ g), DNA, RNA y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de revisión incluirán el tema y subtemas que a juicio de los autores sean necesarios para la mejor presentación de la información. Estos trabajos pueden cubrir los siguientes contenidos:

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.
2. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuicultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.
3. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.
4. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.
5. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología para resolver problemas de las sociedades. Por ejemplo: las perspectivas del uso del genoma humano para el desarrollo de nuevas drogas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático e informático de los genes), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer ingeniería metabólica. Los

## Instrucciones para los autores

nuevos tipos de reactores biológicos. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará cabida a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

Los trabajos de investigación original serán divididos en las siguientes secciones: INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, REFERENCIAS y AGRADECIMIENTOS. Las secciones de RESULTADOS Y DISCUSIÓN pueden ser combinadas.

Tanto las revisiones como los trabajos originales deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito será puesto en **negritas** con letra Arial o equivalente tamaño **14**. El título deberá estar centrado.
2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor correspondiente.
3. Se deberá añadir un RESUMEN de no más de 250 palabras en Español y un ABSTRACT en Inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave**: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words**).

Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en  *cursivas* con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.

5. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las REFERENCIAS.
6. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: "Martínez & García (1999) han demostrado que...", o bien, "Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...". Si la cita posee varios autores se escriba como sigue: "Gutiérrez *et al.* (2003), han demostrado..." O bien : "Datos recientes (Gutiérrez *et al.*, 2003)

---

## Instrucciones para los autores

---

han mostrado...” Si la cita es de una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de REFERENCIAS se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) de acuerdo al siguiente formato:

**Para revistas:**

Playne MJ & Crittenden RG (1999) Technology aspects related to food microbiology. *Food Technol.* 52: 67-75.

**Para libros:**

Armstrong DW, Brown LA, Porter S & Rutten R (1993) Biotechnological derivation of aromatic flavour compounds and precursors. *In: Progress in flavour precursor studies.* Schreier P & Winterhalter P (eds). Allured, Carol Stream, Ill., pp. 425-438.

Box GEP, Hunter WG & Hunter JS (1978) Statistics for experimenters. John Wiley & Sons, New York.

**Para patentes:**

Dasek J, Shepherd D & Traelnes RK (1973) Procéde de fabrication de zeaxanthine. Belgium Patent 790289.

**Para congresos y reuniones:** Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo.

Jorge H, González, R, Jorge I, Almeida R & Santana I (2001) Impacto del programa de mejoramiento de la caña de azúcar en Cuba. *IV Seminario Internacional de Sanidad Vegetal*, Varadero, Cuba, pp. 11.

Para tesis de pre y posgrado:

Jiménez (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* híbrido). Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UCLV. IBP. Santa Clara, pp. 93.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea. Las citas a congresos y reuniones deberán evitarse al máximo.

Los autores deberán acompañar su manuscrito de una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería podrá hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico en la dirección [smbiotec@yahoo.com.mx](mailto:smbiotec@yahoo.com.mx). Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC [http://www.smbb.com.mx/menu3/prem\\_hus.htm](http://www.smbb.com.mx/menu3/prem_hus.htm). La publicación en línea precederá a la publicación impresa.

## **Evolución Dirigida en la Generación de Biocatalizadores: Biocatalizadores Hechos a Medida**

Carolina Peña-Montes y Amelia Farrés González-Saravia\*

*Departamento de Alimentos y Biotecnología. Lab. 312, Conjunto "E". Facultad de Química,  
UNAM. E-mail: farres@servidor.unam.mx*

**Palabras clave:** evolución dirigida, PCR propenso a errores, barajado de ADN, biocatalizadores.

**Key words:** directed evolution, DNA-shuffling, biocatalysts, error prone PCR, high-throughput screening.

### **RESUMEN**

Desarrollar biocatalizadores con propiedades que se ajusten a las condiciones de trabajo de los procesos industriales es una necesidad emergente. El uso de la evolución dirigida como una herramienta para la obtención de los mismos se ha incrementado en los últimos años debido al creciente número de éxitos obtenidos. En éste artículo se discuten los métodos actuales para la generación de variantes, así como los ensayos para el aislamiento y selección de las mutantes adecuadas en un proceso de evolución *in vitro*. Se describen algunos ejemplos que muestran que es posible modificar la especificidad por el sustrato, la enantioselectividad o incrementar la actividad de la enzima para las condiciones de proceso deseadas.

### **ABSTRACT**

Biocatalysts development with improved properties that are suitable for industrial processes is an emergent necessity. Directed molecular evolution is a rapidly growing field for the improvement of biocatalysts in the last years due to the growing number of success. This review describes the current methods to create variants and assays for rapid screening and selection of desired mutants in a process of directed evolution. Selected examples show that it is possible to modify the substrate specificity, modulate enantioselectivity and to increase enzyme performance for desired process conditions.

---

### **INTRODUCCION**

Las enzimas o biocatalizadores, presentan propiedades que los catalizadores inorgánicos no poseen, como selectividad por sustrato, regio- y enantioselectividad, temperaturas o presiones de trabajo moderadas, lo cual disminuye los costos de operación de los procesos. Adicionalmente, las enzimas pueden catalizar una variedad de reacciones en rangos de pH y temperatura amplios. Esto explica que en los últimos años hayan surgido un considerable número de procesos industriales que las utilizan como catalizadores (Liese *et al.*, 2000; Panke *et al.*, 2004). Cuando se utilizan

---

enzimas silvestres, en procesos industriales es común encontrar que las condiciones para la reacción enzimática no son las más apropiadas para el proceso a gran escala. Las enzimas suelen ser inestables; pueden tener baja especificidad por el sustrato o no presentar la enantioselectividad requerida. Esto obliga a buscar o desarrollar enzimas con las propiedades requeridas, es decir, hechas a la medida del proceso.

Los métodos tradicionales para identificar nuevas enzimas están basados en el aislamiento de nuevos microorganismos a partir de muestras ambientales o de colecciones de cepas. Sin

embargo, estos métodos presentan algunas desventajas, por ejemplo, no todos los microorganismos son cultivables con las tecnologías de fermentación comunes, se estima que el número de microorganismos cultivables que se pueden obtener de una muestra de suelo es menor al 1% (Riesenfeld *et al.*, 2004). También es posible aislar directamente el ADN de muestras ambientales (ADN metagenómico), secuenciarlo y, mediante el análisis de las secuencias obtenidas, identificar genes y la posible función de su transcrito. Una vez que se identifica la actividad enzimática deseada, se aísla el gen respectivo y se clona para sobreexpresarlo, lo que permite producir a gran escala la enzima requerida. Con todo, los genes identificados en metagenomas pueden funcionar distinto de lo esperado y, como ya se mencionó, también las enzimas nuevas pueden ser inadecuadas para los procesos requeridos.

Dentro de los métodos para desarrollar nuevas enzimas, una alternativa para mejorar las propiedades catalíticas es el diseño racional. Si se cuenta con el gen y la estructura tridimensional de una enzima, se puede alterar la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, las propiedades catalíticas mediante un diseño racional seguido de mutagénesis sitio-dirigida (Fig. 1). El diseño racional de enzimas exige un amplio conocimiento de la estructura y de las relaciones entre estructura y función. Sin embargo, el conocimiento actual de esta relación no es lo suficientemente profundo y sólo en pocos casos se han obtenido resultados favorables. Por el contrario, la evolución dirigida ha sido una herramienta alternativa poderosa para modificar la función enzimática y, específicamente, para ajustar las propiedades catalíticas a las condiciones deseadas.

La evolución dirigida, “evolución *in vitro*” o “diseño irracional” de enzimas no difiere mucho de la hipótesis evolutiva sugerida por Darwin. En la evolución *in vitro* se aplican **procesos mutagénicos** aleatorios o recombinatorios, o ambos, a un gen, generándose cierta diversidad

representada en una genoteca de mutantes. Esta genoteca de variantes de la secuencia original es sometida a un proceso de **selección**, del cual se obtienen los mejores candidatos que serán nuevamente sometidos al proceso de mutación-recombinación-selección. En contraste con la evolución natural, donde el objetivo de un organismo es sobrevivir, adaptarse y finalmente reproducirse; en la evolución dirigida el objetivo es fijado por el investigador. Los mejores candidatos serán aquellas variantes que, de acuerdo a los criterios de selección, se ajustan a las propiedades catalíticas que deseamos obtener. Una combinación apropiada y repetida de los distintos métodos de generación de variabilidad acoplados a buenos métodos de selección puede producir enzimas con las propiedades catalíticas deseadas o muy parecidas a estas (Arnold & Moore, 1997). El reto de la evolución dirigida es comprimir la escala de tiempo usada por la evolución natural a meses o incluso a semanas (Fig. 1).

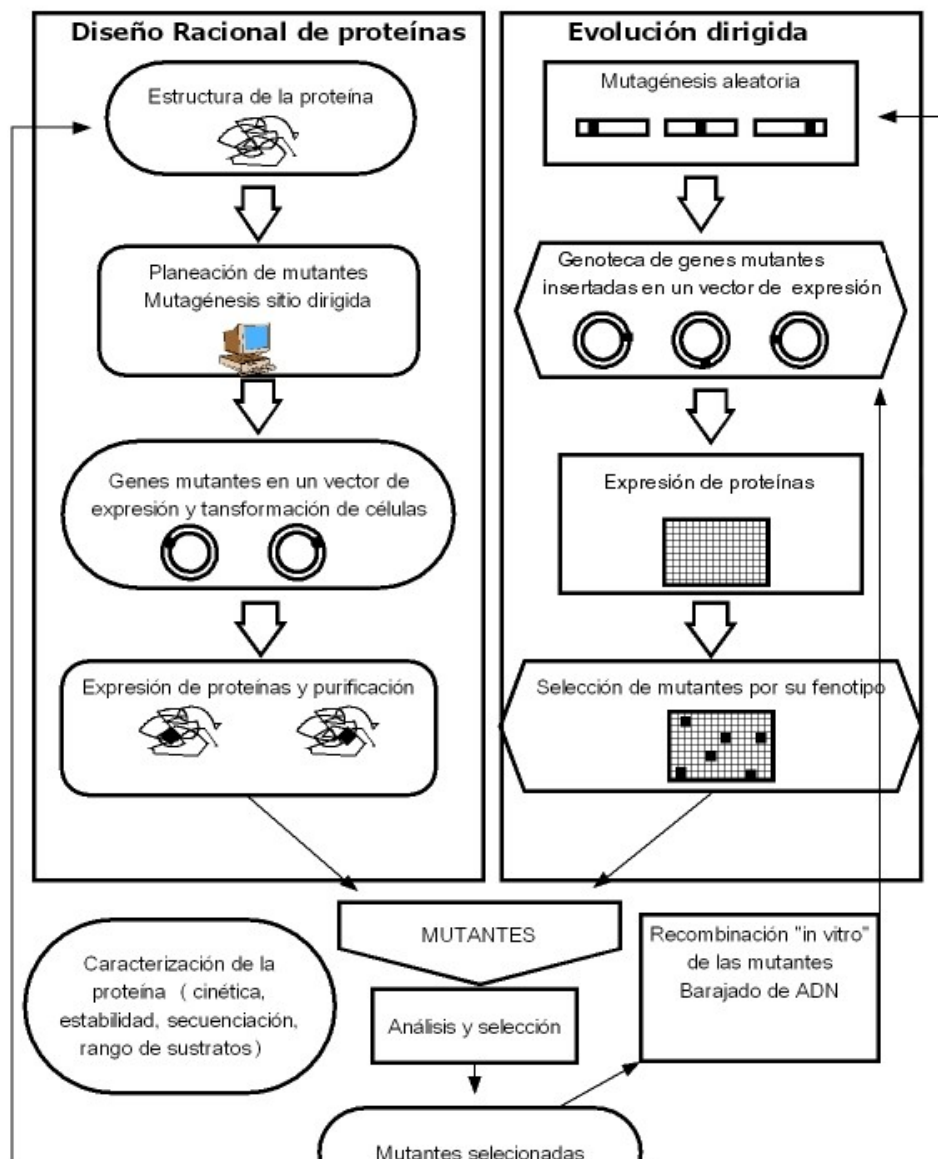
Los requisitos para poder llevar a cabo la evolución *in vitro* de una proteína incluyen la identificación y disponibilidad del gen que codifica ésta, un sistema de expresión conveniente, un método efectivo para generar la genoteca de variantes y un sistema de selección apropiado. A continuación se describen algunos métodos para generar variantes, los sistemas de aislamiento y selección y algunos ejemplos aplicados en el área de biocatálisis.

### **Métodos para generar variantes**

Es importante definir inicialmente el tamaño de la genoteca de mutantes que se va a generar, lo cual depende del número de mutantes que se pueden analizar de acuerdo a la infraestructura disponible. Se recomienda trabajar con velocidades de mutación bajas que generen un número reducido de mutantes, lo ideal sería obtener un solo aminoácido mutado en cada generación (Voigt *et al.*, 2001a; Voigt *et al.*, 2001b).

Actualmente existen diferentes metodologías para producir variantes, es tarea del científico

determinar cuáles y en qué orden serán aplicadas.



**Fig. 1.** Esquema general de los métodos empleados para generar nuevas proteínas: diseño racional (derecha) y evolución dirigida (izquierda). En el diseño racional se requiere un conocimiento previo de la estructura de la proteína para la planeación de las mutantes que se generan por mutagénesis sitio-dirigida. En la evolución dirigida, el gen de interés es sometido a un proceso para generar variantes (mutaciones puntuales ó recombinación), los genes resultantes se utilizan para construir una genoteca en un vector de expresión. Las mutantes son seleccionadas por la propiedad que deseamos mejorar y éstas a su vez se utilizan como punto de inicio para un nuevo proceso, generalmente por recombinación.

De manera general, estos métodos se pueden dividir en asexuales y sexuales. Decimos que un método es asexual cuando este tiene un solo progenitor y es sexual cuando tiene dos o más progenitores (Arnold, 1998). Los métodos asexuales, a su vez, se subdividen en métodos que generan mutaciones al azar a lo largo de la secuencia completa de un gen y métodos que generan mutaciones al azar en una región específica de un gen (Tabla 1).

Uno de los métodos asexuales mas usados es la **PCR con predisposición a errores** (ep-PCR), donde las condiciones utilizadas permiten la introducción de una mutación por 1000 pares de bases. La PCR propensa a errores es un método sencillo basado, como su nombre lo indica, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este método, el gen de interés es amplificado con una ADN polimerasa en condiciones que favorecen que la enzima adicione nucleótidos equivocados de manera aleatoria a lo largo de toda la secuencia del

gen y en las copias generadas durante los ciclos de replicación. La fidelidad de la ADN polimerasa se

puede afectar por variación de la concentración de

**Tabla 1.** Métodos para generar variantes por evolución dirigida.

<b>METODOS ASEXUALES</b>	Métodos que generan mutaciones al azar a lo largo de la secuencia completa de un gen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR con propensión a errores (ep-PCR)</li> <li>• Cepas que generan mutaciones</li> <li>• Mutagénesis de inserción/eliminación aleatoria (RID)</li> <li>• Mutagénesis secuencia saturante (SeSam).</li> </ul>
	Métodos que generan mutaciones al azar en una región específica de un gen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutagénesis sitio específica saturante</li> <li>• Método MAX</li> </ul>
<b>METODOS SEXUALES</b>	Barajado o mezclado de ADN ("DNA shuffling" o "gene shuffling")	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recombinación por cebado al azar ("Random-priming recombination", RPR)</li> <li>• Extensión vacilante ("staggered extension process", StEP)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generación de híbridos de ADN (heterodúplex) <i>in vitro</i> y reparación de ADN <i>in vivo</i></li> <li>• Generación aleatoria de secuencias quiméricas sobre un templado transitorio ("Random chimeragenesis on transient templates", RACHITT)</li> <li>• Truncado gradual para crear enzimas híbridas ("Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes", ITCHY).</li> <li>• Método CLERY ("Combinatorial libraries enhanced by recombination in yeast")</li> </ul>	

MgCl<sub>2</sub>, la presencia de Mn<sup>2+</sup>, una alta concentración o concentraciones asimétricas de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y altas concentraciones de cebadores (Cadwell & Joyce, 1992; Jaeger *et al.*, 2001), (Fig. 2, panel A). Una desventaja del ep-PCR es que debido a la degeneración del código genético, un tercio de las mutaciones que se generan, no producen un cambio de aminoácido (Wong *et al.*, 2006). Aunado a esto, cualquier molécula copiada en los primeros pasos de la reacción se encuentra sobre-representada en la genoteca que se genera debido a la amplificación de la misma, esto puede corregirse llevando a cabo reacciones separadas de ep-PCR con reducción del número de ciclos de amplificación y utilizando todas las copias

generadas en las reacciones separadas para la construcción de la genoteca final (Neylon, 2004).

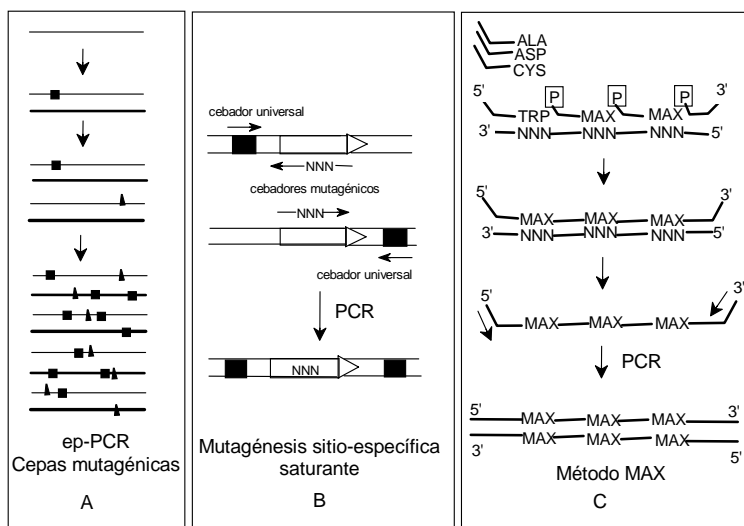
Una alternativa al método anterior es el uso de **cepas que generen mutaciones** (*Epicurian coli* XL1-Red). Dicha cepa se encuentra afectada en el mecanismo de reparación. Al introducir el plásmido con el gen de interés se producen mutaciones durante la replicación (Bornscheuer, 1998; Bornscheuer *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque la metodología es bastante simple, el número de cambios generados en cada ronda (de 1 a 2 nucleótidos por gen) es muy bajo por lo que se requieren múltiples transformaciones de la cepa. Adicionalmente, se generan también mutaciones en el plásmido, si el cambio es

generado en el promotor se puede afectar la expresión de la variante generada.

Otro método asexual para generar mutaciones puntuales es la **mutagénesis sitio-específica saturante**. En este proceso, es necesario identificar el aminoácido relacionado con la propiedad que nos interesa, con el fin de someter a las bases del códon correspondiente a un ciclo de mutagénesis donde se generan variantes que sustituyen dicho aminoácido por alguno de los 20 aminoácidos posibles. Se identifica cual de los 20 aminoácidos favorece esta propiedad. Es necesario diseñar cebadores mutagénicos superpuestos en el sitio que se desea mutar a saturación, con un sitio para cebadores universales que se encuentran de un solo lado del gen de interés. Los cebadores mutagénicos y los universales producen fragmentos

del gen que se superponen y que son extendidos en los pasos siguientes de la PCR (Urban *et al.*, 1997) (Fig. 2, panel B). Una variante de este protocolo es el creado recientemente por Hughes *et al.* (2003), el **método MAX**, en el que se sustituye el aminoácido deseado por cada uno de los posibles 20 aminoácidos o los que se deseen en múltiples posiciones de la secuencia de la proteína. Se modifican varias secuencias aleatorias, por lo que se utiliza un grupo de cebadores mutagénicos, los cuales hibridan en las regiones homólogas del templado y son posteriormente ligados. Se remueve el templado que no se modificó y una segunda hebra es completada por PCR (Fig. 2, panel C).

Un método que tiene la ventaja de poder mutagenizar en una secuencia blanco cada posición de un nucleótido es la **mutagénesis**



**Fig. 2.** Métodos asexuales para generar mutaciones puntuales. A) La ep-PCR y las cepas mutagénicas introducen errores en posiciones aleatorias a lo largo de la secuencia del gen. B) Mutagénesis sitio específica saturante. El gen a mutar esta insertado junto a un sitio para un cebador universal (negro), los cebadores mutagénicos están superpuestos en el sitio que se desea mutar a saturación (NNN), se realiza una PCR. Se obtiene un gen completo con el codón modificado. C) Método MAX. Se modifican varias secuencias aleatorias, por lo que se utiliza un grupo de cebadores mutagénicos, los cuales hibridan en las regiones homólogas del templado.

**secuencia saturante (SeSam).** Incluye las siguientes etapas: a) Generar fragmentos de ADN de manera aleatoria de diferente tamaño, b) Adicionar con una transferasa terminal en el extremo 3' de cada fragmento, una base universal

(deoxiinosina), c) Elongar los fragmentos de ADN por PCR hasta completar el gen original usando como templado una sola hebra y d) Reemplazar las bases universales por nucleótidos estándar. De esta manera se introducen mutaciones aleatorias

en los sitios donde se encuentran las bases universales debido a que la deoxiinosina forma pares de bases con cualquier nucleótido. Este método adicionalmente permite introducir substituciones de nucleótidos consecutivas y también incrementa la diversidad en las genotecas de mutantes (Wong *et al.*, 2004).

La inserción y eliminación de aminoácidos en la estructura de la proteína es una estrategia interesante para generar diversidad que no ha sido muy recurrida. El método de **mutagénesis de inserción/eliminación aleatoria** (RID) introducido por Murakami *et al.* (2002) se basa en la eliminación y subsiguiente inserción de un número arbitrario de bases, de manera aleatoria, a lo largo de la secuencia de un gen. En este método, el ADN molde de una sola hebra y en forma circular, se somete a un tratamiento con un complejo formado por Cerio con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), denominado Ce(IV)-EDTA, para generar el rompimiento en una región aleatoria del gen. Posteriormente se hace la ligación de un fragmento de doble hebra en cada uno de los extremos del ADN molde, el cual contiene sitios de restricción y una secuencia de eliminación o inserción. La segunda hebra es completada por PCR utilizando cebadores dentro del casete. Se eliminan en cada extremo de la doble hebra las partes del fragmento ligado que contienen los sitios de restricción, quedando solo la secuencia de eliminación o inserción. La construcción de doble hebra de ADN en forma circular que contiene ahora la modificación, puede utilizarse para la construcción de la genoteca (Murakami *et al.*, 2003). Las principales desventajas de éste modo son su complejidad, su alto costo y el enorme consumo de tiempo.

La desventaja de los métodos anteriores es que la obtención de un biocatalizador nuevo con las propiedades deseadas requiere varios ciclos repetitivos de mutagénesis e identificación de las mejores variantes. Por lo tanto, estas metodologías se utilizan normalmente como punto de partida y

una vez seleccionadas las mejores variantes, éstas se someten a un proceso de recombinación “in vitro” (métodos sexuales).

El primer método sexual desarrollado es el **barajado o mezclado de ADN** (“DNA shuffling” o “gene shuffling”). El método consiste en la digestión de un gen con DNAsa I, enzima que corta ADN en forma inespecífica, con el fin de generar fragmentos que son reensamblados posteriormente por PCR. En este proceso los mismos fragmentos sirven como templados y cebadores (Stemmer, 1994). El barajado de ADN es similar al proceso de recombinación natural y ha sido una herramienta muy efectiva para la creación de biocatalizadores nuevos (Shibuya *et al.*, 2000; Sun Fong *et al.*, 2000; Giver *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 2008). Recientemente se ha introducido una variante de esta metodología, en la que se utilizan familias de genes (identidad >70%) para generar los fragmentos y crear genotecas de secuencias quiméricas. A esta variante se le ha denominado barajado de familias de ADN (“DNA family shuffling” o “molecular breeding”). La ventaja de esta es que se genera mucha diversidad en genotecas relativamente pequeñas (Fig. 3, panel A).

El grupo de Arnold (Zhao *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 1998), ha desarrollado también otras dos variantes del barajado de ADN: la **extensión vacilante** (“staggered extension process”, StEP) y la **recombinación por cebado al azar** (“Random-priming recombination”, RPR). La StEP se basa en un protocolo de PCR modificado, donde se utilizan dos o más genes homólogos como templados, un grupo de cebadores (específicos para cada gen) y tiempos cortos para las reacciones de hibridación y extensión. Los pequeños oligómeros generados en una primera reacción se disocian del templado original y cambian a otro templado aleatoriamente extendiendo otro gen nuevamente en tiempos cortos de hibridación y extensión. Varias repeticiones permiten la recombinación y formación de genes completos, con los que se construye una

genoteca de variantes y después se someten al proceso de selección (Zhao *et al.*, 1998) (Fig. 3, panel B).

A diferencia de la StEP, en la recombinación por cebado al azar se utilizan cebadores no específicos con introducción de mutaciones puntuales adicionales los cuales pueden hibridar con los genes homólogos de interés para generar fragmentos aleatorios de ADN. Estos fragmentos sirven como cebadores de su propio gen y de los otros genes, generando así un gen completo del mismo modo en que ocurre en las técnicas descritas para StEP. La frecuencia de mutación se puede modificar variando la concentración y tamaño de los cebadores, el tiempo de reacción y la temperatura de hibridación (Shao *et al.*, 1998).

Volkov *et al.* (1999) desarrollaron un nuevo método para la formación de **híbridos de ADN (heterodúplex) *in vitro* y reparación de ADN *in vivo***. La metodología consiste en digerir con una enzima de restricción plásmidos que contienen los genes homólogos que se desean recombinar. Los plásmidos se mezclan y se someten a una temperatura de 96°C para desnaturalizar el ADN. Se deja que las cadenas de ADN formen híbridos de manera poco específica tras una incubación a 4°C. Se hace la transformación de células de *E. coli* con la mezcla anterior y el ADN es reparado por las enzimas encargadas de los procesos de reparación y recombinación de la bacteria. La eficiencia de transformación y recuperación de genes mutantes aumenta considerablemente si la mezcla se liga previamente. Una característica importante de este método es que permite la recombinación de genes enteros e incluso regiones mayores, como pueden ser operones.

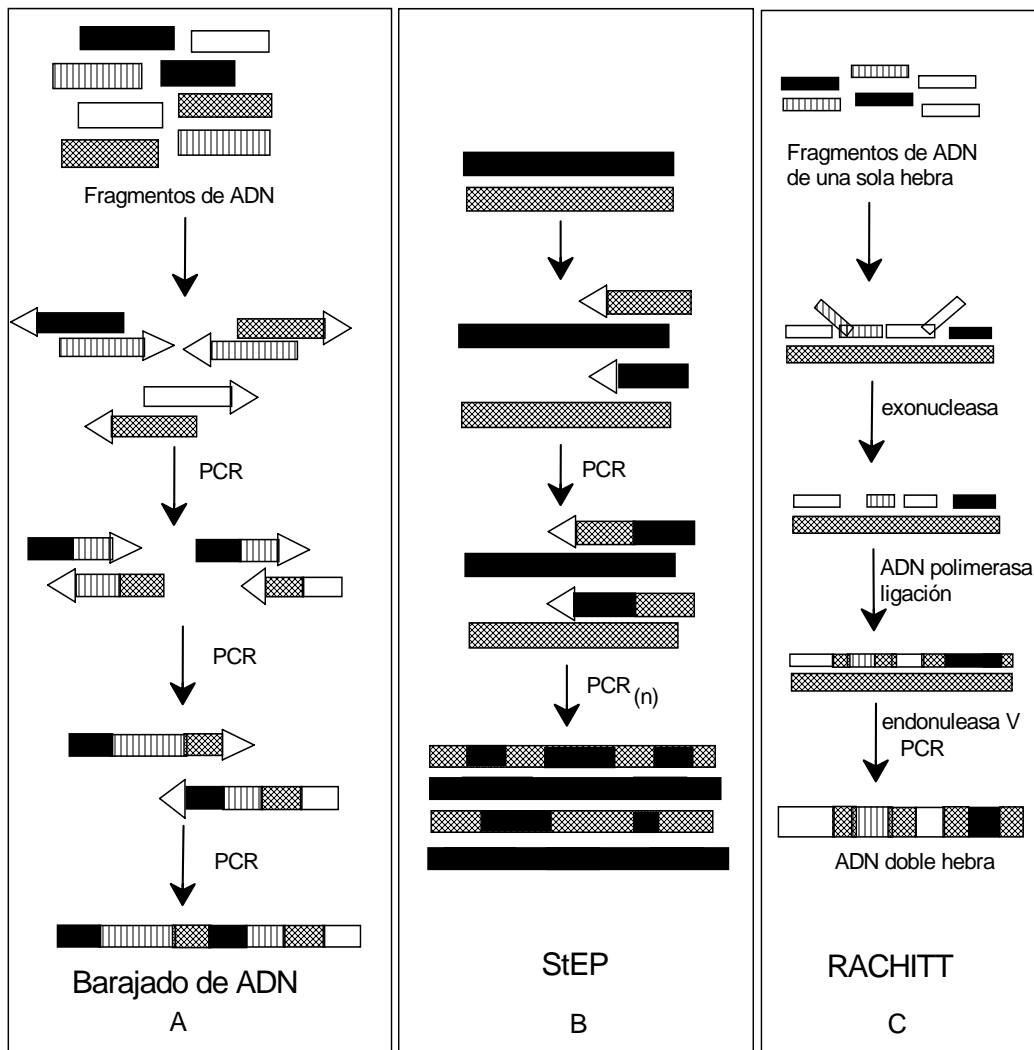
Un método reciente es la **generación aleatoria de secuencias quiméricas sobre un templado transitorio** ("Random chimera genesis on transient templates", RACHITT). En este método, se generan fragmentos aleatorios provenientes de 1 sola hebra de ADN de las dos posibles de cada uno de los

genes homólogos. Estos fragmentos son reensamblados posteriormente usando como templado la otra hebra complementaria que no se fragmentó. Las regiones que no ensamblaron se remueven por digestión con una exonucleasa, y los huecos generados se completan con una DNA polimerasa para finalmente ligarse. El templado se remueve con endonucleasa V de forma que quede solo la hebra que contiene los fragmentos ligados y a partir de esta se genera una doble hebra de ADN. Este método genera un gran número de recombinaciones (Coco, 2003; Farinas *et al.*, 2001). La desventaja del método es el enorme número de pasos requeridos (Fig. 3, panel C).

Finalmente, otro método para generar genotecas de genes mezclados es el denominado **Truncado gradual para crear enzimas híbridas** ("Incremental truncation for the creation of hybrid enzymes", ITCHY). La ventaja de este procedimiento es que no requiere que los genes sean homólogos para realizar la recombinación. En esta técnica, dos genes seleccionados se cortan de forma gradual con exonucleasa III en condiciones controladas que permitan obtener genes truncados con diferencia de una sola base. Los extremos 5' de un gen y los extremos 3' del otro gen se ligan de forma aleatoria para generar una genoteca de secuencias quiméricas que incluye todas las posibles combinaciones de fragmentos de distintos tamaños de uno y otro gen (Fig. 4), (Ostermeier *et al.*, 1999; Petrounia & Arnold, 2000).

Para el caso de genes de origen eucariote que no se pueden expresar en bacterias, el **método CLERY** ("Combinatorial libraries enhanced by recombination in yeast") es una alternativa. Esta metodología combina el barajado de DNA "*in vitro*" y el barajado "*in vivo*" en levaduras (Farinas *et al.*, 2001; Abecassis *et al.*, 2000). Este método también es muy útil para la evolución dirigida de vías metabólicas (Chatterjee *et al.*, 2006).

Miller *et al.* (2006) reportó un método que involucra la generación de células artificiales para la

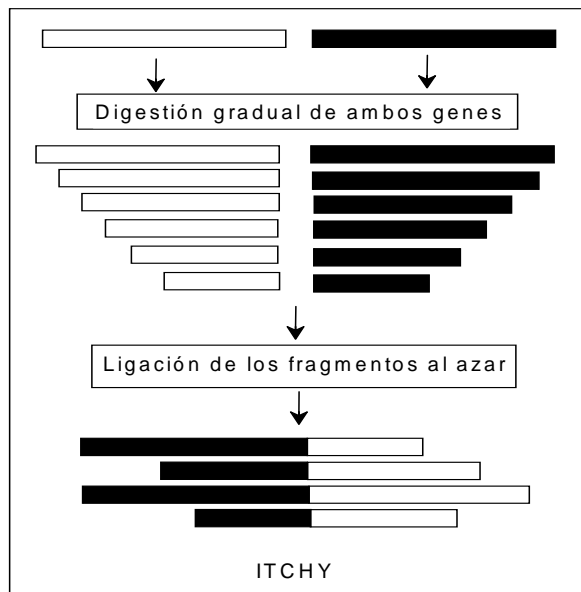


**Fig. 3.** Métodos sexuales o recombinantes. A) Barajado de ADN. Se parte de una familia de genes homólogos que se digieren con DNAsa I para generar fragmentos. Se someten a una PCR donde los fragmentos funcionan como cebadores y templados. Se generan fragmentos de mayor tamaño conforme transcurren los ciclos de amplificación, hasta generar genes completos y se construye una genoteca de genes quiméricos. B) Extensión vacilante (StEP). Dos o más genes se extienden a partir de cebadores específicos durante un periodo de tiempo muy corto. Los fragmentos pequeños se someten a una PCR donde los tiempos de hibridación y extensión son muy cortos, lo cual obliga a los fragmentos a cambiar de templado y seguir extendiendo al otro gen. Después de varias repeticiones se logran obtener genes híbridos completos. C) Método RACHITT. Los fragmentos generados provienen de 1 sola hebra de ADN. Estos son reensamblados usando como templado la otra hebra complementaria. Las regiones que no ensamblaron se remueven con una exonucleasa, los huecos generados se llenan con una DNA polimerasa y se ligan. El templado se remueve con endonucleasa V de forma que quede solo la hebra que contiene los fragmentos ligados y a partir de esta se genera una doble hebra de ADN.

evolución dirigida de proteínas (“**In Vitro Compartmentalization**”, **IVC**). Se genera previamente una genoteca de variantes y las células artificiales son generadas con una emulsión agua-aceite, cada gota contiene un gen con toda la maquinaria molecular necesaria para expresarlo.

Se siguen desarrollando nuevas metodologías considerando las limitaciones que presentan cada una y la necesidad de desarrollar mejores técnicas de recombinación. Muchas son derivadas o combinan las anteriormente descritas. Tal es el caso de barajado de ADN sintético (Ness *et al.*, 1999), una combinación de los métodos ITCHY y

barajado de ADN, “SCRATCHY” (Lutz *et al.*, 2001), recombinación de proteínas independiente de la homología entre secuencias, “SHIPREC” (Sieber *et al.*, 2001), mutagénesis combinatorial ortogonal (Gaytan *et al.*, 2001), ingeniería de proteínas combinatorial basada en la estructura, “SCOPE” (O’Maille *et al.*, 2002), ensamble de oligonucleótidos diseñados, “ADO” (Zha *et al.*, 2003), barajeo de codones (Rao *et al.*, 2005) y barajeo de ADN *In vivo* (Xu *et al.*, 2006).



**Fig. 4.** Truncado gradual para obtener enzimas quiméricas (ITCHY). Dos genes no homólogos se cortan de forma gradual con una exonucleasa. Los genes truncados generados son ligados y se construyen genotecas de genes quiméricos.

### Métodos de aislamiento y selección de mutantes

Uno de los mayores retos en evolución dirigida es el contar con un sistema de selección adecuado y eficiente. Las características más importantes del método son la rapidez, exactitud y que esté dirigido a la identificación del biocatalizador esperado dentro de la numerosa genoteca de mutantes ( $10^4$ - $10^{12}$ ). En principio podemos distinguir dos enfoques: selección y tamizado, los cuales pueden combinarse o usarse consecutivamente.

Los sistemas basados en la selección se han utilizado tradicionalmente para enriquecer ciertos microorganismos, así como para la identificación de los productos de clonación deseados. En ellos se puede ver a simple vista la característica de interés que se desea seleccionar. Aunque este enfoque permite un análisis más rápido de una genoteca numerosa, su aplicación está limitada debido a la falta de sistemas de selección cuantitativos y aplicables.

Los sistemas basados en el tamizado permiten separar las variantes deseadas de acuerdo a sus propiedades. Estos métodos nos permiten

cuantificar la propiedad deseada con técnicas analíticas reproducibles, automatizadas y en escala de volúmenes reducidos.

### *Sistemas basados en la selección*

En el área de la evolución dirigida hay pocos ejemplos en los que se ha usado únicamente la selección para la identificación de biocatalizadores, ya que estos requieren actividades enzimáticas de lo más variadas. Algunos ejemplos son: a) A partir de una genoteca de mutantes de cefalosporinas obtenida por barajado de ADN, se seleccionaron variantes por crecimiento en placas de agar con cantidades crecientes de moxalactama (Cramer *et al.*, 1998) y b) Selección por crecimiento en placas con adipil-leucina ó adipil-serina, de mutantes de acilasa capaces de actuar sobre ácido adípico en lugar de ácido glutámico en cefalosporinas (Otten *et al.*, 2002).

La selección también puede ser utilizada fácilmente para la evolución de enzimas donde la sobrevivencia de la célula y la actividad enzimática están estrechamente ligadas. Un ejemplo de esto es el desarrollado por Naki *et al.* (1998), donde una subtilisina es sometida a un proceso de evolución dirigida; posteriormente las células son adheridas a fibras (una célula por fibra) y las mutantes son seleccionadas por su crecimiento utilizando albúmina sérica bovina como única fuente de nitrógeno. Las mutantes que secretan más subtilisina o que expresan una subtilisina con mayor actividad obtienen más fácilmente nitrógeno y por tanto crecen más rápido (Naki *et al.*, 1998; Arnold & Volkov, 1999).

En la expresión "*in vitro*", la estrategia de selección se basa en la modificación del gen por su producto. Un ejemplo de esto es la evolución de una metiltransferasa, la cual cataliza la metilación específica de ADN. El templado de ADN además de contener el gen de la metiltransferasa contiene la secuencia de metilación. La genoteca de mutantes es distribuida en la emulsión (un gen por gota acuosa) y expresada "*in vitro*". Las gotas de

agua dispersas en la fase hidrofóbica permiten que la selección se lleve a cabo dentro de este compartimiento que contiene el material genético (templado de ADN con la secuencia de metilación) y la enzima expresada (metiltransferasa). Las variantes activas de la enzima modifican el templado de ADN con el cual se encuentran protegiéndolo de ser cortado con la endonucleasa *HaeIII*. La emulsión se rompe y los templados de ADN metilados son aislados y seleccionados. El ciclo se puede repetir cuantas veces sea necesario (Tawfik & Griffiths, 1998).

Existen otros métodos mucho más familiares como la prueba de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) pero desafortunadamente los anticuerpos específicos para todas las posibles proteínas no están disponibles.

### *Sistemas basados en el tamizado*

Dado el gran número de variantes que se generan por evolución dirigida, las herramientas analíticas comunes como cromatografía de gases y HPLC no son útiles (implican costo elevado y mucho tiempo). Se desarrollan entonces los métodos espectrofotométricos, especialmente los colorimétricos y fluorométricos en formatos de microplaca (volúmenes de  $\mu\text{L}$ ) como una alternativa necesaria. Tanto el color como la fluorescencia son señales que se pueden medir fácilmente cuando se cuenta con el equipo adecuado. Se utilizan sistemas automatizados que pueden tomar cientos de muestras simultáneamente y someterlas a un tratamiento que nos permita cuantificar la actividad de la enzima que nos interesa. Este tipo de instrumentos reduce enormemente el tiempo dedicado a la exploración y selección de mutantes. Así mismo, mejora la reproducibilidad de las mediciones y puede hacerse en escalas que resulten económicamente atractivas. Ahora se han desarrollado sistemas que utilizan electroforesis capilar en paralelo, arreglos de termistores (componentes electrónicos cuya resistencia cambia con la temperatura) y la termografía de infrarrojo

para seguir el desarrollo de las reacciones (Wahler & Reymond, 2001). Recientemente se han automatizado también tecnologías de espectrometría de masas como “Electrospray Ionization Mass Spectrometry” (ESI-MS) y “Matriz Assisted Laser desorption-ionization Mass Spectrometry” (MALDI-MS) para la identificación de intermediarios, sustratos y productos de bajo peso molecular en una mezcla de reacción (Liesener *et al.*, 2005; Chen, *et al.*, 2003, Bolbach, 2005).

Las metodologías que se han empleado para tamizado de biocatalizadores enantioselectivos involucran un estudio adecuado de los estereoisómeros para diseñar análogos cuantificables. Un ejemplo es el aislamiento de mutantes de una esterasa de *Pseudomonas fluorescens* por su capacidad enantioselectiva mejorada hacia los resorufin ésteres de los ácidos (R)- ó (S)-3-fenilbutírico (Henke & Bornscheuer, 1999). Otro ejemplo más sofisticado es el realizado por Reetz *et al.* (1999), quienes han trabajado en el aislamiento de variantes de lipasas utilizando *o*-nitrofenil ésteres de ácidos grasos. Después de la hidrólisis del éster se libera *o*-nitrofenol, el cual es un compuesto amarillo que puede ser cuantificable (Reetz, 2000). Una desventaja de estas metodologías es la selección por la hidrólisis del éster del grupo cromóforo y no del verdadero éster que se va a utilizar en las reacciones de síntesis orgánica, por ejemplo un acetato de un alcohol racémico. Para resolver esto, este grupo desarrolló una metodología mas sofisticada en la que utiliza acetatos de alcoholes quirales marcados isotópicamente, seguido de un análisis de los productos de hidrólisis por espectrometría de masas (Reetz *et al.*, 1999; Sutherland, 2000). Como alternativa se puede utilizar una cámara IR-termográfica para identificar las reacciones exotérmicas y por tanto las variantes activas (Reetz *et al.*, 1998).

También se han reportado ensayos cuantitativos rápidos basados en indicadores de pH. En el caso de las lipasas y esterasas, la hidrólisis de un éster

produce un equivalente químico del ácido correspondiente que a su vez produce una disminución del pH. Esta disminución puede ser detectada espectrofluorométricamente con un compuesto sensible a cambios de pH. Incluso, es posible inmovilizar el colorante para seguir una reacción catalizada enzimáticamente (Moris-Varas *et al.*, 1999).

Otra alternativa para los ensayos de aislamiento es el uso de la tecnología de separación de células activadas por fluorescencia (FACS). La tecnología FACS se basa en la separación física de poblaciones de células previamente reconocidas por la fluorescencia de sus marcadores. Hyun *et al.* (1999) reportaron el aislamiento de dioxigenasas capaces de hidroxilar compuestos aromáticos utilizando esta metodología. El ensayo de aislamiento se basa en la producción de catecol por la dioxigenasa, el cual sirve como sustrato para la peroxidasa de rábano que lo polimeriza para generar un compuesto altamente fluorescente. Cuando las dos enzimas (dioxigenasa, peroxidasa) son co-expresadas en una misma célula, la célula presenta fluorescencia en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sustratos aromáticos. Los productos permanecen asociados a la célula y permite el aislamiento de las células con la actividad enzimática por FACS. Otros autores han reportado y propuesto el uso de esta tecnología como una herramienta de alta resolución y rápida para el aislamiento en evolución dirigida (Olsen *et al.*, 2003).

Una metodología mas sofisticada, es la presentación en fagos (“phage display”) para seleccionar mutantes con actividad catalítica. En esta técnica se fusiona la enzima de interés con una de las proteínas de la cápside de un bacteriófago, de modo que la molécula queda expuesta en la superficie del bacteriófago. Los bacteriófagos aislados de un medio de cultivo son posteriormente seleccionados en base a su capacidad de unirse a una fase sólida que tiene unido covalentemente el ligando de la proteína, comportándose como una matriz cromatográfica de

afinidad (Forrer *et al.*, 1999). En otra variante de esta metodología, la enzima de interés expuesta en la superficie del fago permite que el producto permanezca también unido y posteriormente se utiliza un anticuerpo específico para el producto para identificar los fagos catalíticamente activos (Dermatis *et al.*, 1999). Las ventajas de éste método son: su eficiencia, ya que se pueden probar simultáneamente hasta  $10^{12}$  variantes de un gen, permite seleccionar en un solo paso cromatográfico a aquellas variantes que cumplen con el requisito de afinidad por un ligando y puede ser modificado para detectar catálisis en lugar de afinidad. Sin embargo, proteínas multiméricas no pueden organizarse en multímeros y es posible que la proteína fusionada a la proteína del fago no se pliegue adecuadamente perdiendo sus propiedades de unión y catálisis.

### **Ejemplos de biocatalizadores mejorados por evolución *in vitro***

Los ejemplos que se describen a continuación muestran la capacidad de la evolución dirigida para crear biocatalizadores con las propiedades de interés, estos pueden dividirse de acuerdo a la característica de la enzima que se modifica: especificidad de sustrato, enantioselectividad, etc. (Tabla 2).

#### *Modificación de la enantioselectividad*

En la industria farmacéutica se requieren principalmente catalizadores enantioselectivos, ya que las moléculas biológicas, que son el blanco de los fármacos, reconocen ligandos en función de su estereoisomería. Por esta razón, mucho del trabajo en evolución dirigida se ha enfocado a mejorar biocatalizadores enantioselectivos. En este sentido, se ha desarrollado mucha investigación con lipasas y estererasas debido a que son muy estables, trabajan en presencia de solventes orgánicos y son aplicables para la síntesis de compuestos ópticamente activos debido a su alta estereoselectividad (Schmidt *et al.*, 2004). Un

ejemplo es el trabajo desarrollado por Liebeton *et al.* (2000) donde incrementaron considerablemente la enantioselectividad ( $E$ ) de una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* por el 2-metildecanoato. En este estudio se realizaron seis generaciones de mutantes por medio de ep-PCR. Las células que expresaban la enzima se evaluaron por actividad con cada uno de los enantiómeros del compuesto modelo, que en este caso es el *p*-nitrofenil éster del ácido 2-metildecanoico. La enantioselectividad de la enzima silvestre era  $E = 1.1$ , lo cual implica que prácticamente no presentaba enantioselectividad. Aquellas variantes que presentaron valores mayores de la  $E$  aparente, fueron puestas en contacto con una mezcla racémica del sustrato y los productos fueron analizados por cromatografía de gases quiral para calcular su  $E$  real. Por este método se logró seleccionar una variante con una  $E$  de 11. Las posiciones de los residuos de aminoácido que resultaron estar relacionados con la enantioselectividad fueron posteriormente exploradas por mutagénesis sitio-específica saturante. La variante generada de este modo presentó 5 aminoácidos modificados, mismos que modificaron su enantioselectividad hasta un valor de  $E$  de 26. Un análisis posterior de las posiciones mutadas en el modelo cristalográfico de la lipasa demostró que estos residuos no están en contacto directo con el estereocentro del sustrato e incluso se localizan lejos del sitio activo, por lo que una mutagénesis racional difícilmente hubiera conducido a las mismas mutaciones. Los autores señalan que estos residuos muy probablemente aumentan la flexibilidad conformacional de la lipasa y esta flexibilidad podría estar asociada a la enantioselectividad (Nardini *et al.*, 2000).

Otro ejemplo es el reportado por el grupo de Arnold (May *et al.*, 2000) para la inversión de enantioselectividad de una hidantoinasa por el isómero D (40% ee) a una moderada por el isómero L (30% ee). La metodología usada para la evolución fue ep-PCR y mutagénesis sitio-específica saturante. La sustitución de sólo un

**Tabla 2.** Ejemplos de nuevos biocatalizadores generados por evolución dirigida.

Enzima	Modificación	Método de mutagénesis	Selección y/o aislamiento	Resultado	Observaciones	Referencia
Esterasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Especificidad de sustrato	Cepas mutagénicas	Crecimiento con indicador de pH	Mutante con el doble de actividad	Enantioselectividad baja	Bornscheuer, <i>et al.</i> , 1999
Lipasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Incrementar enantioselectividad	ep-PCR y cepas mutagénicas	Ensayos microplacas con <i>p</i> -nitrofenil ésteres	Incremento de enantioselectividad (E) de 1 a 26.	5 mutaciones, ninguna en el sitio de unión del sustrato	Liebeton <i>et al.</i> , 2000; Reetz <i>et al.</i> , 1999; Reetz <i>et al.</i> , 2000
Esterasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Actividad en presencia de dimetilformamida (DMF)	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Ensayos microplacas con <i>p</i> -nitrofenil ésteres	Incremento 150 veces la estabilidad en DMF	Mayor actividad sobre <i>p</i> -nitrofenil éster de palmitato que sobre éster de butirato	Arnold & Moore, 1997
Hemoperoxidasa de <i>Coprinus cinereus</i>	Estabilidad y actividad bajo condiciones de lavado	ep-PCR, cepas mutagénicas y barajado de ADN	Incubación microplacas a pH alcalino, con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Actividad residual	Aumento 100 veces la estabilidad en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y 170 veces la termoestabilidad		Cherry <i>et al.</i> , 1999
Hidantoinasa de <i>Arthrobacter sp.</i>	Enantioselectividad reversa (isómero L)	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Ensayos microplacas con D y L-hidantoínas	Cambio de actividad sobre el isómero L	Incremento adicional de la actividad específica	May <i>et al.</i> , 2000
Subtilisina S41	Incrementar termoestabilidad	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa a temperaturas altas	Variante activa en el rango de 10-60°C		Miyazaki <i>et al.</i> , 2000
Esterasa de <i>Bacillus subtilis</i>	Incrementar termoestabilidad	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa a temperaturas altas	Incremento de 14°C en la termoestabilidad		Giver <i>et al.</i> , 1998
Glutarilacilasa de <i>Pseudomonas SY77</i>	Incrementar la actividad de adipil-acilasa	ep-PCR sobre la subunidad $\alpha$ y cepas mutagénicas	Crecimiento en placa en adipil-leucina	Incremento de la relación $V_{max}/K_m$ para adipil-7-ADCA		Sio <i>et al.</i> , 2002
Varias subtilisinas	Varios parámetros simultáneamente	Barajado de genes	Ensayos microplacas	Se obtienen variantes quiméricas muy activas	Se genera mucha diversidad	Ness <i>et al.</i> , 1999
Varias fitoeno desaturasas y licopenociclasas	Generación de nuevos carotenoides	ep-PCR, cepas mutagénicas, barajado de ADN	Crecimiento en placa, identificación visual	Carotenoides nuevos (torolueno)	Se evolucionó la vía de biosíntesis completa	Schmidt-Dannert <i>et al.</i> , 2000

aminoácido fue suficiente para el cambio de enantioselectividad y la actividad se incrementó 5

veces. Esta nueva enzima permitió la producción de L-metionina en *E. coli* a través de la expresión

de la nueva L-hidantoinasa, una L-carbamoilasa y una racemasa en este sistema.

### *Modificación de la especificidad de sustrato*

Un ejemplo interesante del uso de la evolución *in vitro* es el desarrollado por Bornschauer *et al.* (1999). En su trabajo, una doble mutante de una esterasa de *Pseudomonas fluorescens* fue generada con la cepa mutagénica *Epicurian coli* XL1-Red. Esta mutante adquirió la capacidad de hidrolizar estereoselectivamente un 3-hidroxi éster que, debido a un impedimento estérico, no es aceptado como sustrato por 20 hidrolasas comunes que fueron probadas. La identificación de las variantes se realizó en placas de agar con indicadores de pH, observándose un cambio de color después de la hidrólisis del éster y paralelamente en placas suplementadas con un glicerol derivado del 3-hidroxi éster. Sólo las colonias que producían esterases activas podían utilizar el glicerol como fuente de carbono y por lo tanto presentaron mayor crecimiento.

Otro ejemplo es la conversión de una galactosidasa de *E. coli* a fucosidasa. La evolución de esta enzima se realizó por barajado de ADN y la identificación de las mutantes deseadas se basó en el uso de sustratos cromogénicos derivados de fucosa. Las fucosidasas generadas presentaron un incremento de 10-20 veces en los valores de  $k_{cat}/K_m$  para la fucosa, comparados con los valores obtenidos con la proteína original (Zhang *et al.*, 1997).

Sio *et al.* (2002) reportaron la conversión de actividad de una glutaril acilasa de *Pseudomonas* SY77 a una adipil-7-ADCA acilasa. El 7-ADCA (ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico) es un precursor importante en la síntesis de cefalosporinas semi-sintéticas. En una primera ronda de mutagénesis se localizaron los residuos que son importantes para la actividad. Posteriormente se hizo una mutagénesis sitio-específica saturante de la subunidad  $\alpha$  de esta enzima y se seleccionaron las variantes deseadas

por crecimiento con un derivado del sustrato. Se identificaron 3 mutantes con valores mayores de  $V_{max}/K_m$  para el análogo con cadenas laterales de adipil-7 ADCA y menores para los sustratos con cadenas laterales de glutarilo.

Las aldolasas son enzimas muy utilizadas en química orgánica para catalizar la reacción aldol asimétrica que permite la síntesis controlada de moléculas pequeñas complejas bioactivas. Por lo anterior, se han realizado numerosos trabajos de evolución dirigida con estas enzimas, algunos enfocados a la modificación de especificidad de sustrato (Bolt, *et al.*, 2008). Una aldolasa inusual es la 2-deoxiribosa-5-fosfato aldolasa (DERA) que cataliza la condensación entre dos aldehídos. Esta enzima ha sido modificada por evolución dirigida para la síntesis de fármacos de estatina (Jennewein, *et al.*, 2006).

Otro grupo de enzimas que también son muy utilizadas como biocatalizadores, son las citocromo P450, las cuales catalizan la introducción de un átomo de oxígeno en un sustrato orgánico. En especial las monooxigenasas P450 ayudan a la eliminación de fármacos en mamíferos y de contaminantes químicos ambientales. Se ha desarrollado mucho trabajo para la modificación por evolución dirigida de estas enzimas. Las técnicas de evolución dirigida se han aplicado en su mayoría para la modificación de la especificidad de sustrato (Gillam, 2007).

### *Incremento de la actividad de la enzima bajo las condiciones del proceso*

Si se cuenta con un biocatalizador con la estereoselectividad ó la especificidad por sustrato adecuada, éste puede no cumplir con los requerimientos necesarios para el proceso. Las propiedades de estabilidad de la enzima al pH, temperatura y disolventes difícilmente pueden ser mejoradas por los métodos clásicos como inmovilización ó mutagénesis sitio-dirigida. Nuevamente la evolución dirigida es una alternativa.

Un ejemplo es el descubrimiento de una esterasa de *Bacillus subtilis* capaz de hidrolizar *p*-nitrofenil ésteres de Loracarfeb (una antibiótico de la familia de las cefalosporinas). Sin embargo, dicha enzima presenta una actividad muy baja en presencia de dimetilformamida (DMF), disolvente que debe ser adicionado para la disolución del sustrato. La enzima se sometió a un proceso de evolución dirigida con ep-PCR y barajado de ADN, lo cual generó una variante con actividad incrementada 150 veces a la mostrada originalmente en DMF (Arnold & Moore, 1997). Adicionalmente, Giver *et al.*, (1998) reportó un incremento de 14°C en la termoestabilidad de esta esterasa *B. subtilis* después de ser modificada también por evolución dirigida.

Recientemente, la xilanasa A termoestable de *Thermofibida fusca* ha sido modificada exitosamente por barajado de ADN para incrementar la actividad catalítica y estabilidad en pH alcalino. El análisis de la variante generada mostró un cambio en la secuencia de 5 aminoácidos, 3 de ellos cercanos al sitio activo (Wang Q & Xia T, 2008).

Un ejemplo desarrollado directamente para una aplicación industrial es el reportado por Cherry *et al.*, (1999). En un intento por producir variantes adecuadas para su uso en detergentes biológicos, una hemoperoxidasa de *Coprinus cinereus* fue sometida a múltiples rondas de evolución dirigida. Las mutantes se obtuvieron por ep-PCR y mutagénesis sitio-dirigida y se identificaron por su estabilidad mejorada midiendo la actividad residual después de ser incubadas en condiciones similares a las de lavado (pH=10.5, 50°C, 5-10mM peróxido). Se realizó otra ronda de evolución dirigida por barajado de ADN y se encontró una variante con un incremento marcado en la estabilidad oxidativa (100 veces) y en la estabilidad térmica (174 veces) en comparación con la enzima original.

En general se ha asumido que la adecuación de una característica de un biocatalizador en un sentido ésta comprometida con la pérdida o

disminución de otras características de la enzima. Usualmente se considera que la estructura de una enzima requiere de cierta rigidez para que ésta presente actividad a alta temperatura y que, en consecuencia, esta rigidez actúa en contra de la actividad a temperaturas menores. Sin embargo, se ha demostrado que esto no es del todo cierto; tal es el caso de la evolución *in vitro* de una subtilisina que trabaja habitualmente a bajas temperaturas. Las variantes de esta enzima obtenidas por evolución dirigida mostraron un incremento de la termoestabilidad hasta 60°C sin perder la actividad mostrada a 10°C (Miyazaki *et al.*, 2000). En otro trabajo desarrollado por la empresa Novo Nordisk se lograron obtener variantes de una subtilisina a partir de una genoteca generada por barajado de ADN. Lo interesante es que dichas variantes mostraron mejoras de 4 parámetros simultáneamente: actividad a 23°C, termoestabilidad, tolerancia a disolventes orgánicos y pH (Ness *et al.*, 1999).

### *Perspectivas*

La evolución dirigida es una herramienta muy útil para la obtención de nuevos biocatalizadores por lo que nuevos métodos de mutagénesis y recombinación más específicos se están desarrollando.

Hasta la fecha la evolución dirigida se ha enfocado casi de manera específica en mejorar biocatalizadores. Sin embargo, recientemente también se ha aplicado en el campo de la ingeniería de vías metabólicas completas (Johannes & Zhao, 2006). De este modo, la síntesis de análogos de productos naturales, un campo que sólo estaba reservado a la química orgánica, podrá en un futuro efectuarse por evolución de vías metabólicas. Un ejemplo es la generación de carotenoides cíclicos como el toruleno, mediante el barajado de genes de desaturasas de fitoeno y ciclasas de licopeno, provenientes de diferentes especies de bacterias (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000). Se han obtenido nuevos compuestos derivados de la evolución de la

vía de biosíntesis de carotenoides, la cual ha servido como base para la evolución de otras vías metabólicas (Umeno *et al.*, 2005).

En los ejemplos mencionados, las mutaciones encontradas y su efecto sobre las propiedades catalíticas de las enzimas muestran nuestro pobre entendimiento de la relación entre estructura y función de las enzimas. Sin embargo, los conocimientos generados por estos métodos no racionales, así como por los estudios estructurales racionales, nos permitirán acceder al diseño racional de proteínas en un futuro no muy lejano.

## REFERENCIAS

- Abecassis V, Pompon D & Truan G (2000) High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and *in vivo* DNA recombination in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Res.* 28: e88.
- Arnold FH (1998) Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.* 31: 125-131.
- Arnold FH & Moore JC (1997) Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58: 1-14.
- Arnold FH & Volkov A (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 54-59.
- Bolbach G (2005) Matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of non-Covalent complex: fundamentals and applications. *Curr. Pharm. Dess.* 20: 2535-2557.
- Bolt A, Berry A & Nelson A (2008) Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry. *Arch Biochem Biophys.* In press. doi:10.1016/jabb.2008.01.005
- Bornscheuer UT (1998) Directed evolution of enzymes. *Angew Chem Int. Ed. Engl.* 37: 3105-3108.
- Bornscheuer UT, Altenbuchner J & Meyer HH (1999) Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2169-2173.
- Cadwell C & Joyce G (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods and Applications*, 2: 28-33.
- Chatterjee R & Yuan L (2006) Directed evolution of metabolic pathways. *Trends Biotechnol.* 24: 28-38.
- Chen P (2003) Electrospray ionization tandem mass spectrometry in high-throughput screening of homogeneous catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42: 2832-2847.
- Cherry JR & Lamsa MH (1999) Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nat. Biotechnol.* 17: 379-384.
- Coco WM (2003) RACHITT: Gene family shuffling by random chimeragenesis on transient templates. *Methods Mol. Biol.* 231: 111-127.
- Cramer A, Raillard S, Bermudez E & Stemmer W (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391: 288-291.
- Dermatis S, Huber A & Viti F (1999) A strategy for the isolation of catalytic activities from
- Farinas ET, Bulter T & Arnold FH (2001) Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 545-551.
- Ferrer P, Jung S & Pluckthun A (1999) Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 514-20.
- Gaytan P, Yanez J, Sanchez F & Soberon X (2001) Orthogonal combinatorial mutagenesis: a codon-level combinatorial mutagenesis method useful for low multiplicity and amino acid-scanning protocols. *Nucleic Acids Res.* 29: e9-17
- Gillam EM (2007) Extending the capabilities of nature's more versatile catalysts: Directed evolution of mammalian xenobiotic-metabolizing P450s. *Arch. Biochem. Biophys.* 464: 176-186.
- Giver L; Gershenson A, Freskgard P & Arnold FH (1998) Directed evolution of a thermostable esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 12809-12813.

- Henke E & Bornscheuer UT (1999) Directed evolution of an esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Random mutagenesis by ep-PCR or a mutator strain and identification of mutants showing enhanced enantioselectivity by a resorufin-based fluorescence assay. *Biol. Chem.* 380: 1029-1033.
- Hughes MD, Nagel DA, Santos AF, Sutherland AJ & Hine AV (2003) Removing the redundancy from randomised gene libraries. *J. Mol. Biol.* 331: 973-79.
- Hyun J, Akira A, Lin Z & Arnold FH (1999) A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. *Chemistry & Biology*. 6: 699-706.
- Jaeger KE, Eggert T, Eipper A & Reetz MT (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 519-530.
- Jennewein S, Schürmann M, Woldweg M, Hilker I, Lutein R, Wubbolts M (2006) Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase. *Biotechnol. J.* 1: 537-548.
- Johannes TW & Zhao H (2006) Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 261-267.
- Liebeton K, Zonta A, Schimossek K, Nardini M, Lang D, Dijkstra BW, Reetz MT & Jaeger KE (2000) Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* 7: 709-718.
- Liese A, Seelbach K & Wandrey C (2000) Industrial Biotransformations. Wiley-VCH (eds).
- Liesener A & Karst U (2005) Monitoring enzymatic conversions by mass spectrometry: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 1451-1464.
- Lutz S, Ostermeier M, Moore GL, Maranas CD & Benkovic SJ (2001) Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 11248-11253.
- May O, Nguyen PT & Arnold FH (2000) Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.* 18: 317-320.
- Miyazaki K, Wintrode PL, Grayling RA, Rubingh DN & Arnold FH (2000) Directed evolution study of temperature adaptation in a psychrophilic enzyme. *J. Mol. Biol.* 297: 1015-1026.
- Miller OJ, Bernath K, Agresti JJ, Amitai G, Kelly BT, Mastrobatista E, Taly V, Magdassi S, Tawfik DS & Griffiths AD (2006) Directed evolution by *in vitro* compartmentalization. *Nature*. 3: 561-570.
- Moris-Varas F (1999) Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2183-2188.
- Murakami H, Hohsaka T & Sisido M (2002) Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs. *Nat. Biotechnol.* 20: 76-81.
- Murakami H, Hohsaka T & Sisido M (2003) Random insertion and deletion mutagenesis. *Methods Mol. Biol.* 231: 53-64.
- Naki D, Paech C, Ganshaw G & Schellenberger V (1998) Selection of a subtilisin-hyperproducing *Bacillus* in a highly structured environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 290-294.
- Nardini M, Lang DA, Liebeton K, Jaeger KE & Dijkstra BW (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* 275: 31219-31225.
- Ness JE, Welch M, & Giver L (1999) DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.* 17: 893-896.
- Neylon C (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Research.* 32: 1448-1459.
- Olsen MJ, Gam J, Iverson BL & Georgiou G (2003) High-throughput FACS method for directed evolution of substrate specificity. *Methods Mol. Biol.* 230: 329-342.

- O'Maille PE, Bakthina M & Tsai MD (2002) Structure-based combinatorial protein engineering (SCOPE). *J. Mol. Biol.* 321: 677-691.
- Ostermeier M, Nixon AE & Bencovic SJ (1999) Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2139-2144.
- Otten LG, Sio CF, Vrieling J, Cool RH & Quax WJ (2002) Altering the substrate specificity of cephalosporin acylase by directed evolution of the Beta  $\beta$ -subunit. *J. Biol. Chem.* 277: 42121-42127.
- Panke S, Held M & Wubbolts M (2004) Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. Review. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 272-279.
- Petrounia IP & Arnold FH (2000) Designed evolution of enzymatic properties. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 325-330.
- Rao A, Chopra S, Ram G, Gupta A & Ranganatahn A (2005) Application of the "codon shuffling" method: Synthesis and selection of the *novo* proteins as antibacterials. *J. Biol. Chem.* 280: 23605-23614.
- Reetz MT (2000) Evolution in the test tube as a means to create enantioselective enzymes for use in organic synthesis. *Sci. Prog.* 83: 157-172.
- Reetz MT, Becker MH, Klein HW & Stöckigt (1999) A method for high throughput screening of enantioselective catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38: 1758-1761.
- Reetz MT, Becker MH, Kühling KM & Holzwarth A (1998) Time-resolved IR-thermographic detection and screening of enantioselectivity in catalytic reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37: 2647-2650.
- Riesenfeld CS, Schloss PD & Handelsman J. (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525-552.
- Ryu K, Hwang SY, Kim KH, Kang JH & Lee EK (2008) Functionality improvement of fungal lignin peroxidase by DNA shuffling for 2,4-dichlorophenol degradability and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stability. *J. Biotechnol.* 133:110-5.
- Schmidt-Dannert C, Umeno D & Arnold FH (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.* 18:750-3.
- Schmidt M, Baumann M, Henke E, & Bornscheuer UT (2004) Directed evolution of lipases and esterases. *Methods Enzymol.* 388: 199-207.
- Shao Z, Zhao H, Giver L & Arnold FH (1998) Random-priming in vitro recombination: an effective tool for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 26: 681-683.
- Shibuya H, Kaneko S & Hayashi K (2000) Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of xylanase by random gene shuffling. *Biochem. J.* 349: 651-656.
- Sieber V, Martinez CA & Arnold FH (2001) Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat. Biotechnol.* 19: 456-460.
- Sio CF, Riemens AM, van der Laan JM, Verhaert RM & Quax WJ (2002) Directed evolution of a glutaryl acylase into an adipyl acylase. *Eur. J. Biochem.* 269: 4495-4504.
- Stemmer W (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10747-10751.
- Sun Fong, Machajewsky TD, Chi Ching Mak & Chi-Huey Wong (2000) Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D and L-sugars. *Chem. Biol.* 7: 873-883.
- Sutherland JD (2000) Evolutionary optimisation of enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 263-269.
- Tawfik DS & Griffiths AD (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* 16: 652-656.
- Umeno D, Tobias AV & Arnold FH (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 51-78.
- Urban A, Neukirchen S & Jaeger K (1997) A rapid and efficient method for site-directed

- mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* 25: 2227-2228.
- Voigt CA, Mayo SL, Arnold FH & Wang ZG (2001)a Computationally focusing the directed evolution of proteins. *J. Cell Biochem. Suppl.* 37: 58-63.
- Voigt CA, Kauffman S & Wang ZG (2001)b Rational evolutionary design: The theory of in vitro protein evolution. En *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 55) *Evolutionary Protein Design* (F.H. Arnold, Ed.). Academic Press, San Diego pp. 79-160.
- Volkov AA, Shao Z & Arnold FH (1999) Recombination and chimeragenesis by in vitro heteroduplex formation and in vivo repair. *Nucleic Acids Res.* 27: E18.
- Wahler D, Reymond JL (2001) High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 535-544.
- Wang Q & Xia T (2008) Enhancement of the activity and alkaline pH stability of *Thermobifida fusca* xylanase A by directed evolution. *Biotechnol. Lett.* In press. doi 10.1007/s10529-007-9508-1.
- Wong TS, Roccatanno D, Zacharias M & Schwanenberg UA (2006) Statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J. Mol. Biol.* 355: 858-871.
- Wong TS, Tee KL, Hauer B & Schwanenberg UA (2004) Sequence saturation mutagenesis (SeSam) a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.* 32: e26 .
- Xu S, Ju J, Misono H & Ohnishi K (2006) Directed evolution of extradiol dioxygenase by a novel in vivo DNA shuffling. *Gene*, 368: 126-137.
- Zha D, Eipper A & Reetz MT (2003) Assembly of Designed Oligonucleotides as an Efficient Method for Gene Recombination: A New Tool in Directed Evolution. *Chem. Bio. Chem.* 4: 34-39.
- Zhang JH, Dawes G & Stemmer WP (1997) Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 4504-4509.
- Zhao H, Giver L, Shao Z, Affholter JA & Arnold FH (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* 16: 258-26.

## Represión Catabólica por Carbono de Bacterias Gram-Positivas: Inteligencia Alimenticia

Angela Forero, Sergio Sánchez

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. E-mail:  
avforerof@biomedicas.unam.mx; sersan@biomedicas.unam.mx*

**Palabras clave:** represión catabólica, bacterias Gram-positivas, sistema PTS, *Streptomyces*

**Key words:** catabolite repression, Gram-positive bacteria, PTS system, *Streptomyces*

### RESUMEN

La represión catabólica por carbono (RCC) ha sido definida como la inhibición de la expresión de genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono secundarias, causada por sustratos carbonados que son degradados rápidamente. El mecanismo responsable de éste efecto involucra el transporte y metabolismo de la fuente de carbono represora. Dentro de los sistemas de transporte de carbohidratos que muestran funciones de regulación metabólica y transcripcional en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, el más estudiado y mejor entendido es el sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) de *Escherichia coli*. En otros sistemas microbianos como *Bacillus subtilis* y en algunos *Streptococcus* y *Lactococcus*, el conocimiento sobre el PTS y su participación en la RCC ha alcanzado un buen nivel de comprensión. Con relación a bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina-citosina (GC) como los estreptomicetos, si bien se han reportado avances en el conocimiento del sistema de transporte y metabolismo de la glucosa y otras fuentes de carbono, no existe a la fecha un modelo aceptable que explique el mecanismo de RCC en este género. En esta revisión se analizan los principales mecanismos de regulación por carbono en bacterias Gram-positivas con alto y bajo contenido de GC en su genoma como son *S. coelicolor* y *B. subtilis*, respectivamente.

### ABSTRACT

The carbon catabolite repression (RCC) has been defined as the inhibition in the expression of genes required for secondary carbon sources utilization, caused by carbonated substrates that are rapidly degraded. The mechanism responsible for this effect involves the transport and metabolism of the repressor carbon source. Among the carbohydrate transport systems showing metabolic and transcriptional regulatory functions in Gram-positive and Gram-negative bacteria, the most studied and better understood is the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) from *Escherichia coli*. In other microbial systems like *Bacillus subtilis* and some *Streptococcus* and *Lactococcus*, the knowledge on the PTS and its participation in the CCR has reached a good level of comprehension. In regard to Gram-positive bacteria with high guanine and cytosine content (GC) like the streptomycetes, although there are some advances in the knowledge of the transport and metabolism of glucose and other carbon sources, there is not an acceptable model to explain the CCR mechanism in this genus. In this review, the main carbon regulatory mechanisms in Gram-positive bacteria with high and low GC content like *S. coelicolor* and *B. subtilis*, respectively, are analyzed.

### INTRODUCCIÓN

Cuando las bacterias son expuestas a diferentes

fuentes de carbono, prefieren aquellos carbohidratos que son más fáciles de degradar y que les proporcionan los mejores rendimientos para su crecimiento y desarrollo. El mecanismo de control global que gobierna y coordina la utilización de fuentes de carbono de manera sistemática y organizada se denomina represión catabólica por carbono (RCC) (Saier & Reizer, 1992).

Se sabe que este mecanismo puede operar a distintos niveles (transcripción, procesamiento de RNA, traducción y modificación de proteínas), generando respuestas que afectan directa o indirectamente la actividad de las enzimas sensibles al fenómeno (exclusión de inductores, represión transcripcional o interrupción de la traducción de proteínas) (Kwakman & Postma, 1994).

Existen diversos sistemas de control que se encuentran relacionados con la regulación por fuente de carbono. Dentro de ellos, uno de los mejor conocidos es el sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS), tanto de *Escherichia coli* como de *Bacillus subtilis*. Por otro lado, en los últimos 25 años se ha venido trabajando arduamente en la comprensión de los fenómenos de RCC en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC como son los *Streptomyces*. En este género se ha visto que la síntesis de pigmentos, antibióticos y demás metabolitos secundarios que producen parecen estar regulada por el mecanismo de RCC.

Todos los genes u operones que participan en el catabolismo de carbohidratos son regulados por proteínas de control específico e inductores requeridos para su expresión. El control directo de la actividad de los reguladores, o de la formación de inductores, es una medida eficiente para silenciar la expresión. Por estos mecanismos las bacterias son capaces de establecer una jerarquía en la utilización de carbohidratos (Bruckner & Titgemeyer, 2002) y las capacita para incrementar su nutrición con miras a optimizar su tasa de crecimiento en ambientes naturales donde existen

mezclas complejas de nutrientes (Stülke & Hillen, 1999).

El complejo regulatorio responsable de la RCC provee a las bacterias de dos facultades importantes: 1) utilizar una fuente de carbono de manera preferencial en una mezcla presente en el medio de cultivo y 2) incorporar el carbohidrato limitante y utilizarlo de acuerdo a sus capacidades metabólicas (Bruckner & Titgemeyer, 2002). En ambos casos, los mismos mecanismos de control son empleados, pero la fuerza de la respuesta regulatoria es diferente (Bruckner & Titgemeyer, 2002). La elección de un carbohidrato determinado es hecha a nivel de inducción azúcar-específico. La represión de los genes empleados en la utilización de carbohidratos alternos asegura que únicamente sea expresada una cantidad mínima de genes, para producir una cierta cantidad de energía y elementos carbonados a partir de una fuente de carbono. Así, la utilización jerárquica de azúcares significa usar carbono y fuentes de energía económicas (Bruckner & Titgemeyer, 2002).

Si sólo una fuente de carbono está disponible, de cualquier forma la RCC está presente, lo cual es una consecuencia del metabolismo del carbohidrato que actúa como un dispositivo de autorregulación interna que limita el consumo del carbohidrato y funciona como sistema economizador de alimento.

Los sistemas en donde el fenómeno de RCC está mejor caracterizado son por un lado, la bacteria Gram-negativa *E. coli* y por otro, las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC en su genoma como *B. subtilis* y *Bacillus megaterium*. Así mismo, existen avances en la comprensión de la RCC en bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC en su genoma como *Streptomyces* y *Mycobacterium* (Stülke & Hillen, 1999).

En esta revisión se analizan los principales mecanismos de regulación por carbono en bacterias Gram-positivas. Se revisarán en especial los avances logrados sobre dicho fenómeno en las bacterias *B. subtilis* y *S. coelicolor*.

**REGULACIÓN POR CARBONO EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS CON BAJO CONTENIDO DE GC: *BACILLUS SUBTILIS***

*Sistema PTS*

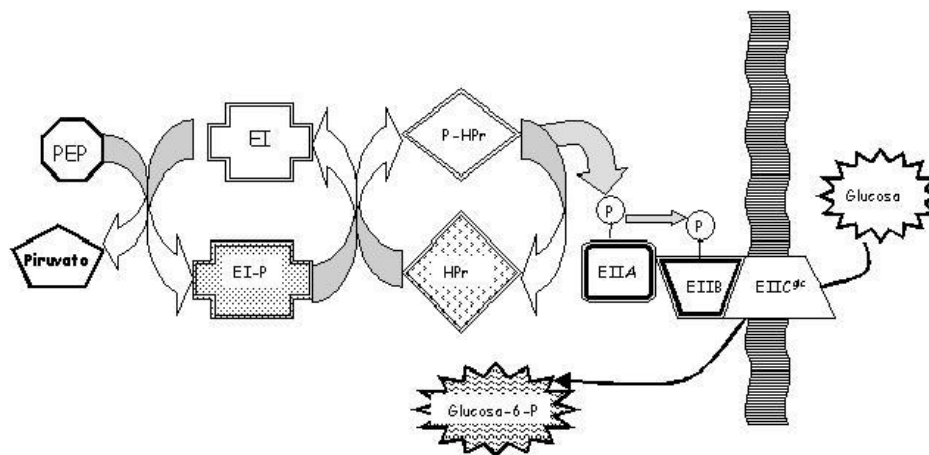
Dentro de los sistemas de transporte y fosforilación de carbohidratos que han sido descritos en numerosos géneros bacterianos, hasta ahora, el mejor estudiado es el sistema de transporte de fosfotransferasa PTS (sugar phosphotransferase system) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). Además del transporte y fosforilación de azúcares, el sistema PTS lleva a cabo varias funciones de regulación metabólica y transcripcional en diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, entre las que destacan la activación de proteínas inductoras de operones catabólicos, el metabolismo del nitrógeno, la quimiotaxis, la respuesta a estrés y patogenicidad (Stülke & Hillen, 1998; Nothaft *et al.*, 2003). Más de 20 carbohidratos diferentes son transportados por este sistema y en dicho proceso se utiliza al PEP como donador del grupo fosfato (Postma *et al.*, 1993).

El sistema PTS consta de dos enzimas generales no específicas que son la enzima EI y la proteína estable al calor HP. Además se incluyen una gran cantidad de permeasas específicas para cada carbohidrato en particular, llamadas EII. Las enzimas EII poseen tres o cuatro dominios, dos de ellos están involucrados en la transferencia de

fosfato (EIIA y EIIB) y el tercero (EIIC) actúa como permeasa de membrana (Stülke & Hillen, 1999). EIIA es citoplásmico y soluble, EIIB es un dominio periférico de membrana que aunque es hidrófilo, se liga al lado citoplásmico de la membrana a través de EIIC. EIIC es una proteína integral de membrana que se une a su azúcar específico para liberarlo en el interior de la célula.

La cascada de fosforilación inicia con la enzima EI (EI), la cual se autofosforila utilizando fosfoenolpiruvato (PEP) y transfiere el grupo fosfato de alta energía (en presencia de  $Mg^{++}$ ) a la proteína HPr (proteína pequeña, termoestable y rica en histidina). Estas dos proteínas tienen localización citoplásmica y su síntesis es constitutiva. La síntesis de las enzimas EIIABC se induce por el sustrato correspondiente.

La HPr fosforilada (HPr-P) transfiere el fosfato a la enzima EIIA. En presencia de  $Mg^{++}$ , la EIIA transfiere rápidamente el fosfato a la enzima específica EIIB, con la que se asocia (p. ej.,  $EIIB^{Glc}$ ), que a su vez fosforila el azúcar (en el caso de la glucosa, ésta se convierte en glucosa-6-P). En este momento la EIIC pierde su afinidad por el azúcar modificado, que de esta forma entra al citoplasma y queda listo para actuar como sustrato de la primera reacción de su catabolismo (ver Fig. 1).



**Fig. 1.** Sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP). Las enzimas EI, HPr, EIIA y EIIB son fosfotransferasas y la EIIC es una permeasa que cataliza la translocación del carbohidrato del periplasma al citosol. La enzima EIIC es específica para cada azúcar (Adaptado de Postma *et al.*, 1993).

En las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G-C en su genoma, el mecanismo de RCC está íntimamente ligado a proteínas del sistema PTS. Específicamente, en *B. subtilis* y *B. megaterium*, la mayoría de las señales de la RCC son dependientes de las enzimas HPr, HPr cinasa/fosfatasa (HPr-K/P) y la enzima de control catabólico (CcpA). Ellas son las encargadas de sensar el estado fisiológico de la célula y regular el consumo de carbono (Stülke & Hillen, 1999). En estos sistemas se ha reportado la presencia de una proteína homóloga a HPr, denominada Crh. Dicha proteína muestra un 45% de homología en su secuencia con HPr y ambas son fosforiladas de manera eficiente por la HPr-K/P. Sin embargo, las contribuciones de Crh a la RCC difiere a la de HPr. Se

creo que Crh puede estar involucrada en la RCC por fuentes de carbono como malato o succinato. La justificación a esta hipótesis será explicada más adelante.

En *B. subtilis*, la glucosa u otra fuente de carbono rápidamente metabolizable genera intermediarios metabólicos, como la fructosa 1,6-bisfosfato (FBF). Este metabolito activa la HPr-K/P que fosforila a HPr en la serina 46. La interacción de HPr-Ser-P con CcpA permite que CcpA se una a regiones del DNA denominadas sitios *cre* (elementos de respuesta de catabolito) (Kim & Chambliss, 1997). De esta manera, el complejo FBF-HPr-Ser-P-CcpA unido a *cre* en las regiones regulatorias de operones sensibles a RCC, inhiben la iniciación de la transcripción (ver Fig. 2).

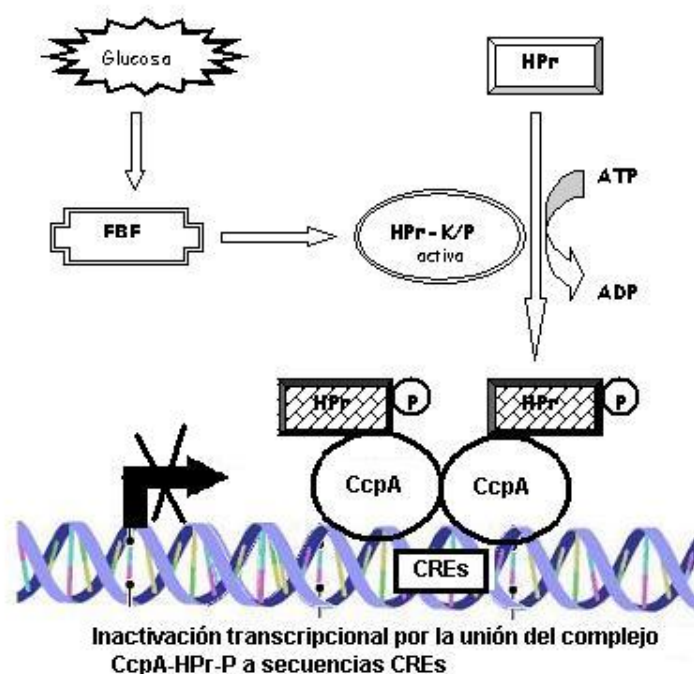


Fig. 2. Mecanismo de RCC en *B. subtilis*.

En *Bacillus* y otras bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC, la proteína HPr-K/P puede actuar como cinasa o como fosfatasa, dependiendo del estado nutricional de la célula (Hanson *et al.*, 2002). La actividad cinasa de HPr-K/P en *B. subtilis*

es dependiente de intermediarios de la glucólisis como la fructosa 1,6-bisfosfato y es inhibida por el fosfato inorgánico. De manera contraria, la actividad fosfatasa es estimulada por fosfato inorgánico.

Existen otras HPr-K/P que son activadas por

altas concentraciones de ATP y son independientes de fructosa 1,6-bisfosfato, como es el caso de las HPr-K/P provenientes de *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus salivarius* (Hanson *et al.*, 2002). La enzima HPr puede ser fosforilada en dos sitios: en la His-15 por la enzima EI del sistema PTS y en la Ser-46 por HPr-K/P dependiente de ATP, la cual es activada por el metabolito fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) (Galinier *et al.*, 1998; Reizer *et al.*, 1998). La fosforilación en la serina 46 tiene exclusivamente propósitos regulatorios.

La RCC en *B. subtilis* se da de dos formas: una es reprimiendo los genes catabólicos y los operones mediante la proteína de control catabólico A, CcpA, la cual previene la transcripción de genes (actuando sobre elementos *cre*) y otra, al no inducir operones catabólicos gracias a la fosforilación de la enzima HPr, que a su vez, puede estimular la actividad de algunas enzimas, inductores, activadores transcripcionales, o antiterminadores (Henkin, 1996).

La fosforilación de HPr en la Serina-46 es importante para la RCC en *B. subtilis*. En 1996, Reizer *et al.*, reportaron que la fosforilación en la histidina-15 también es importante para RCC en *B. subtilis*. Se sabe de la interacción específica entre CcpA y HPr-Ser-P, pero no de CcpA con HPr sin fosforilar (Deutscher *et al.*, 1995). El complejo HPr-Ser-P/CcpA puede actuar como represor o activador de la transcripción (Henkin, 1996). Los datos de Reizer *et al.* (1996), sugieren que la histidina-15 también es requerida para la formación del complejo y por consiguiente, para la RCC. Mutaciones en la histidina-15, pueden generar cambios estructurales que pueden ocasionar una disminución en la afinidad de unión de HPr-Ser-P a CcpA. La sensibilidad de la interacción de HPr-Ser-P con CcpA es dependiente de PEP y la fosforilación de la His-15 catalizada por la enzima EI sugiere una relación entre la RCC y el sistema de transporte PTS (Reizer *et al.*, 1996).

Únicamente la HPr-Ser-P se puede unir a CcpA. Si HPr no está fosforilada, si está fosforilada en His-

15 o si está doblemente fosforilada (en la Ser-46 y en la His-15), entonces no puede interactuar con CcpA. Esto indica que la fosforilación de la His-15 puede ser una señal de regulación en la RCC, ya que HPr-His-P no se puede unir a CcpA y esto ocasiona la activación y represión de genes sujetos de RCC.

La concentración intracelular de HPr-Ser-P es determinada por la actividad de cuatro diferentes enzimas: la fosforilación de HPr por la HPr-K/P dependiente de ATP, la desfosforilación de HPr doblemente fosforilado por una enzima EIIA para formar HPr-Ser-P, la desfosforilación de HPr-Ser-P por la enzima HPr-K/P y la fosforilación de HPr-Ser-P por la enzima EI dependiente de PEP (Reizer *et al.*, 1996). La incorporación de azúcares por el sistema PTS conduce a la desfosforilación de proteínas PTS histidil-fosforiladas y altas concentraciones de intermediarios glucolíticos que activan la HPr-K/P. Bajo estas condiciones, se espera encontrar altas cantidades de HPr-Ser-P en la célula en correlación con una fuerte RCC en *B. subtilis*. Por el contrario, cuando se internalizan azúcares que no son incorporados por la vía PTS, las proteínas PTS se encuentran fosforiladas y se espera que el doble de proteínas HPr-histidil-fosforiladas estén presentes en la célula. Ninguna de las dos formas de HPr interactúa con CcpA *in vitro* (Deutscher *et al.*, 1995).

En el año 2002, Hanson y colaboradores mediante el empleo de mutaciones puntuales en dos regiones altamente conservadas en *B. subtilis* (Hanson *et al.*, 2002), identificaron secuencias de aminoácidos que son determinantes para las actividades de cinasa y fosfatasa de la enzima HPr-K/P de este microorganismo. Una de ellas, ubicada en la posición 153-160, es un motivo de unión a ATP/GTP (llamado caja de Walker A) (Walker *et al.*, 1982). Dicha región se encuentra también presente en proteínas de unión a nucleótidos, transportadores ABC, proteasas, chaperonas así como en algunas cinasas que fosforilan sustratos de bajo peso molecular (Poncet *et al.*, 2004). La

otra región, denominada de "firma", es una secuencia ubicada en la posición 202-211. En este estudio se demostró que mutaciones en una de las regiones funcionales de la HPr-K/P afectan de forma más drástica el crecimiento, que cuando se mutan ambas actividades. Esto demuestra una ventaja fisiológica al tener dos actividades contrarias en un mismo polipéptido, ya que aumenta la posibilidad de interrupción de ambas actividades por mutación, permaneciendo el crecimiento sin ser afectado.

Gorke *et al.*, en el 2004, compararon los niveles de expresión del gen *crh* (que codifica para la proteína homóloga a HPr, Crh) y del gen *ptsH* (que codifica para HPr) y su influencia sobre la RCC en *B. subtilis*. Ellos encontraron que la transcripción de *ptsH* comparada con la de *crh* resultó ser 3 a 9 veces más fuerte cuando es empleado un sustrato incorporado por el sistema PTS y, por consiguiente, bajo fuertes condiciones de RCC. Los genes *ptsH* y *ptsI* son co-transcritos desde un promotor localizado río arriba de *ptsH*. Este promotor está activo constitutivamente y no está sujeto a regulación por fuente de carbono. En presencia de glucosa, el gen *ptsH* es transcrito adicionalmente desde el promotor río arriba del gen *ptsG* (que codifica para la enzima EII específica de glucosa).

De la misma forma, *ptsH* es traducido de 10 a 20 veces más que *crh*, lo que sugiere que HPr es sintetizado en grandes cantidades en la célula. La utilización de sustratos incorporados por el sistema PTS estimula la transcripción de *ptsH*. Combinando la alta tasa de transcripción con la eficiente traducción de *ptsH*, se incrementa el nivel de síntesis de HPr 100 veces por encima de Crh (Gorke *et al.*, 2004). Estas diferencias tan drásticas en el nivel de síntesis de HPr y Crh pueden ser explicadas por el papel menor que juega la proteína Crh en la RCC. La proteína Crh-Ser-P puede ser sustituida de manera parcial por HPr-Ser-P en la RCC, mientras que HPr-Ser-P puede ser totalmente sustituida por Crh-Ser-P en este fenómeno. La observación de que la síntesis de Crh es 10 veces

más alta que la de HPr en bacterias que utilizan citrato o succinato, sugiere que tal vez Crh no este involucrada en la RCC por dichas fuentes de carbono (Gorke *et al.*, 2004).

Un alineamiento de la secuencia de HPr-K/P con proteínas de la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI), revela la existencia de 44 HPr-K/P reportadas, unas de ellas son de gran longitud y varían entre 304 y 342 residuos de aminoácidos, mientras que las de longitud corta corresponden a un fragmento de las mayores. Las de gran longitud constan de tres dominios, un dominio amino terminal de función desconocida, un dominio catalítico de aproximadamente 100 residuos y un dominio carboxilo terminal responsable de la asociación de la proteína en una estructura multimérica. Las de longitud menor sólo contienen el dominio catalítico. El sitio de interacción de estas proteínas con HPr esta altamente conservado, los genes que codifican para proteínas homólogas a HPr-K/P se encuentran agrupados con genes que codifican para proteínas similares a HPr (Warner & Lolkema, 2003).

Así mismo, se han reportado 105 proteínas similares a HPr y éstas se encuentran distribuidas en 87 organismos diferentes, lo que indica que en algunas bacterias es posible que exista más de una molécula HPr. Las secuencias de HPr varían entre 82 y 112 residuos. De estas secuencias, 8 carecen del sitio activo de histidina, mientras que otras tres no contienen el sitio regulador de serina (Warner & Lolkema, 2003).

Existen 17 bacterias del phylum *Firmicutes*, al cual pertenece *B. subtilis*, con su genoma secuenciado. Todos estos genomas contienen secuencias que codifican para la HPr-K/P. Secuencias homólogas para esta proteína fueron encontradas en 11 de estos 17 microorganismos, y es de esperar que en los 6 restantes también posean una secuencia homóloga (Warner & Lolkema, 2003).

En *B. subtilis*, la histidina del sitio activo Crh es reemplazada por una glutamina, mientras que el

resto de aminoácidos permanece similar a secuencias de HPr de organismos semejantes. Un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas similares a HPr, revela los mismos motivos de secuencia en tres proteínas similares a HPr de bacilos que pueden contener Crh y HPr de manera simultánea (Warner & Lolkema, 2003). Esto sugiere que se encuentran bastante conservadas en este género.

Los genes que codifican para la proteína HPr en *Bacillus* están organizados como un operón, junto con el gen que codifica para la enzima EI de PTS y usualmente son transcritos policistricamente. En *B. subtilis*, el par de genes es precedido por el gen que codifica para enzimas del PTS específicas para cada azúcar EIIABC. En cuatro especies de *Bacillus*, el gen que codifica para Crh esta agrupado con tres genes. Estos son: *yvcJ*, *yvcK* y *yvcL*. En *B. subtilis* estos genes codifican para proteínas cuya función se desconoce, además de que este clúster no esta asociado con ninguna proteína del sistema PTS (Warner & Lolkema, 2003).

CcpA, pertenece a la familia de proteínas reguladoras LacI/GalR (Henkin, 1996). Es el principal componente en la RCC en *B. subtilis* y otras bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC (Henkin, 1996; Stülke & Hillen, 1999). Genes *ccpA* han sido clonados de mutantes en *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus*, donde ha sido demostrada su implicación en la RCC, lo que sugiere un mecanismo común en las bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC. Al inactivar el gen *ccpB*, el cual codifica para un ccpA homólogo, se incrementa parcialmente la RCC de los genes *gnt* y *xyl*.

La unión de CcpA a los sitios *cre* es posible por la formación de un complejo entre los cofactores HPr y Crh fosforilados (Repizo *et al.*, 2006). La forma en que se afecta la unión de CcpA a las secuencias *cre*, por efecto de las fuentes de carbono represoras, fue demostrada en *B. subtilis* y

*B. megaterium* al introducirles una mutación en *ptsH1*. Como resultado de ello, se previene la fosforilación de HPr en la Serina 46 y se genera un fenotipo similar al que presentan las mutantes en *ccpA*. Esto indica que la interacción específica entre CcpA y HPr-Ser46-P, resulta en su unión a *cre* (Stülke & Hillen, 1999).

En el caso de algunas enzimas como  $\beta$ -xilosidasa, inositol deshidrogenasa y  $\alpha$ -amilasa, la expresión es reprimida en mutantes *ccpA*, pero no lo es, o sólo parcialmente en mutantes *ptsH1*.  $\beta$ -Xilosidasa e inositol deshidrogenasa son desreprimidas cuando HPr y Crh están ausentes. Crh puede ser fosforilada por la HPr cinasa pero no es fosforilada por la enzima EI. La enzima Crp-Ser46-P puede ser otro corepresor de CcpA (Galinier *et al.*, 1997). Glucosa-6-fosfato y NADP han sido también identificados como correpresores de CcpA (Kim *et al.*, 1998). El NADP tiene poco efecto sobre la unión de CcpA a las secuencias *cre* del gen *amyE*, esto incrementa la habilidad de CcpA para inhibir la transcripción y sugiere que la unión a DNA y la inhibición de la transcripción por CcpA son dos propiedades distintas (Kim *et al.*, 1998). Estudios de estructura han demostrado que CcpA esta compuesta de un dominio de unión a DNA en su extremo amino terminal y un dominio que interactúa con HPr-Ser-P en su extremo carboxilo terminal. El complejo tetramérico consiste en un dímero de CcpA, dos moléculas de HPr-Ser-P y la secuencia *cre* (Jones *et al.*, 1997) (ver Fig. 2). Los residuos del dominio que se encuentra en el extremo carboxilo terminal, expuestos a la superficie de CcpA, se requieren para la interacción con HPr-Ser-P y para la RCC (Kraus *et al.*, 1998).

Los sitios *cre* para los genes *acsA*, *xyl*, *gnt* y *hut*, en *B. subtilis*, están río abajo de la región de inicio de la transcripción, mientras que los sitios *cre* de los genes *lev*, *bgIPH*, *acu*, *amyE* y *mmg*, se encuentran en la región promotora o adyacentes a ella (Zalieckas *et al.*, 1998). Los sitios *cre* se caracterizan por ser secuencias de 14 pb con simetría de diada y la mayoría de ellos están

flanqueados por regiones ricas en secuencias A+T.

En 1999, Rosana-Ani *et al.*, relacionaron la actividad de la glucosa cinasa (Glk, enzima responsable de la fosforilación de la glucosa) de *B. subtilis* con el fenómeno de RCC en dicho microorganismo. En estudios anteriores se había propuesto que el principal papel de la HPr-K/P era el control celular de tasas de metabolismo de carbohidratos y niveles de inducción (Reizer *et al.*, 1984) y que el cambio en la concentración de glucosa-6-fosfato mediada por la Glk podría representar una señal de RCC. Confirmando lo anterior, se observó que la interacción CcpA-*cre* es también estimulada por la glucosa-6-fosfato *in vitro*. La contribución de la Glk en el fenómeno de RCC en *B. subtilis* puede ser indirecta, ya que sustrato y producto, es decir, glucosa y glucosa-6-fosfato, pueden actuar como señales alternativas. Es decir, si la actividad de Glk se elimina, la glucosa no fosforilada se acumula en el citoplasma y se exporta al medio. Esta glucosa vuelve a entrar a la célula por la permeasa de PTS y acciona la RCC por la principal cascada regulatoria, a la cual CcpA, HPr, *cre* y HPr-K/P pertenecen. Por otra parte, la glucosa-6-fosfato refleja en si una señal para la RCC al accionar la interacción HPr-Ser-P/CcpA/*cre*, actuando así como un anti-inductor, en el caso del represor de la xilosa y del represor de trealosa. Por lo anterior, se cree que la Glk esta involucrada en funciones regulatorias de RCC a nivel enzimático, que pueden representar respuestas rápidas a cambios en las fuentes de carbono, obtenidas por regulación a nivel transcripcional. Sin embargo, son necesarios mas estudios a este respecto (Rosana-Ani *et al.*, 1999).

### **REGULACIÓN POR CARBONO EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS CON ALTO CONTENIDO DE GC: LOS ESTREPTOMICETOS**

El género *Streptomyces* sintetiza más del 60% de los antibióticos (Demain, 1989) que son producidos fermentativamente. Su síntesis puede ocurrir a partir de diversas fuentes de carbono (FC)

y puede ser susceptible a RCC. En *Streptomyces coelicolor*, la Glk parece jugar un papel regulatorio a nivel de transcripción y exclusión de inductores (Kwakman y Postma, 1994).

#### *Sistema PTS en Streptomyces*

La presencia del sistema PTS en *S. coelicolor* fue reportada por primera vez en el año 1995 (Titgemeyer, 1995). En 1999 dos grupos reportaron la clonación del gen *ptsH* cuyo producto es la fosfotransferasa HPr (Butler *et al.*, 1999, Parche *et al.*, 1999). En el año 2000, Parche *et al.*, reportaron la existencia de tres genes de *S. coelicolor* que codifican para proteínas homólogas no específicas del PTS y 6 genes que codifican para proteínas homólogas específicas. *S. coelicolor* tiene menos genes *pts* que la gran cantidad que posee *E. coli* y los 27 genes *pts* que contiene *B. subtilis*.

Se conoce la existencia del sistema PTS para internalizar la fructosa en *S. coelicolor* y también los genes que codifican, tanto para las enzimas EI, EIIA<sup>Crr</sup> y HPr, como para dos posibles permeasas de N-acetilglucosamina y una posible permeasa de maltosa (NagE1, NagE2 y MalX1) (Parche *et al.*, 2000). No obstante, no se sabe el papel directo del sistema PTS en el fenómeno de RCC. Así mismo, la actividad cinasa de HPr-K/P parece estar ausente en *S. coelicolor* (Stülke & Hillen, 1999).

En el año 2003, Nothaft *et al.* sugirieron que la fuente de carbono N-acetilglucosamina podía ser el posible sustrato de NagE1 o NagE2 y se comprobó, por caracterización *in vitro*, que la enzima EIIA<sup>Crr</sup> funcionaba como una proteína EIIA específica para N-acetilglucosamina. Por medio de análisis mutacional del gen *ccr-pstI*, se demostró que EI y EIIA<sup>Crr</sup> son parte del sistema PTS para N-acetilglucosamina, y que si falta uno u otro, las células no pueden crecer en presencia de ella, mientras que la utilización de galactosa, glucosamina, glucosa, glutamato, glicerol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, ribosa, sorbitol, sacarosa y xilosa, no parece verse afectada. La expresión de *ccr-pstI* como un operón y *ptsH* juntos, son

inducidos por la presencia de N-acetilglucosamina.

En 2004, Derouaux *et al.*, caracterizaron la proteína receptora de catabolito Crp, la cual esta involucrada en el sistema PTS de *S. coelicolor*. Esta proteína, codificada por el gen *SCO3571* o gen *crp*, es la única proteína de la superfamilia CRP-FNR presente en *S. coelicolor*. La inactivación de dicha proteína genera una deficiencia en la germinación de esporas y un fenotipo similar al de la mutante en el gen que codifica para la adenilato ciclasa (*cya*), que imposibilita la producción de AMP cíclico (AMPC). Esto sugiere que el AMPC puede ser una molécula clave para iniciar los eventos de germinación pues el sistema adenilato ciclasa-AMPC-Crp activa el proceso de desarrollo. En este trabajo se comprobó por tres métodos distintos que la proteína Crp de *S. coelicolor* es capaz de unirse a AMPC: (1) al comparar la secuencia de aminoácidos de Crp con 2 secuencias de la superfamilia CRP-FNR [Crp de *E. coli* y el factor regulador de la virulencia (Vfr) de *Pseudomonas aeruginosa*], que son capaces de unirse a AMPC, se observa que sus dominios de unión al nucleótido se encuentran altamente conservados; (2) al enfrentar *in vitro* a la proteína Crp-His6 purificada, con el AMPC unido a una matriz de agarosa, se observa una alta capacidad de unión de la proteína al nucleótido; (3) al enfrentar *in vivo* extractos celulares totales de *S. coelicolor* con AMPC, se detectó por cromatografía de afinidad una alta eficiencia de unión. No obstante, en este estudio, no pudo establecerse la capacidad de unión de la proteína Crp a secuencias de DNA.

#### *Transporte de carbohidratos*

Uno de los estudios más completos acerca de los sistemas de incorporación de carbohidratos es el reportado por Bertram *et al.*, en el 2004. A raíz de la publicación de la secuencia completa del genoma de *S. coelicolor*, se realizaron tres consideraciones importantes sobre la incorporación de carbohidratos a la célula: (1) 172 genes codifican para proteínas que son excretadas como hidrolasas, quitinasas,

celulasas, lipasas, nucleasas y proteasas (2) alrededor de 81 permeasas del sistema ABC (ATP binding cassette) están presentes en el genoma de *S. coelicolor*, éstas pueden ser utilizadas para incorporar azúcares, oligopéptidos y nucleósidos y (3) se detectaron 45 secuencias que parecen codificar para proteínas de unión a solutos y estas también parecen ser importantes para la incorporación de carbohidratos. La gran cantidad de exoenzimas y sistemas ABC detectado, diez veces mayor que en otras bacterias, nos da una idea de la amplia capacidad metabólica de los estreptomicetos (Bentley *et al.*, 2002).

En el genoma de *S. coelicolor* están presentes 53 sistemas de transporte de carbohidratos. De estos, 22 incluyen 14 permeasas de la familia de transportadores ABC, 4 permeasas específicas del sistema PTS, 2 copias de una proteína de la superfamilia mayor de facilitadores (MSF), una proteína de la familia simporte de soluto de sodio (SSS) y un facilitador de la familia mayor de proteínas intrínsecas (MIP) (ver Fig. 3). En la Tabla 1 se resumen los hallazgos de Bertram *et al.*, 2004, relacionados con los sistemas de incorporación de carbohidratos en *S. coelicolor*.

#### *Estudios sobre los transportadores de glucosa en S. coelicolor*

En el 2005 van Wezel *et al.*, realizaron un análisis bioquímico de la permeasa de glucosa GlcP de *S. coelicolor* y describieron su papel en la regulación transcripcional por medio de mutaciones en *glcP1* y *glcP2*. GlcP es una proteína con dos juegos de seis dominios transmembranales, unidos entre si por un asa citoplásmica. Esto concuerda con la clasificación de ésta como miembro de la superfamilia mayor de facilitadores (MFS), a la cual pertenecen permeasas de azúcares bacterianos y eucarióticos, simportes dependientes de H<sup>+</sup> y las proteínas facilitadoras. La proteína GlcP esta codificada por dos genes en el cromosoma de *S. coelicolor*. Uno de ellos, *glcP1(sco5578)*, esta localizado en la región central del cromosoma y el



**Tabla 1.** Sistemas de incorporación de carbohidratos hallados en el genoma de *S. coelicolor*

Fuente de C	LOCUS INVOLUCRADOS Y POSIBLE FUNCION	POSIBLES PRODUCTOS DE EXPRESION	OBSERVACIONES
Celobiosa y	<i>ceb1</i> y <i>ceb2</i> Son genes que posiblemente codifican para las permeasas de celobiosa y celotriosa.	CebR: es un regulador transcripcional divergente, que pertenece a la familia de Lacl CebE: es una proteína de unión a azúcares CebF y CebG: son proteínas integrales de membrana: la $\beta$ -glucosidasa BglC y una probable azúcar hidrolasa (ShI).	Todos estos genes presentaron porcentajes elevados de identidad con relación al operón <i>ceb</i> de <i>Streptomyces reticuli</i> , el cual ha sido ampliamente caracterizado. En este modelo, los genes <i>cebEFG</i> son inducidos por celobiosa y la permeasa posee una alta afinidad por celobiosa y celotriosa.
$\beta$ -Xilósidos	<i>bxl1</i> y <i>bxl2</i> Son operones que posiblemente contienen los genes para las permeasas de $\beta$ -xilósidos.	BlxEFG: permeasas de $\beta$ -xilósidos de tipo ABC BxlA: enzima metabólica $\beta$ -xilosidasa. BxlR1 y BxlR2: posibles reguladores de la familia Lacl.	Poseen una alta similitud con los genes <i>bxl</i> de <i>S. lividans</i> .
$\alpha$ -Glucósidos	<i>agl1</i> y <i>agl2</i> Podrían estar involucrados en la incorporación de $\alpha$ -glucósidos.	Agl1EFG: permeasa con una amplia especificidad por $\alpha$ -glucosidos, di y tri sacáridos.	El clúster <i>agl2REFGAX</i> , posee una alta identidad con el mismo clúster de <i>S. lividans</i> y se regula de manera muy similar.
Quitobiosa y xilósidos	<i>ngc-xil</i> Posiblemente este involucrado en el transporte de quitobiosa y xilósidos	Dicho locus comprende un clúster <i>ngcEFG</i> , y otro <i>xilEFG</i> , separados por un gen regulador de la familia ROK. Es muy posible que el clúster <i>ngcEFG</i> , codifique para el sistema de transporte de quitobiosa. El clúster <i>xilEFG</i> involucra genes que al parecer codifican para una proteína de unión a un soluto, una ATPasa y una proteína de membrana. Así, el clúster <i>xyIFGH</i> probablemente codifica para una permeasa de xilósidos en <i>S. coelicolor</i> .	Las proteínas del operón <i>ngcEFG</i> poseen entre 31 y 48% de identidad con el operon del mismo nombre en <i>Streptomyces olivaceoviridis</i> . Una probable quitinasa puede ser codificada por un gen en sentido opuesto localizado río arriba del clúster <i>xilEFG</i> .
Lactosa	<i>lac</i> Sistemas de transporte ABC para lactosa	Una probable $\beta$ -galactosidasa que tiene un 43% de identidad con la $\beta$ -galactosidasa BgaB de <i>Bacillus stearothermophilus</i> . Lacl: Un posible regulador de la familia Lacl con un 35% de identidad con el Lacl de <i>E. coli</i> . Lac GEF: posibles componente de un sistema ABC específico para lactosa. Poseen entre un 24 y un 31% de identidad con los productos de los genes <i>LacEFG</i> de <i>Agrobacterium radiobacter</i> .	Entre en gen <i>lacl</i> y el gen <i>lacG</i> se encuentra una secuencia palíndrome de 16 pb espaciada por una secuencia de 29 pb. Se presume que dicha secuencia es un posible elemento regulador en <i>cis</i> .
Alcoholes de	<i>smoREFGD</i> Sistemas de transporte ABC para alcoholes de azúcar (formas reducidas de aldosas y cetosas)	SmoR: probable regulador del operón. SmoE: proteína de unión a soluto. SmoF y SmoG: translocadores de membrana. SmoD: una posible alcohol deshidrogenasa.	Dos secuencias invertidas repetidas de 8 pb y separadas por 54 pb río abajo de <i>smoE</i> pueden servir como elemento regulador en <i>cis</i> .

Ribosa	<i>rbs1</i> <i>rbs2</i> <i>rbs3</i> Sistemas de transporte ABC para ribosa	RbsH: proteína única de fusión compuesta de un fragmento de translocación de membrana y un fragmento de unión a soluto extracelular. RbsA: una ATPasa. RbsK: una ribocinasa . RbsD: una pequeña proteína de 129 aminoácidos similar a las proteínas de transporte de ribosa de alta afinidad de <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i> . RbsR: un posible regulador de la familia de Lacl.	Se encontraron dos clústers más que pueden codificar para permeasas de ribosa: el clúster <i>rbs2EFA</i> codifica para una lipoproteína de unión a sustrato, una proteína integral de membrana y una ATPasa. Así mismo, el clúster <i>rbs3EFGAK</i> codifica para un tercer sistema de permeasa de ribosa.
Galactosa	<i>gal</i>	Galk: cinasa que fosforila la galactosa para incorporarla a la glucólisis. GalE1: proteína que epimeriza. GalT: producto que transfiere un grupo uridilo.	El gen que codifica para el transportador de la galactosa no ha sido bien elucidado aunque se cree que podría ser el gen <i>galP</i> que posee un 28% de similitud con el simportador de galactosa dependiente de sodio presente en <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
Glicerol	<i>gyl</i>	GylR: involucrado en la inducción de sustrato y la represión catabólica del operón de glicerol. GylC: muestra un 49% de identidad con el producto GlpF de <i>B. subtilis</i> . GylA y GylB: tienen un 52 y un 32% de identidad con la glicerol cinasa GlpK y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa GlpD de <i>E. coli</i> . GylX: muestra similitud con otras proteínas de función desconocida en otros actinomicetos.	
Glucosa	<i>glcP1</i> <i>glcP2</i>	Por el barrido del genoma de <i>S. coelicolor</i> en busca de permeasas no-PTS como la GlcP de <i>Synechocystis</i> sp. y la Glf de <i>Zymomonas mobilis</i> se encontró una proteína de 51 y 33% de identidad, respectivamente, la cual fue designada GlcP. El gen que codifica para esta proteína posee dos copias en el genoma de <i>S. coelicolor</i> , con 99% de identidad entre ellas. Los genes adyacentes a éstos no codifican para genes metabólicos o regulatorios cuyas funciones pudieran estar asociadas a <i>glcP1</i> y a <i>glcP2</i> .	La glucosa es la fuente de carbono preferida de <i>S. coelicolor</i> pero el transportador de glucosa no había sido identificado.

Adaptado de Bertram *et al.*, 2004

genes de *glcP1* y *glcP2*, con el fin de determinar los niveles de transcripción de dichos genes. Estos experimentos demostraron que los niveles de transcrito de *glcP1* en la mutante en *glcP2* son bastante reducidos comparados con los de la cepa silvestre. La explicación aparente es la generación de un RNA de interferencia y que la expresión de *glcP1* es fuertemente inducible por glucosa. No se detectó expresión de *glcP2* bajo las condiciones probadas lo que supone que este gen es menos importante que *glcP1*, o juega algún papel en condiciones de cultivo diferentes. La ubicación de *glcP2* en el variable e inestable brazo derecho del cromosoma de *S. coelicolor* hace pensar que es un

posible resultado de la presión evolutiva o un evento reciente de duplicación (van Wezel *et al.*, 2005).

La identificación de GlcP como el principal transportador de glucosa en *S. coelicolor* A3(2) da nuevas luces sobre las etapas tempranas de los procesos mediados por glucosa en este microorganismo (van Wezel *et al.*, 2005).

#### Diferenciación Morfológica y RCC

Otros mecanismos de insensibilidad a RCC están relacionados con la diferenciación celular. Un estudio de la relación entre el desarrollo de hifas aéreas y esporas y la RCC fue realizado por Pope

*et al.*, en 1996. Ellos reportaron que en seis clases diferentes de mutantes *bld* (incapaces de producir hifas aéreas) de *S. coelicolor*, la expresión del gen *galP1* es insensible a represión catabólica. La posterior caracterización de las mutantes *bldA* y *bldB* indicó que en estas cepas la transcripción de *galP1*, gen que se cree está involucrado en la incorporación de galactosa, es independiente de galactosa e insensible a RC. La complementación de dichas mutantes con el *bldA* o *bldB* restaura tanto la sensibilidad a RC como la producción de hifas aéreas (Pope *et al.*, 1996).

Los estudios de regulación de otros genes sujetos a RC indican que en la mutante *bld* la expresión de *dagA* y *gyl* también es insensible a RC y que la complementación de estas mutantes con el gen *bldB* reestablece la sensibilidad a RC. La mutación *bldB* no afecta la expresión de promotores insensibles a RC, lo que sugiere que esta mutación no afecta la transcripción a nivel general sino que afecta específicamente a los genes sujetos a RC (Pope *et al.*, 1996). En *S. lividans* se identificó el gen regulador *reg1* que está involucrado en la represión de la  $\alpha$ -amilasa. Dicho gen codifica para la proteína Reg1 que contiene motivos de unión a DNA en su extremo N-terminal, comparte algunas similitudes con la familia LacI/GalR. Reg1 posee un 95% de identidad con MalR y un 31% de identidad con la proteína CcpA de *B. subtilis* (Naguyen *et al.*, 1997). El represor transcripcional del gen *gyl* (GylR), esta también sujeto a RC. Contiene sitios de unión a DNA y tiene similitud con represores transcripcionales. Se ha visto que mutaciones en los genes *glkA*, *ccrA1* y *bld*, afectan la RC del gen *gyl*. Se cree que la regulación de dicho operón requiere de diversos reguladores tanto específicos como generales (Hindle & Smith, 1994)

En el año 2006, Rigali *et al.*, reportaron que concentraciones extracelulares por encima de 10 mM de N-acetilglucosamina, monómero que la quitina, previenen que *S. coelicolor* progrese más allá del estadio de micelio vegetativo. Así mismo, evidenciaron que la señal es transmitida a través

del regulador DasR (deficient in aerial mycellium and spore formation) perteneciente a la familia GntR que controla el regulón de N-acetilglucosamina y los genes *ptsH*, *ptsI*, y *ccr*, necesarios para la incorporación de N-acetilglucosamina. En un trabajo anterior Rigali *et al.*, predijeron la secuencia de unión del regulador DasR a la secuencia consenso ACTGGTCTAGACCACT, localizada río arriba de los genes *ptsH*, *ptsI*, y *ccr*, que codifican para las fosfotransferasas HPr, la enzima EI y la enzima EIIA<sup>Cr</sup>, respectivamente (Rigali *et al.*, 2004). Así mismo, se examinó un posible sitio de unión de DasR río arriba de muchos de los genes relacionados con el metabolismo de la N-acetilglucosamina.

Al realizar la mutación del gene *dasR* en *S. coelicolor* M145, se observó que la mutante no es capaz de generar micelio aéreo ni esporas. Un paso importante en la formación de hifas aéreas es la producción del antibiótico SapB; una moléculas hidrofóbica derivada del producto codificado por el gen *ramS* que permite que emerjan la hifas aéreas. La producción de SapB esta regulada por los genes *bld*. Se ha visto que la "complementación" entre mutantes que crecen juntas es satisfactoria. Esta relación es unidireccional: una mutante actúa como secretor y la otra es un receptor de las moléculas excretadas restaurando la formación de hifas aéreas. Así, es propuesta una complementación jerárquica de mutantes *bld*: *bldJ*→*bldK*→*bldA/H*→*bldG*→*bldC*→*bldD* en donde las mutantes de la izquierda son donadores y las de la derecha los receptores. Experimentos de complementación demuestran que la esporulación puede ser inducida en la mutante en *dasR* por crecimiento cercano a cepa silvestre M145 y a las mutantes *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldF* y *whiG*, mientras que la proximidad a las mutantes *bldD*, *bldG*, *bldJ* y *bldK* no genera el mismo efecto. Esto demuestra que la mutante en *dasR* no se ajusta a la cascada de complementación anteriormente mencionada y no puede complementar ninguna de las mutantes *bld*.

(Rigali *et al.*, 2006).

La internalización de N-acetilglucosamina mediada por el sistema PTS parece ser constitutiva en mutantes *dasR*, mientras que en la cepa silvestre, la incorporación es inducida por la presencia de N-acetilglucosamina. Los niveles de proteínas HPr y EIIA<sup>Cr</sup> en ausencia o presencia de N-acetilglucosamina son los mismos en la mutante *dasR*, mientras que en la cepa silvestre sólo son detectables en presencia de dicho sustrato. Para establecer la relación entre mutantes *dasR* y mutantes *pts*, fue llevada a cabo una complementación similar a la anteriormente descrita, revelando que las mutantes *dasR* no pueden actuar como secretoras y por consiguiente no pueden complementar mutantes *pts* y que las mutantes *pts* apenas si pueden restaurar el desarrollo en la mutante *dasR*. Una mutante en *nagE2* (en transporte de N-acetilglucosamina), puede restaurar el desarrollo de la mutante *dasR*, pero mutantes *ptsI*, *ptsH* y *crr* no generan el mismo efecto en la mutante *dasR*. Esto indica que el fenotipo de mutantes incapaces de generar micelio aéreo no refleja la imposibilidad de utilizar N-acetilglucosamina.

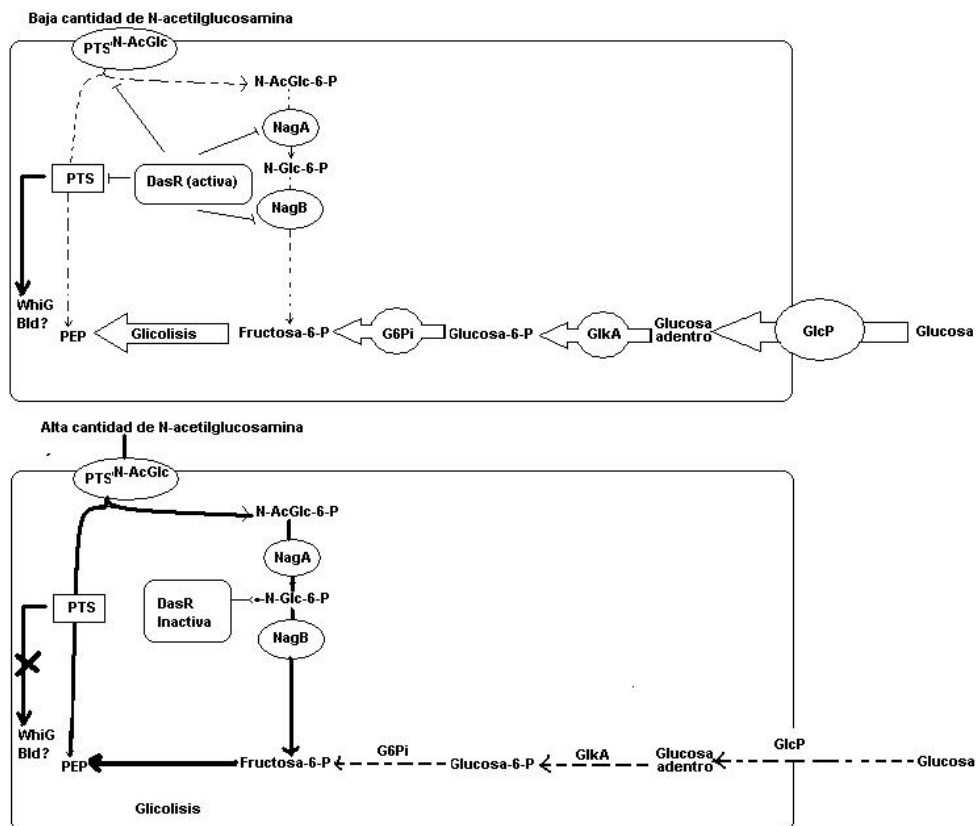
Finalmente Rigali *et al.* (2006), generaron un modelo del posible mecanismo de regulación de DasR en la utilización de N-acetilglucosamina (ver Fig. 4). Cuando hay baja concentración de N-acetilglucosamina y existe glucosa, la glucosa es el sustrato predilecto. Esta es transportada por el simporte GlcP, mientras que el sistema PTS para N-acetilglucosamina es expresado a nivel basal (Nothhaft *et al.*, 2003) y los componentes del PTS transfieren el fosfato a proteínas específicas para el desarrollo. Cuando la concentración extracelular de N-acetilglucosamina es alta, ésta es transportada y metabolizada a glucosamina-6-P, que induce el regulón de N-acetilglucosamina por inhibición de la capacidad de unión a DNA de DasR. En estas condiciones, los componentes del sistema PTS activan la transferencia del grupo fosfato del PEP a la N-acetilglucosamina. Así, la concentración

extracelular de N-acetilglucosamina determina la transferencia del fosfato al azúcar transportado o a proteínas de desarrollo dependientes del PTS (Rigali *et al.*, 2006). DasR es parte de un sistema de detección nutricional, actuando como un regulador pleiotrópico y multifuncional en actinomicetos, y controla el regulón de la N-acetilglucosamina y otras rutas relacionadas, además del transporte de otros azúcares (Rigali *et al.*, 2006).

#### *Avances en la comprensión de la RC por glucosa en Streptomyces*

En 1982, Hodgson reportó el aislamiento de mutantes de *S. coelicolor* resistentes a la inhibición de su crecimiento por un análogo de la glucosa, la 2-desoxiglucosa (Dog). La Dog, al ser fosforilada en el primer paso de la glucólisis, se convierte en Dog-6-P, compuesto es altamente tóxico para la célula que no puede ser metabolizado por los pasos siguientes de la vía glucolítica y cuya acumulación redundaba en la muerte celular.

Las mutantes aisladas fueron denominadas Dog<sup>R</sup>. Éstas presentan un decremento en la sensibilidad a represión por varias fuentes de carbono, apreciable por la síntesis de los pigmentos coloreados actinorrodina y undecilprodigosina, y una reducción en la actividad de Glk, aunque el transporte de glucosa no estaba afectado (Hodgson, 1982). A dichas mutantes Dog<sup>R</sup> de *S. coelicolor*, se les complementó la deficiencia con un fragmento de 2.9 kb que contiene el gen *glkA*, con el cual recuperaron la capacidad para utilizar glucosa, la actividad de GlkA y la sensibilidad a RCC (ausencia de producción de pigmentos) (Ikeda *et al.*, 1984). La expresión del gen de *glkA* en *E. coli* confirmó que su producto es una proteína que cataliza la fosforilación de la glucosa (Angell *et al.*, 1992). Sabiendo que en *B. subtilis*, Glk es importante a nivel de generación del intermediario glucosa-6-P, en *S. coelicolor* se trató de averiguar si el papel de Glk en la RCC era semejante. Para lo anterior, se realizó la complementación de

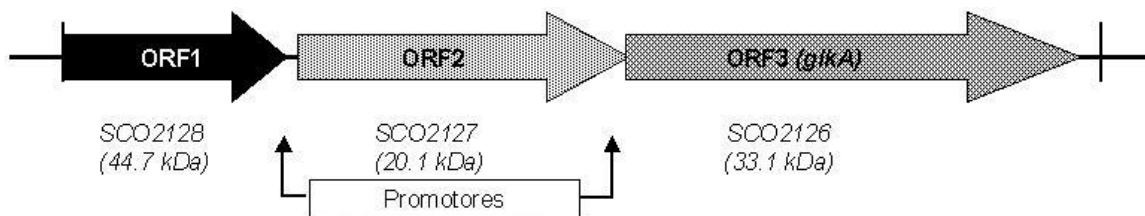


**Fig. 4.** Modelo del efecto de bajas y altas concentraciones de N-acetilglucosamina (N-AcGlc) en el medio. Abreviaturas: **N-AcGlc**: N-acetilglucosamina, **PTS<sup>N-AcGlc</sup>**: sistema PTS para incorporación de N-acetilglucosamina, **PEP**: fosfoenolpiruvato, **N-AcGlc-6-P**: N-acetilglucosamina-6-fosfato, **N-Glc-6-P**: glucosamina-6-fosfato, **NagA**: N-acetilglucosamina-6-fosfato-desacetilasa, **NagB**: glucosamina-6-fosfato-isomerasa, **G6Pi**: glucosa-6-fosfato-isomerasa, **GlkA**: glucosa cinasa (Adaptado de Rigali *et al.*, 2006).

mutantes en *glkA* de *S. coelicolor* con un gen análogo de la glucosa cinasa de *Zymomonas mobilis*. Este gen reestablece la capacidad de utilización de la glucosa y la actividad de Glk, pero no la sensibilidad a RCC (Angell *et al.*, 1992). Esto sugiere que la Glk tiene una actividad regulatoria diferente a la catalítica y juega un papel importante en la regulación del metabolismo del carbono.

En estudios ulteriores por mapeo con la nucleasa S1, se caracterizó cada ORF del fragmento de 2.9 kb: el ORF1 (*SCO2128*) es un marco de lectura incompleto que hipotéticamente codifica para una proteína de 44.7 kDa, el ORF2 (*SCO2127*) es un marco de lectura completo que hipotéticamente codifica para una proteína de 20.1

kDa, y finalmente el ORF3 (*SCO2126*) es el gen *glkA* que codifica para la glucosa cinasa dependiente de ATP, una proteína de 33.1 kDa encargada de la fosforilación de la glucosa (ver Fig. 5). Estudios de complementación demostraron que con *glkA* se reestablece la capacidad de utilizar glucosa, la actividad de GlkA y sólo parcialmente la sensibilidad a RCC, pero para alcanzar los niveles de actividad de Glk encontrados en la cepa silvestre es necesaria la transcripción a partir de ambos promotores. Al transformar con *glkA* y *SCO2127* simultáneamente, además del fenotipo anterior, se reestablece completamente la sensibilidad a RCC a niveles similares a los de la cepa silvestre (Angell *et al.*, 1992). La función del gen *SCO2127* aún se



**Fig. 5.** Fragmento de 2.9 kb con el cual se complementaron las mutantes Dog<sup>r</sup> de *S. coelicolor* (Ikeda *et al.*, 1984).

desconoce, aunque su cotranscripción con *glkA* sugiere que existe una conexión funcional entre los dos productos

Resultados similares se obtuvieron con las mutantes Dog<sup>R</sup> de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Segura *et al.*, 1996). Estas mutantes también se caracterizan por ser insensibles a RCC y la actividad de Glk se encuentra disminuida entre el 10 y 30% de la cepa original. A diferencia de las

mutantes de *S. coelicolor*, las de *S. peucetius* var. *caesius* pueden crecer en glucosa como única fuente de carbono y tienen afectado parcialmente el transporte de glucosa (Escalante *et al.*, 1999).

A partir de una cepa Dog<sup>R</sup> de *S. peucetius* var. *caesius* se aislaron una nueva serie de mutantes por su sensibilidad a Dog, en la Tabla 2 se muestran algunas de las características de las mutantes Dog<sup>S</sup> obtenidas (Ramos *et al.*, 2004).

**Tabla 2.** Características de las mutantes Dog de *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Sensibilidad a Dog <sup>a</sup>	Transporte de glucosa % <sup>b</sup>	Actividad de Glk % <sup>c</sup>	Sensibilidad a RCC <sup>d</sup>
Original	S	100	100	S
Dog <sup>R</sup>	R	51	15	R
Dog <sup>S</sup> -2	S	18	37	R
Dog <sup>S</sup> -11	S	71	84	R

<sup>a</sup> Las cepas sensibles (S) no crecen en presencia de 2-desoxiglucosa mas lactosa 55 mM y las resistentes (R) si crecen.

<sup>b</sup> Incorporación de glucosa 100% (2.21 mmol/mg de peso seco de micelio).

<sup>c</sup> Glk: 100% (170 U/mg proteína).

<sup>d</sup> La sensibilidad a RCC se determino por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) producido en presencia de glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) sí (Adaptado de Ramos *et al.*, 2004).

Estas cepas, al igual que la cepa parental, mostraron resistencia a la RCC por glucosa, con deficiencias en la incorporación de glucosa y en la actividad de Glk, esto refleja que no hay correlación directa entre la actividad de Glk, la sensibilidad a Dog y la RCC como si se observa en mutantes de *S. coelicolor* (Hodgson, 1982).

Revisando el efecto del gen *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor*, sobre la actividad de Glk, el transporte de glucosa y la sensibilidad a RCC de mutantes Dog<sup>R</sup> de *S. peucetius* var. *caesius*, Guzmán *et al.*, en el 2005, evidenciaron el papel estimulador de *SCO2127* sobre estos parámetros y como consecuencia sobre el catabolismo de la glucosa.

En *S. peucetius* var. *caesius* se detectó por Southern blot la presencia de genes homólogos a *glkA* y *SCO2127* de *S. coelicolor* que se cree están adyacentes en el genoma. Se sabe que existen genes homólogos a *glkA* y *SCO2127* en *Streptomyces avermitilis* con identidad de 86 y 95% respectivamente con los de *S. coelicolor*, lo que sugiere que están altamente conservados (Guzmán *et al.*, 2005).

Los estudios de complementación con el gen de *glkA* en mutantes *Dog<sup>R</sup>* de *S. peucetius* var. *caesius*

permitieron la recuperación de actividad de Glk, pero no el transporte de glucosa, mientras que la complementación de las mutantes *Dog<sup>R</sup>* de *S. peucetius* var. *caesius* con el gen *SCO2127* aumentó la actividad de Glk, el transporte de glucosa y la sensibilidad a la RCC, lo que se vio reflejado en la imposibilidad de sintetizar  $\beta$ -galactosidasa (enzima requerida para utilización de lactosa) y antraciclinas (metabolitos secundarios) en presencia de glucosa (Tabla 3) (Guzmán *et al.*, 2005).

**Tabla 3.** Efecto de la complementación de los genes *SCO2127* y *glkA* sobre transporte, actividad de Glk y sensibilidad a RCC en *S. peucetius* var. *caesius*

Cepa	Inserto	Transporte de glucosa % <sup>a</sup>	Actividad de Glk % <sup>b</sup>	Sensibilidad a RCC <sup>c</sup>
Original	-----	100	100	S
<i>Dog<sup>R</sup></i>	-----	51	15	R
SDR-1	<i>glkA</i>	49	95	S
SDR-2	<i>SCO2127</i>	108	115	S
SDR-3	<i>SCO2127+glkA</i>	113	331	S

<sup>a</sup> Incorporación de glucosa: 100% (2.21  $\mu$ mol/mg de micelio seco).

<sup>b</sup> Glk: 100% (170 U/mg de proteína).

<sup>c</sup> La sensibilidad a RCC se determinó por la formación de pigmento rojo (antraciclinas) en presencia de glucosa 500 mM. Las cepas resistentes (R) no producen pigmento y las sensibles (S) sí

Modificado de Guzmán *et al.*, 2005

#### La Glk: una enzima misteriosa

En el año 2000, Mahr *et al.*, realizaron un estudio con miras a la purificación y caracterización bioquímica de la Glk de *S. coelicolor* y demostraron que la cantidad presente en la célula es similar en condiciones de represión y no represión, es decir, su expresión es constitutiva independientemente de la fuente de carbono empleada en el medio. La Glk es una enzima perteneciente a la familia ROK (represor, orf, kinase) que comprende cinasas bacterianas y reguladores como NagC de *E. coli* y XylR de *B. subtilis* (Titgemeyer *et al.*, 1994). La técnica de difracción circular y la predicción de la estructura secundaria *in silico* permitió saber, que la proteína tiene alrededor de 32% de  $\alpha$ -hélices, 26% de hojas  $\beta$  extendidas, 13% hojas  $\beta$  plegadas y 29% de distribución al azar. La secuencia de

aminoácidos de la glucosa cinasa de *S. lividans* y *S. coelicolor* resultó ser idéntica y por consiguiente se cree que tienen el mismo papel en ambos organismos (Mahr *et al.*, 2000).

La Glk, aparentemente no contiene los dominios de unión a DNA en el extremo N-terminal que se encuentran en proteínas represoras de la familia ROK, y por ello no puede regular directamente la transcripción, por ello se ha propuesto que podría interactuar con factores de transcripción y desencadenar una cascada de señalización para la RCC (Angell *et al.*, 1992).

Algunas de las proteínas con las que podría interactuar Glk son los productos codificados por los genes *malR* y *gylR* (MalR y GylR), represores de los operones de maltosa y glicerol respectivamente. El gen *malR* de *S. coelicolor* A3(2), codifica para una proteína represora homóloga a la familia de proteínas represoras

Lacl/GalR. La interrupción o delección de dicho gen ocasiona la expresión constitutiva del gen *malE*, requerido para la utilización de maltosa y cuya expresión es inducida por la presencia de dicho sustrato y reprimida por glucosa (van Wezel *et al.*, 1997). Se cree que la proteína MalR es un regulador de la inducción por sustrato y la represión por glucosa en el metabolismo de la maltosa (van Wezel *et al.*, 1997).

En otros organismos como *B. subtilis*, *B. megatherium* y *E. coli*, la actividad de Glk ha sido estudiada y se ha visto que ésta es independiente de la fuente de carbono en los dos primeros, mientras que en *E. coli* ocurre algo similar, solo que la actividad se reduce a la mitad cuando las células se crecen en presencia de glucosa, debido a que ésta se fosforila primordialmente por el sistema PTS (Mahr *et al.*, 2000).

La Glk de *S. coelicolor* y *S. peucetius* var. *caesius* fueron caracterizadas bioquímicamente por Imriskova *et al.*, en el 2005. Ambas son enzimas citosólicas, homotetraméricas, con un peso molecular aproximado de cada monómero de 32 y 31 kDa, respectivamente. La Glk de *S. coelicolor* parece ser más estable que la Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, ya que después de algunas horas de almacenamiento a 4°C ésta última se disocia en un 85% a su forma dimérica. Sin embargo, la presencia de 100 mM de glucosa evita su disociación. Este comportamiento no se observa en la Glk de *S. coelicolor* (Imriskova *et al.*, 2005). Recientemente reportamos la secuencia del gen que codifica para Glk en *S. peucetius* var. *caesius* (gi:50263005 de Gene bank). Dicha secuencia posee un 98% de identidad con la de *S. avermitilis* y un 87% con la de *S. lividans* y *S. coelicolor* (Langley *et al.*, 2004).

En el 2007, van Wezel *et al.*, propusieron que la cantidad de proteína Glk es más o menos independiente de la fase de crecimiento pero su actividad catalítica depende de la presencia de glucosa en el medio (van Wezel *et al.*, 2007). Así mismo, reportan que el transporte de glucosa y la

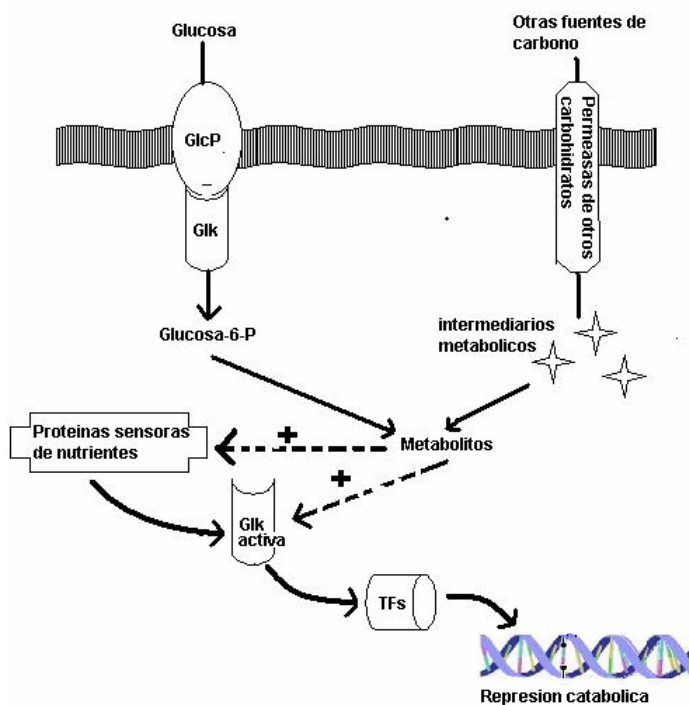
actividad de Glk presentan perfiles similares, lo que indica una posible relación funcional entre ellos. Prueba de ello es que la incorporación de glucosa en una cepa mutada en Glk decae drásticamente (van Wezel *et al.*, 2007). Análisis de RT-PCR muestran que tanto el nivel de expresión basal como el nivel de expresión inducida por glucosa del gen *glcP1*, son similares en la cepa mutante en *glk* y en la cepa silvestre, lo que demuestra que la expresión de *glcP1* no depende de la presencia de *glk*. Es decir, la diferencia en las actividades de transporte entre la cepa silvestre y la mutante en *glk* no generan diferencias en la expresión de *glcP1*. Una probable explicación es que la incorporación de la glucosa en la mutante es inhibida por la acumulación de glucosa intracelular. Una reducción en la incorporación de glucosa fue observada en una mutante en *glk* de *S. peucetius* (Ramos *et al.*, 2004). Estos datos hicieron pensar que *glk* y *glcP* operan en conjunto y quizás interactúan entre sí (van Wezel *et al.*, 2007).

Para examinar si *glk* se une a *glcP*, se realizaron pruebas de Western blot con anticuerpos anti-Glk, mostrando que cuando las células son crecidas en glicerol como única fuente de carbono, la Glk es encontrada únicamente en la fracción citoplásmica, pero cuando las células se crecen en glucosa, una cantidad significativa de *glk* es encontrada en la fracción membranal. Esta observación ha generado un modelo en el que se propone que el tetrámero de la Glk forma un complejo con la proteína de transporte de glucosa *glcP* en la membrana celular, mientras que la forma citoplásmica de la Glk actúa en respuesta a la presencia de glucosa, ATP u otros metabolitos aún desconocidos (van Wezel *et al.*, 2007).

Sus datos sugieren, que la actividad de Glk es modulada a través de la activación o modificación post-traduccionales dependiente de intermediarios metabólicos, lo que ocurre en bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC donde la HPr-K/P, activada por un metabolito, activa el complejo represor global CcpA/HPr-Ser-P a través de la

fosforilación de la serina. Las modificaciones que sufre la Glk para pasar de inactiva a activa son desconocidas. Glk pertenece a una familia de cinasas cuyas cisteínas son vitales para su

actividad y es posible que jueguen un papel clave en el control de su función (van Wezel *et al.*, 2007) (ver Fig. 6).



**Fig. 6.** Modelo del posible papel regulatorio de la glucosa cinasa en *Streptomyces coelicolor* (Adaptado de van Wessel *et al.*, 2007).

#### Genes no reprimidos por Glk

Uno de los genes regulados por represión catabólica en *S. coelicolor*, es el gen que codifica para la glicerol cinasa (Seno & Chater, 1983). En 1994, Kwakman y Postma observaron que la glicerol cinasa es reprimida de dos a diez veces por 5 fuentes de carbono diferentes, entre las que se encontraban glucosa, arabinosa, galactosa, citrato y glutamato. En el mismo estudio, se vio la represión de la actividad agarasa por varias fuentes de carbono. La agarasa es una enzima extracelular que rompe la red de agar generando disacáridos, cuando esto sucede se puede ver claramente un halo alrededor de la colonia. Muchos carbohidratos causan la represión de la actividad agarasa como glucosa, galactosa, manitol, arabinosa y algunos

intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos como malato, citrato y succinato. Los resultados de este estudio y otros experimentos, demostraron que en *S. coelicolor* las actividades de glicerol cinasa y agarasa son reprimidas por una amplia variedad de fuentes de carbono.

También se vio que las actividades de glicerol cinasa y agarasa podían ser inducidas totalmente en mutantes *glkA* en presencia de las fuentes de carbono que generan represión en la cepa silvestre. Esto demostró que no solamente hay liberación de la represión por glucosa, sino también de otras fuentes que no son metabolizadas vía glucosa cinasa. La sobreexpresión de la glucosa cinasa por medio de un plásmido multicopia introducido en la célula de *S. coelicolor*, que contiene el gen de *glkA*, mostró una inducción normal de la actividad de

agarasa en presencia de los carbohidratos probados, un fenotipo muy similar al de la mutante en *glkA*. Únicamente en los carbohidratos derivados del ciclo de Krebs se nota un ligero aumento de represión. Esta observación aumenta la posibilidad de que la Glk en la mutante *glkA*<sup>-</sup> puede estar catalíticamente inactiva, pero aún poseer su función regulatoria. Los resultados de este estudio fueron concluyentes para suponer que la Glk juega un papel realmente importante en el fenómeno de RCC ejercida por glucosa, pero también por otros carbohidratos que no requieren de la forma catalíticamente activa de la Glk para su metabolismo (Kwakman & Postma., 1994).

Es de notarse que, cuando el gen de la quitinasa *chi63* de *Streptomyces plicatus* fué introducido en *S. coelicolor* A3(2), se observó que su expresión es inducida por quitina y reprimida por glucosa, de manera independiente del gen *glkA* (Ingram & Westpheling, 1995; Hodgson, 2000), mientras que la represión por glucosa de este mismo gen en *S. lividans* es dependiente de gen de *glkA* (Saito, 1998). Otros casos de represión por glucosa independiente de GlkA fueron reportados para la  $\alpha$ -amilasa de *Streptomyces reticuli* (Hodgson, 2000) y para la  $\alpha$ -amilasa de *Streptomyces kanamyceticus* (Flores *et al.*, 1993). También se observó que el gen de la  $\alpha$ -amilasa de *Streptomyces limosus*, que se encuentra bajo RC por manitol, cuando se transfiere a *S. coelicolor* A3(2), está sujeto a RC por glucosa dependiente de *glkA* (Hodgson, 2000).

Un trabajo encaminado a la construcción de cepas de *Streptomyces* productoras de  $\alpha$ -amilasa no sujetas a RCC fue desarrollado por Mellouli *et al.* en el 2002. Como se comentó anteriormente, muchos estreptomicetos secretan diferentes tipos de hidrolasas que degradan diversos tipos de polisacáridos. Ejemplo de esto son las  $\alpha$ -amilasas, que son las responsables de la ruptura de almidón por cortes en los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos. En la industria del almidón, son necesarias altas temperaturas de hidrólisis y los gránulos de almidón no pueden ser atacados por la  $\alpha$ -amilasa a menos

que se rompan por la misma temperatura (Mellouli *et al.*, 2002).

Las amilasas de *Streptomyces* reportadas, no son estables por encima de los 50-60°C de temperatura, excepto la  $\alpha$ -amilasa de *Streptomyces* sp. TO1 que trabaja a una temperatura óptima de 70°C, por lo que ésta podría ser de gran atractivo a nivel industrial. Se cree que en presencia de glucosa en el medio, la síntesis de reguladores transcripcionales negativos (NTR) y su unión a secuencias específicas, como el elemento simétrico DSE en el promotor del gen de  $\alpha$ -amilasa de *Streptomyces* sp. TO1, pueden reprimir dicho gen.

En este estudio, Mellouli *et al.* (2002) observaron la expresión de la  $\alpha$ -amilasa de *Streptomyces* sp. TO1 (su hospedero original), en *S. lividans* TK24 y en una mutante de *S. lividans* interrumpida en el gen *reg1*, el regulador pleiotrópico de los genes que codifican para  $\alpha$ -amilasa y quitinasa. Para ello, se utilizaron los plásmidos pLM2 (un plásmido de alto número de copias en el cual está clonado el gen de la  $\alpha$ -amilasa TO1), pIJ702 (plásmido replicativo en *Streptomyces*, de alto número de copias), pLM10 (plásmido que contiene una secuencia reguladora presente en el promotor del gen *amyTO1* denominada DSE) y pLM11 (plásmido que contiene clonado el gen de la  $\alpha$ -amilasa TO1 con la secuencia reguladora DSE, mutada en 3 pb).

En medio sólido, en las cepas de *S. lividans* TK24/pLM2 y TO1/pIJ702, la actividad de  $\alpha$ -amilasa fue detectada únicamente en presencia de almidón en el medio de cultivo. En la cepa TO1/pLM10 y en la de *S. lividans* TK24/pLM11, la expresión de la  $\alpha$ -amilasa TO1 es reprimida por la presencia de glucosa y glicerol en el medio (Mellouli *et al.*, 2002). Cuando se crecieron las cepas en medio mínimo líquido con 1% de almidón, las cepas TO1/pIJ702 y TO1/pLM10 presentaron una actividad de  $\alpha$ -amilasa TO1 muy baja, comparada con la de las cepas de *S. lividans* TK24/pLM2 y *S. lividans* TK24/pLM11. Cuando se crecieron las cepas en medio mínimo líquido con 1% de almidón

más 1% de glucosa o 1% de glicerol, no se detectó actividad en las cepas TO1/pIJ702 y TK24/pLM2. En las cepas TO1/pLM10 y TK24/pLM11, se detectó actividad en presencia de glucosa y glicerol, similar a la detectada en presencia de almidón, es decir, no se observa efecto negativo de la glucosa o el glicerol en la expresión de la  $\alpha$ -amilasa TO1. La resistencia a la represión catabólica en la cepa de *S. lividans* TK24/pLM11 puede ser explicada por el hecho de que el NTR reconoce el elemento DSE presente en el promotor de la  $\alpha$ -amilasa TO1, y cuando la simetría de esta secuencia es alterada, la afinidad de NTR por ésta disminuye y en un plásmido de alto número de copias el efecto de NTR puede ser eliminado por completo. De la misma forma se cree que el efecto del factor NTR presente en *Streptomyces* sp. TO1 es superado por las múltiples copias de la secuencia DSE lo que libera a la cepa de la represión.

### CONCLUSIONES

Los mecanismos de RCC difieren substancialmente entre bacterias (Stülke & Hillen, 1999). La preferencia de una fuente de carbono sobre otra en un microorganismo particular, genera la activación de señales en su interior. Estos mecanismos no podrán ser comprendidos bajo un esquema lineal sino interrelacionado, como si fuera una red. Una red en la cual se pueden entrelazar millones de señales remotas que redundan en efectos aparentemente alejados o no relacionados entre sí.

Es mucho lo que se ha podido elucidar acerca del mecanismo de RCC en bacterias Gram-positivas, pero así mismo, es mucho lo que queda por saber. Son muchos los elementos que aún desconocemos de este rompecabezas de regulación por fuentes de carbono y tal vez en ellos estén la respuestas a muchas de nuestras preguntas.

Los avances en las técnicas de biología molecular, herramientas bioquímicas e informáticas, aunado a la secuenciación de genomas de

microorganismos de este grupo, entre muchas otras estrategias, brindaran a los futuros investigadores mayores herramientas para la búsqueda de estos elementos y para la comprensión de muchos de los fenómenos regulatorios ejercidos por fuentes de carbono preferenciales.

Lo único que es claro hasta ahora, es que los microorganismos poseen estrategias más inteligentes que los seres humanos a la hora de regular su alimentación. Sin necesidad de acudir a nutriólogos o dietistas, ellos saben qué comer y cuales son los beneficios de comerlo. Esto les ayuda a tener mejores condiciones de vida y a garantizar, a sus futuras generaciones, salud y bienestar.

### REFERENCIAS

- Angell S, Schwartz E & Bibb JM (1992) The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6: 2833–2844.
- Barrière C, Veiga-da-Cunha M, Pons N, Guédon E, van Hijum S, Kok J, Kuipers O, Ehrlich D & Renault JP (2005) Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low GC Gram-positive bacteria: its regulator, signal, and DNA-binding site. *J. Bacteriol.* 187: 3752-3761.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J & Hopwood DA (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147.
- Bertram R, Schlicht M, Mahr K, Nothhaft H, Saier M

- & Titgemeyer F (2004) *In silico* and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 186: 1362-1373.
- Brückner R & Titgemeyer F (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 141-148.
- Butler MJ, Deutscher J, Postma PW, Wilson TJ, Galinier A & Bibb MJ (1999) Analysis of a *ptsH* homologue from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 279-288.
- Darbon E, Servant P, Poncet S & Deutscher J (2002) Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P~GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression. *Molec. Microbiol.* 43: 1039-1052.
- Deutscher J, Küster E, Bergstedt U, Charrier V & Hillen W (1995) Protein kinase-dependent HPr-CcpA interaction links glycolytic activity to catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 15: 1049-1053.
- Demain AL (1989) Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. *In: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*, Shapiro S (ed). CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 127-131.
- Derouaux A, Dehareng D, Lecocq E, Halici S, Nothaft H, Giannotta F, Moutzourelis G, Dusart J, Devreese B, Titgemeyer F, Beeumen JV & Rigali S (2004) Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind AMPc. *Bioch. and Bioph. Res. Commun.* 325: 983-990.
- Escalante L, Ramos I, Imriskova I, Langley E & Sanchez S (1999) Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 572-578.
- Flores ME, Ponce E, Rubio M & Huitron C (1993) Glucose and glycerol repression de  $\alpha$ -amilase in *Streptomyces kanamyceticus* and isolation of deregulated mutants. *Biotechnol. Lett.* 15: 595-600.
- Galinier A, Haiech J, Kilhoffer M, Jaquinod M, Stülke J, Deutscher J & Martin-Verstraete I (1997) The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8439-8444.
- Galinier A, Kravanja M, Engelmann R, Hengstenberg W, Kilhoffer MC, Deutscher J & Haiech J (1998) New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1823-1828.
- Görke B, Fraysse L & Galinier A (2004) Drastic differences in Crh y HPr syntesis levels reflect their different impacts on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 186:2992-2995.
- Guzmán S, Carmona A, Escalante L, Imriskova I, López R, Rodríguez-Sanoja R, Ruiz B, Servín-González L, Sánchez S & Langley E (2005) Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Microbiology*, 151: 1717-1723.
- Hanson KG, Steinhauer K, Reizer J, Hillen W, Stülke J (2002) HPr kinase/phosphatase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene and effects of mutations on enzyme activity, growth and carbon catabolite repression. *Microbiology*, 148: 1805-1811.
- Henkin TM (1996) The role of the CcpA transcripcional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 9-15.
- Hindle Z & Smith P (1994) Subtrate induction and catabolite repression on the *Streptomyces coelicolor* glycerol operón are mediated through the GylR protein. *Mol. Microbiol.* 12:737-745.
- Hodgson DA (1982). Glucose repression of carbon uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. *J. Gen Microbiol* 128:

- 2417-2430.
- Hodgson DA (2000) Primary Metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42: 47-238
- Ikeda H, Seno ET, Bruton CJ & Chater KF (1984) Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* 196: 501-507.
- Imriskova I, Arreguín-Espinosa R, Guzmán S, Rodríguez-Sanoja R, Langley E & Sanchez S (2005) Biochemical characterization of the glucose kinase from *Streptomyces coelicolor* compared to *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Res. Microbiol.* 156: 361-366.
- Inácio JM, Costa C & Sá Nogueira I (2003) Distinct molecular mechanisms involved in carbon catabolite repression of the arabinose regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 149: 2345-2355.
- Inaoka T, Ochi K (2007) Glucose uptake pathway-specific regulation of syntesis of neotrehalosadiamine, a novel autoinducer produced in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 189: 65-75.
- Ingram C, Delic I & Westpheling J (1995) *ccrA1*: mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *J. Bacteriol.* 177: 3579-3586.
- Jones BE, Dossonnet V, Küster E, Hillen W, Deutscher J & Klevit RE (1997) Binding of the catabolite repressor protein CcpA to its DNA target is regulated by phosphorylation of its corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* 272: 26530-26535.
- Kim JH & Chamblis GH (1997) Contacts between *Bacillus subtilis* catabolite regulatory protein CcpA and *amyO* target site. *Nucleic. Acid. Res.* 25: 3490-3496.
- Kim JH, Voskuil MI, Chambliss GH (1998) NADP, corepressor for the *Bacillus subtilis* catabolite control protein CcpA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9590-9595.
- Kwakman JH & Postma PW (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176: 2694-2698.
- Kraus A, Küster E, Wagner A, Hoffmann K & Hillen W (1998) Identification of a co-repressor binding site in a catabolite control protein CcpA. *Mol. Microbiol.* 30: 955-963.
- Langley E, Mascareñas N, Ruíz B & Sánchez S (2004) *Streptomyces peucetius* var. *caesius* glucose kinase. NCBI Gen bank nucleotide. gi: 50263005.
- Mahr K, Wezel G, Svensson C, Kregel U, Bibb M & Titgemeyer F (2000) Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large purification and biochemical analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 253-261.
- Mellouli L, Karray-Rebai I & Bejar S (2002) Construction of  $\alpha$ -amylase-producing strains not subject to carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett* 206: 157-162.
- Naguyen J, Francois F, Virolle M & Guérineau M (1997) Amylase and chitinase genes in *Streptomyces lividans* are regulated by *reg1*, a pleiotropic regulatory gene. *J. Bacteriol.* 179: 6383-6390.
- Nothaft H, Dresel D, Willimek A, Mahr K, Niederweis M & Titgemeyer F (2003) The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is biased for N-acetylglucosamine metabolism. *J. Bacteriol.* 185: 7019-7023.
- O'Loughlin S, Graham R, McMullan G & Ternan N (2006) A role for carbon catabolite repression in the metabolism of phosphonoacetate by *Agromyces fucosus* Vs2. *FEMS Microbiol Lett* 261: 133-140.
- Parche S, Schmid R & Titgemeyer F (1999) The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor*: identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur J. Biochem* 265: 308-317.
- Parche S, Nothaft H, Kamionka A & Titgemeyer F (2000) Sugar uptake and utilisation in

- Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 243-251.
- Poncet S, Mijakovic I, Nessler S, Gueguen-Chaignon V, Chaptal V, Galinier A, Boël G, Alain M & Deutscher J (2004) HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1697: 123-135.
- Pope M, Green B & Westpheling J (1996) The *blc* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signaling. *Mol. Microb.* 19: 747-756.
- Postma W, Lengeler JW & Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.
- Ramos I, Guzmán S, Escalante L, Imiriskova I, Rodríguez Sanoja R, Sánchez S & Langley E (2004) Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var *caesius*. *Res. Microbiol.* 155: 267-274.
- Reizer J, Bergstedt U, Galinier A, Küster E, Saier M, Hillen W, Steinmetz M, Deutscher J (1996) Catabolite repression resistance of *gnt* operon expression in *Bacillus subtilis* conferred by mutation of His-15, the site of phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of the phosphocarrier protein HPr. *J. Bacteriol.* 178: 5480-5486.
- Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stülke J, Karamata D, Saier M & Hillen W (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molec. Microbiol.* 27: 1157-1169.
- Reizer J, Novotny J, Hengstenberg W & Saier MH (1984) Properties of ATP-dependent protein kinase from *Streptococcus pyogenes* that phosphorylates a serine residue in HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 160: 333-340.
- Repizo G, Blancato V, Sender P, Lolkema J & Magni C (2006) Catabolite repression of the cisST two-component system in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 224-231.
- Rigali S, Nothaft H, Noens E, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten H, Hopwood D, Titgemeyer F & van Wezel G (2006) The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molec. Microb.* 61: 1237-1251.
- Romano AH & Saier MH (1992) Evolution of the bacterial phosphoenolpyruvate system. Section I. Physiological and organism considerations. *In: Evolution of metabolic function*. Mortlock RP (ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., pp. 143-170.
- Rosana-Ani L, Skarlatos P & Dahlmann (1999) Putative contribution of glucose kinase from *Bacillus subtilis* to carbon catabolite repression (CCR): a link between enzymatic regulation and CCR?. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 89-96.
- Saier MH (1996) Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Res. Microbiol.* 147: 439-587.
- Saier MH & Reizer J (1992) Proposed uniform nomenclature of the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system based on structural, evolutionary and functional considerations. *J. Bacteriol.* 174: 1433-1438.
- Saito A, Fujii T, Yoneyama T, Miyashita K. (1998) *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 180: 2911-2914.
- Segura D, González R, Rodríguez R, Sandoval T, Escalante L & Sánchez, S (1996) *Streptomyces* mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4: 30-36.
- Seno ET & Chater KF (1983) Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and

- mutants strain of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* 129: 1403-1413.
- Simpson C & Russell R (1998) Identification of a homolog of CcpA catabolite repressor protein in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 66: 2085-2092.
- Stülke J & Hillen W (1998) Coupling physiology and gene regulation in bacteria: the phosphotransferase sugar uptake system delivers the signals. *Naturwissenschaften* 85: 583-592.
- Stülke J & Hillen W (1999) Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Op. Microbiol.* 2: 195-201.
- Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. (1994) Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology*, 140: 2349-2354.
- Titgemeyer F, Walkenhorst J, Reizer J, Stuiver MH, Cui X, Saier MH Jr. (1995) Identification y characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology*, 141:51-58.
- Titgemeyer F & Hillen W (2002) Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 59-71.
- van Wezel G, White J, Young P, Postma P & Bibb M (1997) Substrate induction and glucose repression of maltose utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in controlled by *malR*, a member of the *lacI-galR* family of regulatory genes. *Mol. Microbiol.* 23: 537-549.
- van Wezel G, Mahr K, König M, Traag B, Pimentel-Shmitt E, Willimek A & Titgemeyer F (2005) GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 55: 624-636.
- van Wezel G, König M, Mahr K, Nothhaft H, Thomane A, Bibb M & Titgemeyer F (2007) A new piece of an old Jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 12: 67-74.
- Walket JE, Saraste M, Runswick MJ & Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP syntase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a comoon nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Warner J & Lolkema J (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 475-490.
- Zalieckas J, Wray L & Fisher S (1999) Trans-acting factors affecting carbon catabolite repression of the *hut* operón in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 2883-2888.
- Zalieckas JM, Wray LV & Fisher SH (1998) Expression of the *Bacillus subtilis* *acsA* gene: position and sequence context affect cre-mediated carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* 180: 6649-6654.

## Biodegradación Óptima de Compuestos Fenólicos en un Reactor Discontinuo Secuencial

Iván Moreno-Andrade y Germán Buitrón

*Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA),  
Instituto de Ingeniería, Unidad Académica-Campus Juriquilla.*

*Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, Qro.*

E-mail: gbuitronm@ii.unam.mx

**Palabras clave:** Biodegradación, aclimatación, control óptimo, reactor discontinuo, compuestos fenólicos

**Key words:** Biodegradation, acclimation, optimal control, discontinuous reactor, phenolic compounds

### Resumen

Se estudió la biodegradación de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial con objeto de optimizar un proceso de tratamiento de aguas residuales industriales. La investigación se dividió en dos etapas. En la primera, se evaluó el cambio de la actividad de los microorganismos durante el proceso de aclimatación a los compuestos tóxicos y por la desaclimatación debido a las variaciones de concentración en el influente. El estudio se realizó utilizando una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa*) y un consorcio de microorganismos (lodos activados). En la segunda etapa se evaluó la aplicación de una nueva estrategia de control óptimo para la degradación de aguas residuales inhibitorias conteniendo compuestos fenólicos. En esta parte del estudio se evaluó la implementación práctica de dicha estrategia y su robustez ante situaciones transitorias (picos de concentración) comúnmente encontradas en los efluentes industriales.

### Abstract

The optimal biodegradation of phenolic compounds in a sequencing batch reactor was studied in order to optimize an industrial wastewater treatment process. The research was divided in two experimental sets. In the first one, the variation on the microbial activity during the acclimation process, and the effect of starvation periods due to the variation in the influent concentration, was evaluated. The study was conducted utilizing a pure culture (*Pseudomonas aeruginosa*) and a mixed culture (activated sludge). In the second part, a new optimal control strategy for the degradation of inhibitory industrial wastewaters containing phenolic compounds was tested. In part of the study the practical implementation of the strategy and its robustness to some transitory events (shock loads) commonly found in industrial wastewaters was evaluated.

---

### INTRODUCCIÓN

El proceso por lodos activados es el más ampliamente utilizado para tratar las aguas residuales industriales. La descarga de las industrias farmacéutica, química y petroquímica,

plásticos, papel y celulosa, etc., contiene compuestos tóxicos inhibitorios que pueden variar en flujo y concentración. Esto trae como consecuencia que los procesos continuos

presenten bajas eficiencias de degradación. Con el fin de evitar este problema y aumentar las eficiencias de degradación, se ha explorado el uso de reactores discontinuos secuenciales o SBR (Sequencing Batch Reactor, por sus siglas en inglés) (Wilderer *et al.*, 2001). En general, los SBR presentan tres características importantes: la repetición periódica de una secuencia de fases bien definida; la duración de cada fase del proceso se determina de acuerdo con el resultado de tratamiento esperado; y algo muy importante, el proceso se realiza en función del tiempo, y no en función del espacio como sucede en un proceso continuo. Por su flexibilidad, los sistemas SBR son susceptibles a ser totalmente automatizados y controlados por una computadora.

Los sistemas de tipo SBR funcionan generalmente bajo cinco fases: llenado, reacción, sedimentación, vaciado, y tiempo muerto. En el modo usual de operación, la duración de estas fases es determinada típicamente por un operador basado en su experiencia y en exhaustivas pruebas en el laboratorio con una planta experimental. En este modo de operación, la fase de reacción es suficientemente larga para permitir que las sustancias tóxicas sean degradadas. La duración de las fases de sedimentación y vaciado se fijan de acuerdo con las características de la biomasa y del reactor. Por ello se considera a esta estrategia operacional como estrategia de tiempo fijo.

A pesar de sus ventajas, cuando los procesos discontinuos funcionan bajo el modo usual de operación (fases con tiempos fijos), se han observado problemas de inhibición de los microorganismos derivados de un aumento repentino en la concentración de compuestos tóxicos (picos de concentración), desaclimatación y problemas por ayuno de los microorganismos lo cual se refleja en bajas eficiencias en la degradación de compuestos tóxicos (Buitrón y Moreno 2002; Buitrón *et al.*, 2003).

El objetivo de este trabajo fue contribuir a la solución del tratamiento de aguas residuales

industriales contaminadas por compuestos fenólicos por medio de la optimización de un reactor discontinuo secuencial. La investigación se dividió en dos etapas: una fundamental para evaluar los cambios de actividad de los microorganismos presentes en el proceso, y otra aplicada en donde se maximizó la velocidad de degradación por medio de una estrategia de control óptimo basada en la estimación en línea de la actividad respiratoria de los microorganismos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo empleando un agua residual sintética conteniendo 4-clorofenol (4CF) como única fuente de carbono y energía. Se agregaron nutrientes (nitrógeno, fósforo y oligoelementos) de acuerdo con Moreno-Andrade y Buitrón (2006). La investigación se dividió en dos etapas. En la primera, se evaluó el cambio de la actividad de los microorganismos durante el proceso de aclimatación al 4CF y por la desaclimatación debido a las variaciones de concentración en el influente. El estudio se realizó utilizando una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145) y un consorcio de microorganismos (lodos activados). En esta etapa se determinaron los parámetros cinéticos, fisicoquímicos y respirométricos. En el caso de la cepa pura se evaluó la pérdida de viabilidad de las células debido al ayuno, por medio de las técnicas de cuenta heterótrofa en placa y citometría de flujo.

En el caso de los lodos activados, se analizó la aclimatación a tres diferentes bloques de experimentos, con concentraciones iniciales de 4CF de 50, 100 y 200 mg/L (AC50, AC100 y AC200). Una vez que la biomasa fue aclimatada, se expuso a diferentes periodos de ayuno, para ello, los microorganismos se mantuvieron en condiciones endógenas, en ausencia de sustrato y solo con suministro de aire. Este procedimiento simula las variaciones de concentración frecuentemente encontradas en los efluentes industriales. Para cada biomasa aclimatada a 50, 100 y 200 mg/L

(DA50, DA100 y DA200) fueron estudiados distintos tiempos de ayuno: para DA50: 8, 12 y 24 h; para DA100: 12 y 24 h; y para DA200: 12, 24 y 36 h. En cada una de las condiciones de ayuno la biomasa fue recuperada a su actividad inicial, es decir, la actividad observada antes de ser expuesta al ayuno. Esta actividad fue recuperada por medio de una reaclimatación que consistió en controlar el tiempo de degradación de manera que el tiempo de reacción fuera suficiente para permitir una completa degradación del 4CF en cada ciclo, hasta recobrar el tiempo de degradación observado antes del ayuno.

Se realizó un análisis de los cambios en la comunidad microbiana durante la aclimatación de los lodos activados empleando técnicas de biología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*), clonado y secuenciación. El ADN total fue extraído a partir de muestras de 2 mL del lodo activado usando un kit de aislamiento de ADN (Ultra clean™ Soil DNA isolation kit, MoBio). La amplificación por PCR fue realizada de acuerdo con un ciclo de temperatura recomendado por BioRad, con el siguiente programa: activación inicial 95°C (15 min), 35 ciclos de: desnaturación 94°C (1 min), 53°C para alineación (1 min) y elongación a 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (1 min). Los primers universales GC-338F y 518R fueron utilizados para la amplificación de acuerdo con Muyzer *et al.* (1995). Los productos de PCR fueron separados por la técnica de DGGE usando el sistema D-code universal mutation detection system (BioRad, Hercules, CA) según lo descrito por Muyzer *et al.* (1995). Las porciones centrales de las bandas seleccionadas fueron cortadas y los amplicons extraídos fueron utilizados como plantilla para la re-amplificación. Estos productos de PCR fueron clonados en el plásmido PCR2.1-TOPO (Invitrogen, USA.). Los clones positivos fueron secuenciados con el primer M13 reversa (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) en un secuenciador ABI

Prism 3100 DNA sequencer. La identificación de los clones se realizó por medio de una búsqueda en la base de datos GenBank por medio del software BLAST (del NCBI, *National Center for Biotechnology Information*).

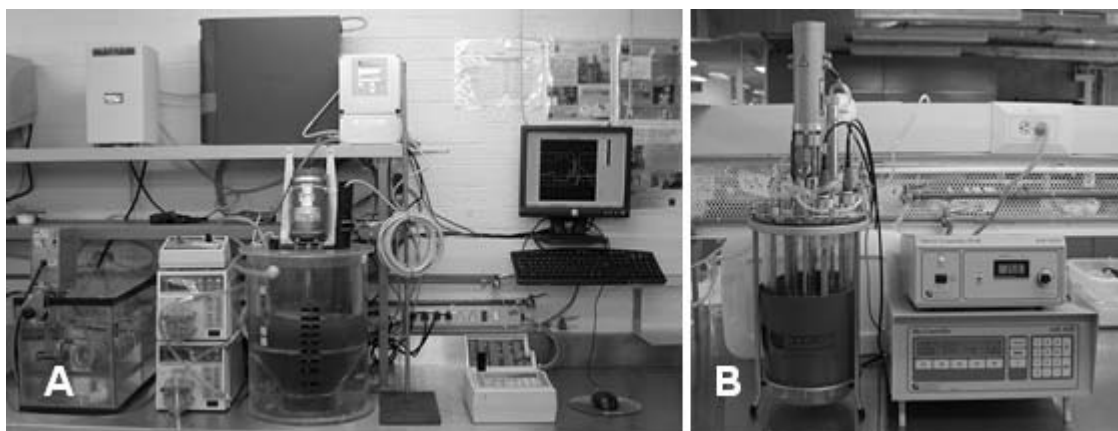
En la segunda etapa se evaluó la aplicación de una nueva estrategia de control óptimo para la degradación de aguas conteniendo 4CF. En esta parte del estudio se evaluó la implementación práctica de dicha estrategia y su robustez ante situaciones transitorias (picos de concentración) comúnmente encontradas en los efluentes industriales. La estrategia de control se basa en realizar un llenado óptimo con el fin de mantener a los microorganismos cerca de su máxima tasa de degradación, es decir a la máxima actividad sin que exista inhibición por la concentración de compuestos tóxicos y así evitar su ayuno. Se evaluó la implementación práctica la estrategia en la degradación de 4CF. Se expuso el reactor controlado a la degradación de aumentos puntuales de la concentración de 4CF (3000, 5000 y 7000 mg/L). También se probó el uso de la estrategia en la degradación de aguas residuales municipales mezcladas con diferentes concentraciones de fenol. Para este bloque de experimentos se emplearon microorganismos aclimatados a la degradación de 4CF y fenol, respectivamente.

### *Reactores piloto*

Se emplearon dos SBR aerobios para la realización de los experimentos. El primero fue usado para los experimentos con lodos activados (Fig. 1A) y el segundo reactor fue operado exclusivamente en los experimentos con la cepa pura (Fig. 1B). El primer SBR fue un biorreactor aerobio instrumentado con un volumen útil de de 7 L y un volumen de intercambio de 57%. El reactor fue agitado a 120 rpm. El flujo de aire empleado fue 1.5 Lpm (0.2-0.4 vvm) y la temperatura fue controlada a  $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . El reactor fue equipado con un sensor en línea de oxígeno disuelto y temperatura (Hendress+Hauser), bombas de

alimentación y vaciado (Masterflex). El llenado, tiempo de aeración, y vaciado del SBR fueron automatizadas. El SBR fue operado con los siguientes tiempos en cada etapa: preaeración: 15 min; llenado: 5 min; reacción: variable dependiendo del tiempo necesario para conseguir una eficiencia de degradación de 4CF de 99%; sedimentación: 12

a 30 min. El biorreactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (2000 mg de sólidos suspendidos volátiles/L). Para el caso de la evaluación de los picos de concentración se agregaron los nutrientes respetando la misma relación concentración de fenol/nutrientes.



**Fig. 1.** Biorreactores automatizados empleados para la degradación de compuestos fenólicos, A) Lodos activados, B) Biorreactor para cultivos puros.

Para los experimentos con la cepa pura se empleó un reactor SBR esterilizable (Applikon) con una capacidad de 7 L y un volumen útil de 4 L. La temperatura fue mantenida en  $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$  dentro del reactor por medio de una resistencia controlada. El reactor estaba conectado a un BioControlador (Applikon ADI 1030 Bio Controller), el cual controlaba su temperatura, así como la agitación (150 rpm), el oxígeno disuelto (70% del valor de saturación del medio líquido) y el pH dentro del mismo. El cultivo fue agitado a una velocidad de 150 rpm. El biorreactor fue esterilizado e inoculado con una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145). Como sustrato se empleó agua sintética conteniendo 25 mg/L de 4CF como única fuente de carbono y energía.

En todos los casos la aclimatación de los microorganismos se realizó por medio de la estrategia de tiempos de reacción variables y eficiencias fijas (Moreno-Andrade & Buitrón, 2006). Las técnicas analíticas empleadas fueron de

acuerdo con APHA (1992): Fenoles totales por 4-aminoantipirina, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Carbono Orgánico Disuelto (COD), Sólidos Suspendidos Volátiles y Totales (SSV y SST) y la Respirometría (tasa específica de consumo de oxígeno, TECO). El análisis de toxicidad se realizó por medio del método Microtox (ASTM D-5660-96, 2004).

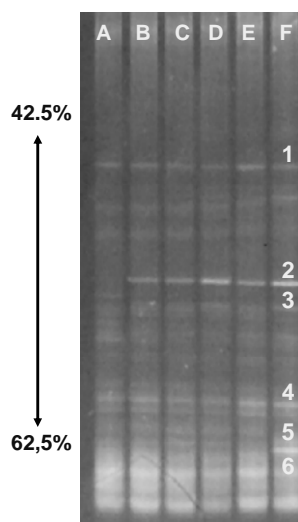
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Aclimatación y desaclimatación de los microorganismos*

Se observó que durante la aclimatación de los lodos activados al 4-clorofenol se genera un aumento exponencial en la tasa específica de degradación (reportados en Moreno-Andrade & Buitrón 2004). Los resultados coinciden con los presentados por Buitrón *et al.*, 1998, donde reportaron que el aumento exponencial de la tasa de degradación de 4CF podría explicarse por una

multiplicación de los microorganismos especializados. Dado que en este caso la única fuente de carbono y energía del medio fue el 4CF, la una selección de microorganismos especializados pudo ser debida debido a la presión de selección ocasionada por el compuesto tóxico. Esto coincide con los resultados del análisis de la comunidad por medio del DGGE (Fig. 2). En este estudio se demostró que durante la aclimatación existió un aumento (multiplicación) de una

población inicial pequeña de microorganismos del género *Pseudomonas* (banda 2 del gel en la Fig. 2). Se ha reportado que los microorganismos del género *Pseudomonas* presentan la capacidad de degradar clorofenoles como única fuente de carbono (Radehaus & Schmidt, 1992). Es posible concluir que durante la aclimatación existe una selección y multiplicación microorganismos especializados en la degradación del clorofenol, en este caso *Pseudomonas* sp.



Banda	Secuencia Determinada (pb)	Afiliación filogenética	Similaridad (100%)	NCBI GenBank
1	ND	ND	ND	ND
2	195	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	AY269867.1
3	168	<i>Novosphingobium subarticum</i> strain	99	AY167828.1
4	195	Bacteria no cultivable	100	UEU409001
5	170	<i>Hyphomicrobiaceae</i> No cultivable	100	AY710861.1
6	143	<i>Paracoccus</i> sp.	85	AY312056.1

ND= No determinada

**Fig. 2.** Análisis de la comunidad durante la aclimatación. La tabla muestra los microorganismos identificados en base a la secuenciación de los clones obtenidos. Cada microorganismo identificado corresponde a una banda presentada en gel del DGGE. A) Inóculo (0 h), B) 24 h, C) 48 h, D) 72 h, E) 96 h, F) 120 h.

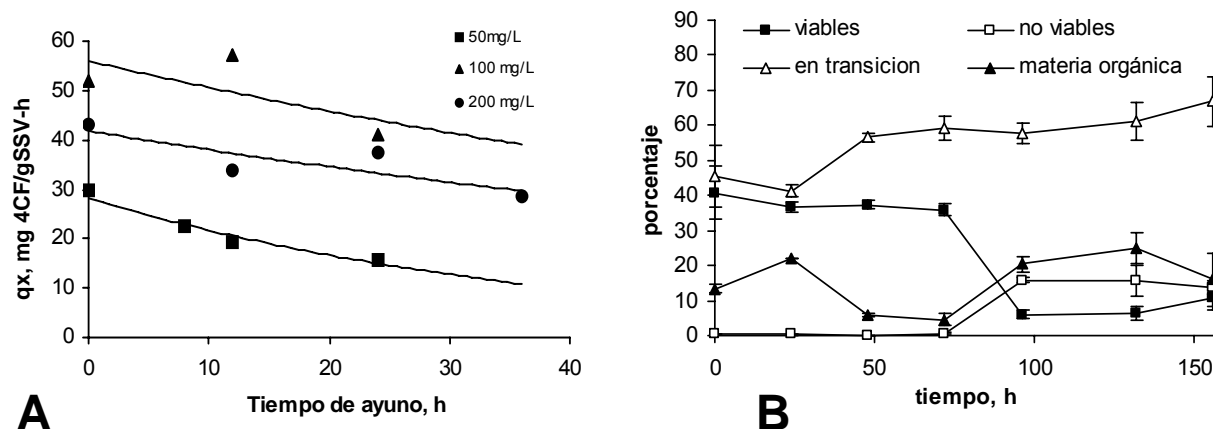
Los experimentos de ayuno demostraron que estos periodos de estrés generan disminución de la actividad microbiana (medida como TECO) y de la tasa específica de degradación,  $q$ , (Fig. 3A). En general, debido a la introducción de ayunos (entre 8 y 36 h), se observó un decremento entre 21 y 44% en la  $q$  y una pérdida de la actividad respirométrica entre el 26 y 35%. El grado del desaclimatación o porcentaje de pérdida de actividad de los microorganismos a la degradación del 4CF debido al ayuno parece ser determinado por la historia de la biomasa. Se evidenció que el efecto del ayuno sobre la tasa de degradación es menos significativo

cuando los microorganismos son puestos en condiciones de ayuno, re-aclimatados y sujetos posteriormente a un ayuno. Este efecto no fue observado cuando los ayunos son cíclicos y no hay un período de re-aclimatación intermedio. En cualquier caso, existió una disminución de la actividad de los microorganismos generada por el ayuno, lo cual afecta la actividad de los microorganismos en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Para verificar si la disminución de actividad por ayuno no solo es debida a una selección de especies, sino también a una pérdida de actividad y

viabilidad de los microorganismos, se utilizó una cepa pura. Los experimentos con *Pseudomonas aeruginosa* mostraron que la pérdida de actividad para degradar el sustrato tóxico esta relacionada con la disminución de la viabilidad celular. En la Fig. 3B es posible observar que existe un rápido incremento en el porcentaje de células muertas entre 72 y 96 h de ayuno (16% de las células mueren). Este fenómeno coincide con la disminución de las células viables iniciales de 40 a 8% (pérdida de viabilidad en 80% de las células iniciales). Para este caso, periodos de ayuno superiores a 72 h producen severos cambios en la viabilidad de las células, ya que menos del 10% de

la población se mantiene viable. Un punto de discusión interesante es que para el caso de más de 96 h de ayuno, los porcentajes de las células viables y no viables se estabilizan; sin embargo la actividad de los microorganismos para degradar el 4CF continúa disminuyendo. La tasa específica de degradación mostró que existe un decremento de  $16 \times 10^{-8}$  a  $6.51 \times 10^{-8}$  mg 4CF/Unidades formadoras de colonias/h debido a la exposición de la biomasa aclimatada a un ayuno de 132 h. Esto demuestra que existe disminución en la tasa de degradación relacionada con la pérdida de la actividad degradadora de los microorganismos.



**Fig. 3.** A) Influencia del tiempo de ayuno sobre la tasa específica de degradación de los lodos activados. Los resultados son comparados con las condiciones iniciales antes de la perturbación. B) Cambios en la viabilidad determinada por citometría de flujo debido al ayuno en la cepa pura *Pseudomonas aeruginosa*. Nota: Las células en transición son células vivas no viables (con la membrana dañada pero no muertas, por lo cual podrían o no volver a recobrar su viabilidad).

Para el caso de 132 y 156 h de ayuno, la biomasa fue seriamente inhibida y se presentó un residual de 4CF de 78 y 84% respectivamente (publicado en Moreno-Andrade & Buitrón, 2007). Esto indica que no solamente existe un decremento de la viabilidad de las células durante al ayuno, sino también existe disminución de la actividad para degradar 4CF. Por lo anterior se puede concluir que para el caso lodos activados no sólo hay cambios en la dinámica poblacional, ya que algunas

especies mueren y otras resisten a la exposición a periodos de ayuno, sino que también existe pérdida de la actividad degradadora y en la viabilidad de las células.

#### Estrategia de tiempo óptimo

En el modo usual de operación de los SBR, la duración de cada una de estas fases es determinada típicamente por un experto, basado en su experiencia y pruebas en laboratorio con una

planta experimental. Generalmente, la fase de la reacción se fija de forma que sea suficientemente larga para permitir que las sustancias tóxicas sean degradadas. Sin embargo, presentan problemas cuando se aplican en la degradación de aguas residuales tóxicas: inhibición y desaclimatación de los microorganismos, problemas debidos a aumentos puntuales en la concentración de de compuestos tóxicos (picos de concentración), y problemas de ayuno de los microorganismos, causando bajas eficiencias de degradación en el proceso y por lo tanto un tratamiento deficiente del agua residual (Buitrón *et al.*, 2004).

Para superar estos problemas, se propuso el uso de una nueva estrategia de control llamada Control de Tiempo Óptimo Dirigido por Eventos o ED-TOC (Betancur *et al.*, 2006). La estrategia de control requiere solamente la medida en línea de la concentración de oxígeno disuelto, el valor del coeficiente de transferencia de masa del oxígeno ( $k_La$ ) y el volumen del reactor, para controlar el caudal del influente de modo que la tasa de degradación del sustrato se mantenga alrededor de su valor máximo durante la toda la fase de llenado y reacción. La ventaja de la estrategia es que no requiere el uso de modelos matemáticos complejos, ni de parámetros cinéticos del proceso. Lo anterior hace que la estrategia de control óptimo sea fácilmente aplicable en una planta de tratamiento.

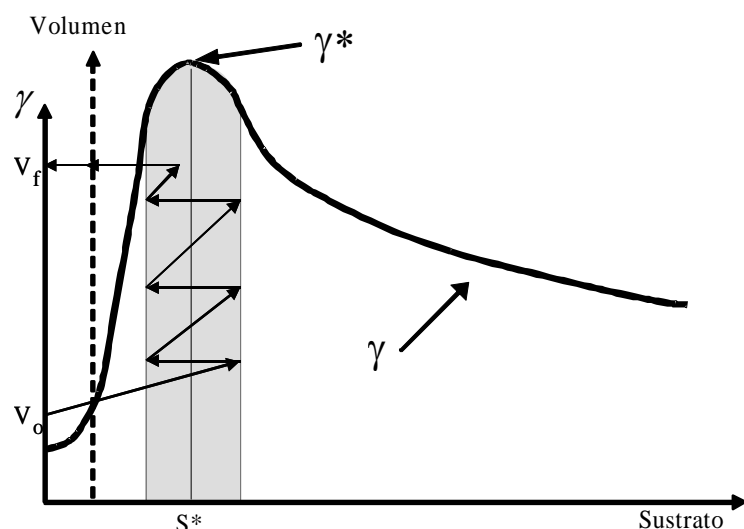
La estrategia ED-TOC estima una variable llamada gama ( $\gamma$ ) relacionada con la tasa de reacción. Esta variable se puede estimar en tiempo real usando la concentración de oxígeno disuelto y el volumen del reactor. A continuación se describe brevemente el método de estimación (el desarrollo matemático se encuentra completamente descrito en Moreno *et al.*, 2006). Se sabe que para compuestos tóxicos el comportamiento de la tasa de crecimiento de la biomasa ( $\mu$ ), o la tasa de degradación de sustrato, en función de la concentración del sustrato (S) se puede describir por la ley de Haldane. En este modelo,  $\mu$  alcanza un valor máximo,  $\mu^*$ , cuando la concentración del

sustrato es  $S^*$ . La concentración tóxica sobre o debajo de  $\mu^*$  generará una disminución en la tasa de crecimiento y, por lo tanto, también en la tasa de reacción. Así, si se garantiza que S está cerca a  $S^*$ , la tasa de degradación estará cerca de un valor máximo. El problema consiste, por lo tanto, encontrar y mantener  $\mu$  en su valor máximo durante todo el período de reacción del reactor. Un problema adicional es que  $\mu$  es muy difícil en la práctica medir en línea la concentración del sustrato. Es interesante precisar que en la estrategia de control se desarrolló un método para estimar  $\gamma$  y relacionarla con  $\mu$  de manera tal que ambos se encuentren en su valor máximo. Esto se realizó por medio de un balance de materia considerando las fases de llenado y reacción del SBR. Así,  $\gamma$  esta definida por la ecuación 1:

$$\gamma = k_La(O_s - O)V + (O_{in} - O)Q_{in} - V \frac{dO}{dt}$$

donde  $\gamma$  es la tasa de consumo másico de oxígeno ( $\text{mgO}_2/\text{h}$ ),  $k_La$  es el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno ( $\text{h}^{-1}$ ),  $O_s$  es la concentración de saturación del oxígeno disuelto ( $\text{mg/L}$ ),  $O$  es la concentración del oxígeno disuelto en el reactor ( $\text{mg/L}$ ),  $V$  es el volumen del reactor (L) y  $O_{in}$  es la concentración de oxígeno disuelto en el influente ( $\text{mg/L}$ ).

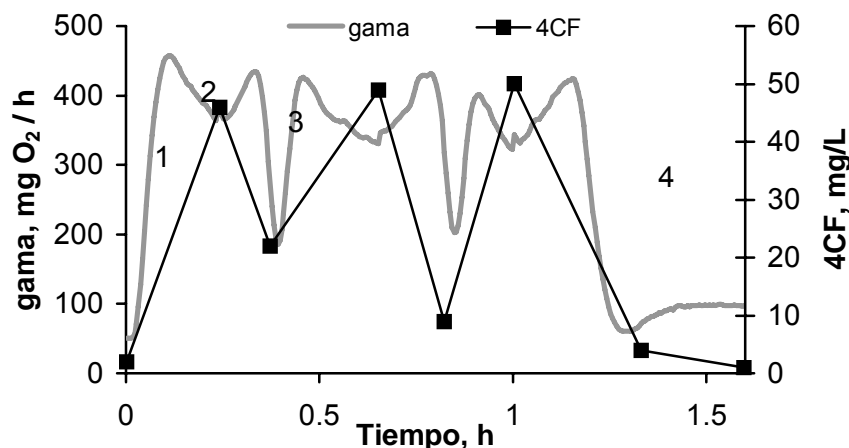
La Fig. 4 presenta el comportamiento de  $\gamma$  en función de la concentración del sustrato. Es claro en la ecuación 1 que  $\gamma$  es una función semejante a  $\mu$ , por lo cual ambas variables alcanzan sus valores máximo  $\gamma^*$  y  $\mu^*$  simultáneamente cuando  $S=S^*$ . De manera que si se mantiene  $\gamma$  en su máximo valor ( $\gamma^*$ ) durante toda la fase de llenado y reacción, se obtendrá la máxima velocidad de degradación, evitando la inhibición y minimizando el tiempo de reacción. Los únicos parámetros necesarios para calcular  $\gamma$  son el  $k_La$ , la concentración de saturación del oxígeno disuelto ( $O_s$ ), y la concentración del oxígeno disuelto en el influente ( $O_{in}$ ).



**Fig. 4.** Estrategia de control ED-TOC. La estrategia controla el suministro del sustrato al reactor para mantener el valor de  $\gamma$  cerca de  $\gamma^*$ . El  $V_o$  indica el volumen inicial en el tanque. El flujo se alimenta al reactor de tal manera que se mantenga la tasa de degradación alrededor del valor óptimo (zona gris). Una vez que se alcance el volumen final,  $V_f$ , el reactor continúa su funcionamiento como un batch clásico con lo cual la tasa de degradación disminuye.

La estrategia de control funciona encendiendo o apagando la bomba de llenado (zona gris de la Fig. 4). La Fig. 5 presenta la cinética de 4CF, OD y  $\gamma$  durante un ciclo de degradación en el reactor controlado por la estrategia ED-TOC. Es posible distinguir el funcionamiento del control si se sigue el comportamiento del 4CF y de  $\gamma$  en la cinética de degradación. Una vez que el influente comienza a ser alimentado al reactor, la reacción comienza. El estimador calcula  $\gamma$  y monitorea su valor. Cuando el control detecta que el punto máximo de  $\gamma$  ha pasado, la bomba de alimentación se apaga (0.3 h, punto 2, Fig. 5). Los microorganismos degradan el sustrato y el valor de  $\gamma$  vuelve a pasar por su valor

máximo ( $\gamma^*$ ) y disminuye debido a que la concentración de sustrato es más baja que  $S^*$  (la concentración de 4CF ha pasado de 48 a 22 mg 4CF/L, observable a las 0.4 h, punto 3, Fig. 5). El control detecta este cambio, con lo cual se enciende la bomba de alimentación nuevamente, y una nueva carga de sustrato se alimenta al reactor. Este procedimiento se repite hasta que se ha alcanzado el volumen máximo del reactor y entonces la degradación continúa como en una reacción en lote ordinario, terminando la reacción cuando el  $\gamma$  está en un valor mínimo y constante (a partir de las 1.6 h, punto 4, Fig. 5).



**Fig. 5.** Evolución de la concentración de sustrato y  $\gamma$  (gama) en un ciclo bajo estrategia ED-TOC.

El SBR fue operado con la estrategia ED-TOC durante más de 450 ciclos de operación (100 días) en la degradación de 4CF, en las condiciones estándar (degradando 350 mg 4CF/L), de manera estable y reproducible. La mineralización del 4CF fue terminada de manera satisfactoria, con eficiencias de biodegradación mayores al 99.9% como 4CF y mayores a 98% como DQO o carbono orgánico. Los sólidos suspendidos totales en el efluente se mantuvieron debajo de 40 mg/L, valor requerido en la norma oficial mexicana para una descarga en un río o para su uso en riego agrícola o uso público urbano con previo tratamiento (NOM-001-ECOL-1996). Los lodos mostraron excelente sedimentabilidad sin importar que la tasa de degradación de los microorganismos se mantuviera en su valor máximo. La velocidad de sedimentación se mantuvo alrededor de 3 m/h y el índice volumétrico de lodos menor a 90 mL/g. Adicionalmente, se evaluó la variación del flujo de oxígeno, cambios en la concentración de biomasa en el reactor y variaciones del pH dentro del proceso encontrando que la estrategia ED-TOC fue robusta ante estas variaciones mostrando una excelente respuesta en el control del proceso.

Debido a que la estrategia de control óptimo permitió que la degradación ocurra a una tasa cercana al máxima durante la toda la fase de reacción, fue posible la biodegradación eficiente de efluentes conteniendo concentraciones de fenol y 4-clorofenol entre valores de 750 hasta 7000 mg/L sin ningún tipo de inhibición, lo cual no había sido posible por ningún proceso biológico. De hecho, este tipo de concentraciones pueden ser consideradas como un residuo peligroso. Se ha reportado que para los procesos continuos por lodos activados, la concentración máxima de fenoles que puede ser degradada es de 10 mg/L (Ellis *et al.*, 1996). Para el caso de reactores discontinuos los límites reportados son 1200 mg de fenol/L (Tziotzios *et al.*, 2005) y de 500 mg 4CF/L

(Buitrón *et al.*, 2005). Por lo anterior, esta estrategia demostró ser un excelente candidato para degradar efluentes industriales con altas concentraciones de efluentes inhibitorios. La Fig. 6 muestra una cinética de degradación de 7000 mg 4CF/L por medio de la estrategia ED-TOC. La degradación del sustrato se llevó a cabo en 42 h. Al comparar la estrategia ED-TOC con el modo usual de operación de los SBR se encontró que, para degradar la misma concentración de 4CF, el tiempo de degradación fue menor al emplear la estrategia ED-TOC (reducción del tiempo de degradación entre 25% y 52% para la degradación de 350 y 7000 mg 4CF/L, respectivamente). La estrategia de control mostró la factibilidad de ser empleada en forma práctica en el laboratorio. Adicionalmente la estrategia ED-TOC fue evaluada a una planta prototipo industrial de 1 m<sup>3</sup> degradando agua residual conteniendo 4CF (Fig. 7). La estrategia de control demostró que es robusta y estable al ser aplicada en el biorreactor por períodos largos de operación (más de 2 meses). Las eficiencias de degradación de 4-clorofenol fueron mayores a 99.9% y a 98% como 4CF y DQO respectivamente. La estrategia de control óptimo pudo manejar incrementos en la concentración de 4CF en el influente de 1000 mg/L sin problemas de la inhibición. Los resultados del escalamiento del reactor a un prototipo industrial se encuentran reportados en Buitrón *et al.*, (2007).

Un análisis de la comunidad por medio de la técnica de DGGE demostró que a pesar de que la estabilidad del sistema fue demostrada por medio de los parámetros fisicoquímicos, se evidenció una fuerte dinámica entre las poblaciones que llevan a cabo la degradación del 4CF, ya que algunas poblaciones mostraron mayor o menor dominancia y otras desaparecieron durante la operación del reactor a largo plazo. Así mismo se demostró que el proceso no solo eliminó el compuesto original y la DQO, sino que también se eliminó la toxicidad del 4CF (medida por medio del sistema Microtox).

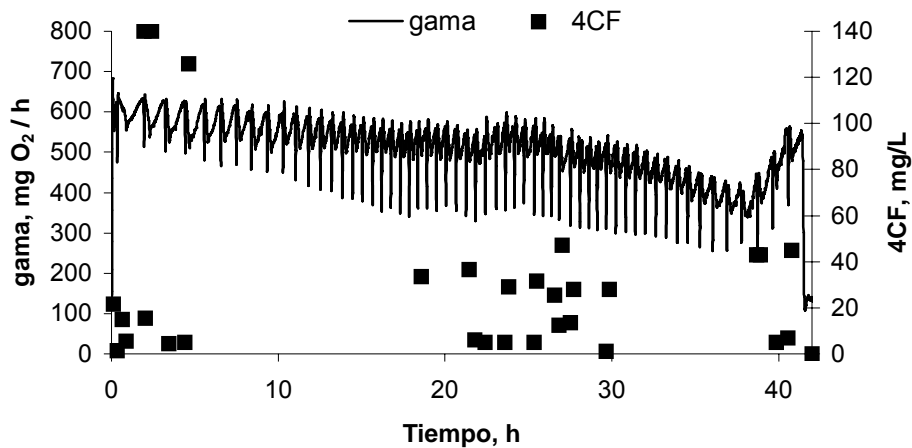


Fig. 6. Degradación de 7000 mg 4CF/L por medio de la estrategia de control óptimo.



Fig. 7. Planta piloto industrial de 1 m<sup>3</sup>

## CONCLUSIONES

Se evidenció que el grado de desaclimatación de los microorganismos en ayuno es determinado por la historia de la biomasa. El efecto del ayuno sobre la tasa de degradación es menos significativo cuando los microorganismos son sometidos a condiciones de ayuno, re-aclimatados y sujetos nuevamente a condiciones de ayuno. Para maximizar la degradación y evitar la desaclimatación de la biomasa activa es necesario que los microorganismos se mantengan cerca de la

máxima tasa de degradación durante toda la fase de reacción.

Con la estrategia de control propuesta fue posible la biodegradación eficiente de sustancias inhibitorias sin importar las variaciones de concentración de compuestos fenólicos en la alimentación, ya que la tasa de degradación de los microorganismos se mantiene en valores cercanos al máximo durante todo el ciclo de reacción, por lo cual la concentración del compuesto tóxico no llega a valores que sean inhibitorios para los microorganismos. Se demostró que la

implementación práctica de la estrategia fue factible en un prototipo industrial de 1 m<sup>3</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento de CONACYT a través del proyecto 46093Y. Iván Moreno Andrade agradece a CONACYT la beca de posdoctorado otorgada (*IdAP 10310*). Este trabajo incluye resultados del proyecto EOLI del programa INCO de la Unión Europea (ICA4-CT-2002-10012). Se agradece la asistencia técnica de Jaime Pérez Trevilla y Gloria Moreno.

## REFERENCIAS

- ASTM D 5660-96 (2004) Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium. American Society for Testing and Materials Standards, EEUU.
- AFNOR (1985) Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles, Normalisation française, NFT 90-312. Francia.
- APHA (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA/AWWA/WEF. 18<sup>th</sup> ed., Washington DC. Part 2000 y 5000.
- Betancur MJ, Moreno JA, Moreno-Andrade I & Buitrón G (2006) Practical optimal control of fed-batch bioreactors for the wastewater treatment. *Int. J. Robust Nonlinear Control*. 16: 173-190.
- Buitrón G, Gonzalez A & Lopez-Marin LM (1998) Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Sci. Technol.* 37: 371-378.
- Buitrón G & Moreno J (2004) Modeling of the acclimation/deacclimation processes of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water Sci. Technol.* 49: 79-86.
- Buitrón G, Moreno-Andrade I, Linares-García JA, Pérez J, Betancur MJ, & Moreno JA (2007) Evaluation of an optimal fill strategy to biodegrade inhibitory wastewater in an industrial-prototype discontinuous reactor. *Water Sci. Technol.* 55: 47-54.
- Buitrón G, Schoeb M-E & Moreno J (2003) Automated Sequencing Batch Bioreactor Under Extreme Peaks of 4-Chlorophenol. *Water Sci. Technol.* 47: 175-181.
- Ellis TG, Smets BF, Magbanua BS & Grady CPL Jr (1996) Changes in measured biodegradation kinetics during the long-term operation of completely mixed activated sludge (CMAS) bioreactors. *Water Sci. Technol.* 34: 35-42.
- Moreno JA, Betancur MJ, Buitrón G & Moreno-Andrade I (2006) Event-Driven Time-Optimal Control for a class of discontinuous bioreactors, *Biotech Bioeng.* 94: 803-814.
- Moreno-Andrade I & Buitrón G (2004) Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Wat. Sci. Technol.* 50: 251-258.
- Muyzer G & Ramsing NB (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Arch. Microbiol.* 32: 1-9.
- Radehaus PM & Schmidt SK (1992) Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2879-2885.
- Tziotziou G, Teliou M, Kaltsouni V, Lyberatos G & Vayenas DV (2005) Biological phenol removal using suspended growth and packed bed reactors. *Biochem. Eng. J.* 26: 65-71.
- Wilderer PA, Irvine RL & Goronszy MC (2001) Sequencing batch reactor technology. Scientific and technical report No 10, IWA Publishing, London. 76 pp.

## **Reseña Científica del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 2007**

*Dra. Judith Jiménez Guzmán  
UAM-Iztapalapa*

Como cada dos años, la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería realizó su tradicional congreso, el más importante en este campo del Continente Americano. En esta ocasión el XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería se celebró en la ciudad de Morelia, Michoacán entre el 25 y el 29 de junio de 2007, enmarcado por la celebración del 25 aniversario de la SMBB.

Tuvimos a lo largo de 5 días de jornada, la oportunidad de acercarnos a la frontera del conocimiento en los diversos campos de la Biotecnología y la Bioingeniería a través de 7 excelentes conferencias magistrales, 5 simposia y una mesa redonda coordinados magistralmente por nuestros ex-presidentes; además de 160 trabajos libres presentados en sesiones orales y 509 carteles exhibidos.

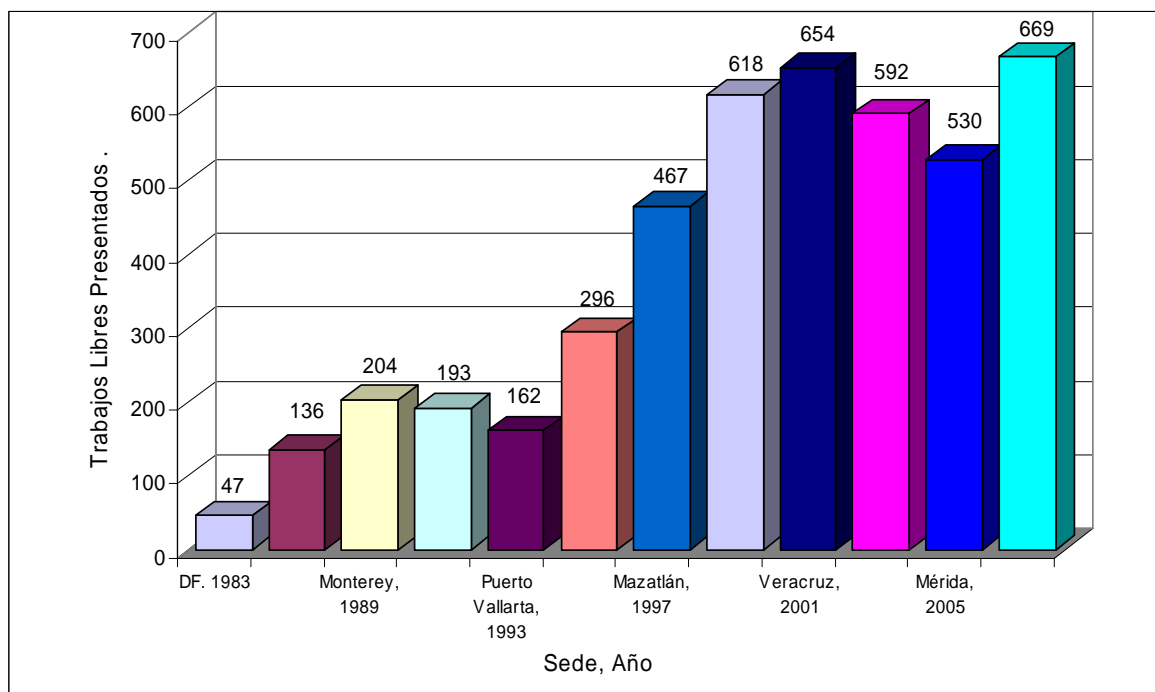
Desde la conferencia inaugural, dictada por un prestigiado y querido socio fundador: el Dr. Agustín López Murguía Canales, seguida por las conferencias magistrales de Manon Cox, Carole Cramer, Jonathan Dordick, Armando Tovar y Lourival Possani, hasta la conferencia de clausura, dictada como es tradición por el ganador del premio Carlos Casas Campillo, esta vez el Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo, tuvimos la oportunidad de conocer sobre los avances, tendencias y retos de la biotecnología y la bioingeniería aplicadas a diversos ámbitos de las actividades y creatividad humana. Todos ellos contribuyeron de manera medular al brillo científico de este congreso.

Los ex-presidentes son una parte muy importante de la fortaleza de la SMBB, no solo por la dedicación que cada uno tuvo en su momento que contribuyó a la consolidación y fortalecimiento de la Sociedad, sino por su compromiso adquirido hacia ella, y porque son un conjunto valioso de expertos con prestigio y visión que integran un grupo asesor permanente. En reconocimiento a ello y por la coyuntura del 25 aniversario, esta vez 5 simposia y una mesa redonda fueron coordinados por los ex-presidentes: Mariano Gutiérrez Rojas, Mayra de la Torre, Gustavo Gutiérrez López, Mariano García Garibay, Sergio Sánchez Esquivel y Adalberto Noyola Robles. En estos foros de altísimo nivel académico, cada uno reunió expertos de sus respectivos campos para hacer exposiciones y disertaciones de excelencia que le dieron un enorme realce académico a este Congreso.

El Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería es principalmente el espacio académico de y para los socios y la comunidad biotecnológica del país. Antes que otra cosa es un foro donde esta valiosa comunidad presenta sus logros y avances a través de la convocatoria para trabajos libres. Estudiantes, académicos y profesionales de todos los campos de la biotecnología, de diversos puntos geográficos, acuden para presentar sus trabajos, para exponerlos y a su vez conocer el trabajo de sus pares y enriquecerse así todos con el quehacer de cada uno de quienes trabajamos en biotecnología y bioingeniería.

Así, en esta última semana de junio de 2007, nos hemos reunido el número más alto de delegados que se hayan dado cita en un congreso de la SMBB. El número de participantes en este XII Congreso fue de 1083, superando el record anterior establecido en Veracruz en 2001, cuando nuestro Congreso realizado conjuntamente con el Nacional de Ingeniería Bioquímica logró reunir 990 asistentes. En esta ocasión, el número fue superado con la sola convocatoria de nuestro congreso, lo cual es una muestra clara del crecimiento y fortalecimiento de la SMBB y de la relevancia de su congreso.

Figura 1. Trabajos presentados en los diferentes congresos de la SMBB



Por supuesto que esta alta concurrencia se correlaciona con el número más alto de trabajos libres enviados y presentados en uno de nuestros congresos. El Comité Científico del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería que me honré en presidir, recibió 698 resúmenes para ser considerados, de los cuáles se aceptaron, por su calidad científica, 669 en total, distribuidos en 160 exposiciones orales y 509 carteles, estableciendo un nuevo récord para nuestro congreso (Figura 1).

Agradezco a los Doctores: Rafael Vázquez Duhal, Víctor Manuel Loyola, Humberto Hernández Sánchez, Francisco Javier Cervantes Carrillo, Oscar Soto Cruz, Gloria Soberón Chávez, Alejandro Alagón Cano, Octavio Loera Corral y Laura Palomares Aguilera, quienes constituyeron, como coordinadores de las áreas, la parte medular del comité científico del congreso, y a todos los evaluadores que trabajaron con ellos.

Nuestro Congreso es eminentemente nacional, pero por su calidad científica reconocida en el continente, suele tener una importante participación de biotecnólogos de otros países. En esta ocasión, además de México hubo delegados de Argentina, Brasil, Chile, Colombia y Estados Unidos. La cobertura geográfica dentro de nuestro país fue también sin precedente al estar representadas 28 entidades federativas.

Parte importante del quehacer y vocación de la SMBB es reconocer y estimular a los estudiantes que realizan tesis en los distintos niveles académicos. Por ello, como en congresos anteriores, se entregaron los premios Alfredo Sánchez Marroquín 2007 a las mejores tesis en biotecnología y bioingeniería, auspiciado por la compañía Yakult, cuya ceremonia de entrega se realizó durante la cena de gala por el aniversario de la SMBB, y el premio Sergio Sánchez Esquivel 2007 a los mejores protocolos de tesis para los distintos grados académicos, premio patrocinado por HyClone y Química Valaner.

La ciudad de Morelia fue un digno y hermoso escenario para nuestro congreso. Una bella ciudad colonial con una vocación cultural de siglos fue una sede increíble para el congreso, que nos permitió además disfrutar de su catedral y otros espacios maravillosos a lo largo de esta semana.

Estudiantes de la Universidad Tecnológica de Morelia y de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, fueron nuestro incansable personal de apoyo logístico para este evento. Un particular reconocimiento a ellos, a las comunidades académicas de estas instituciones y a la comunidad académica de Michoacán en general, y también al ayuntamiento de la ciudad y al gobierno del Estado por su hospitalidad.

Nuestro congreso es cada vez más grande en número de participantes y actividades; por ello no es fácil encontrar recintos que satisfagan las necesidades de espacio y logísticas, y alberguen a un gran número de delegados para poder celebrar un evento digno. Por ese motivo, por primera vez en la historia del congreso se recurrió a un Centro de Convenciones con capacidad y facilidades como las que se tuvieron en esta maravillosa ciudad de Morelia. Gracias al personal de Ceconexpo por todo el apoyo, la disposición de los espacios e infraestructura.

Gracias a Margarita González Sarabia y a todo el personal de la empresa de organización de eventos MGS por el eficiente, entusiasta y amable trabajo realizado en los aspectos logísticos, de organización, de proyección, de coordinación de eventos especiales y de atención a invitados. Contar con una empresa tan profesional permitió al comité organizador del congreso atender a los asistentes en forma eficiente, digna y amable, y tener una parte logística a la altura de la calidad científica del evento.

Gracias a las empresas que con su presencia en los espacios de exposición comercial y por otros medios contribuyeron al financiamiento del congreso. Una mención especial a Applikon que como es ya tradición, rifó un valioso equipo de fermentación.

El apoyo de las Delegaciones de la SMBB fue, como siempre, muy importante para la realización de diferentes tareas académicas. Particularmente agradezco a Cristóbal Noé Aguilar por la coordinación de la evaluación de los carteles.

Finalmente mi reconocimiento y agradecimiento a mis compañeros de la mesa directiva nacional: Amelia, María Luisa, Gaby, Maricarmen, Alaide y Marco Rito, con quienes, junto con Elydeé y Yamandú, tuve la fortuna de integrar la parte central del comité organizador del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Quiero hacer patentes el esfuerzo e incansable labor realizados por mis compañeros de la mesa directiva nacional, y muy especialmente quiero también agradecer y reconocer el trabajo, la amistad, la compañía y disposición de Elydeé, quién como pudimos constatar en la cena de gala por la ovación que recibió, es muy querida y esencial por y para la SMBB. Y a Yamndú, compañero de las trincheras en ya cuatro congresos, y verdadera arma secreta de la SMBB.

Muchas gracias a todos.

**RESEÑA DE LA ENTREGA DEL PREMIO SERGIO SÁNCHEZ ESQUIVEL,  
THERMO FISHER SCIENTIFIC – QUÍMICA VALANER – SMBB  
A PROTOCOLOS DE TESIS EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA,  
EDICIÓN 2007**

*Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
Subsecretaria SMBB  
Presidenta de la Comisión de Premios  
Correo electrónico: quirabma@servidor.unam.mx*

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería junto con la compañía Thermo Fisher Scientific (antes HyClone), estableció en 2003 este reconocimiento para los mejores protocolos de tesis de investigación con el que se distingue a estudiantes sobresalientes que se encuentren en las primeras etapas de la realización de su trabajo experimental que los llevará a obtener el Título de Licenciatura o el Grado de Maestro o Doctor en cualquiera de las áreas de la Biotecnología o Bioingeniería. Este premio se ofrece simultáneamente en otros países latinoamericanos, por lo que la SMBB agradece nuevamente a la compañía Thermo Fisher Scientific por el continuo apoyo a los estudiantes de nuestro país.

En la edición 2007 del Premio Sergio Sánchez Esquivel, se recibieron varios protocolos de investigación en los tres niveles académicos, pertenecientes a estudiantes de diversas instituciones de enseñanza del país. La labor de evaluación de estos trabajos estuvo a cargo de la Comisión de Premios de la SMBB, integrada por reconocidos académicos y miembros activos y altamente comprometidos con nuestra Sociedad, los doctores Amanda Gálvez Mariscal, Gerardo Saucedo Castañeda, Leobardo Serrano Carreón y Rafael Vázquez Duhalt, a quienes la SMBB les agradece la dedicación y profesionalismo durante la tarea de evaluación de los protocolos recibidos. Los alumnos premiados exhibieron un cartel sobre su trabajo durante el XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, el cual se llevó a cabo en la ciudad de Morelia, Michoacán, del 25 al 29 de junio de 2007. Agradecemos la presencia en la ceremonia de premiación del Q. Homero Hernández, Director General de Química Valaner; el Sr. Walter Brandes, Vicepresidente de Ventas de Norte América y la Sra. Rosario Roose, Directora de Desarrollo de Negocios de Latino América, ambos de Thermo Fisher Scientific; así como la del Dr. Sergio Sánchez, en cuyo honor se ha denominado a este premio.

Los ganadores fueron:

**Categoría Licenciatura**

Protocolo de Tesis: “Efecto de las condiciones de operación sobre la producción del nematodo *Steinernema carpocapsae* en biorreactor agitado neumáticamente”

Estudiante: Gabriela Maciel Vergara

Asesor: Dr. Norberto Chavarría Hernández

Institución: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

**Categoría Maestría**

Protocolo de Tesis: “Desarrollo de métodos para el análisis de comunidades de fitoplancton tóxico mediante SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) y sondas moleculares”

# premio sergio sánchez esquivel 2007

Estudiante: Angélica Herrera Sepúlveda

Asesora: Dra. Norma Hernández Saavedra

Institución: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

## **Categoría Doctorado**

Desierto.

Felicitemos a los ganadores y exhortamos a ustedes a continuar participando en este premio.

REVISTA de la **Sociedad Mexicana de**

# BIOTECNOLOGIA

y **Bioingeniería**, A.C.



Nueva Era  
Volumen 12 Número 2

## Índice

EDITORIAL	1
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	2
<b>Artículos</b>	
Evolución Dirigida en la Generación de Biocatalizadores: Biocatalizadores Hechos a Medida	5
Represión Catabólica por Carbono de Bacterias Gram- Positivas: Inteligencia Alimenticia	24
Biodegradación Óptima de Compuestos Fenólicos en un Reactor Discontinuo Secuencial	49
Reseña Científica del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 2007	60
Reseña de la entrega del Premio Sergio Sánchez Esquivel, Thermo Fisher Scientific – Química Valaner – SMBB a protocolos de tesis en Biotecnología y Bioingeniería, edición 2007	63