



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE QUÍMICA

Adaptación del Metabolismo Central en el  
Mantenimiento de la Homeostasis en  
Ambientes Hipersalinos. Caso del  
Halófilo *Chromohalobacter salexigens*

D. José María Pastor Hernández

2015



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Química

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B  
e Inmunología

Adaptación del metabolismo central en el  
mantenimiento de la homeostasis en ambientes  
hipersalinos. Caso del halófilo *Chromohalobacter  
salexigens*

TESIS DOCTORAL

José María Pastor Hernández

DIRECTORES

Dr. Manuel Cánovas Díaz

Dr. Vicente Bernal Sánchez

Murcia, 2015

Durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, José M<sup>a</sup> Pastor Hernández ha sido receptor de una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación, y ha realizado una estancia breve en Lisboa (ITQB, Oeiras) financiada asimismo por el programa FPU.

Esta Tesis ha sido financiada por los proyectos (ambos en colaboración con el Depto. de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla):

“Desarrollo de la Biología de Sistemas de *Chromohalobacter salexigens* (ECTOsys)” (P08-CVI-3724, financiado por la Junta de Andalucía). Responsable: Dr. Joaquín José Nieto González.

“Uso de la bacteria extremófila *Chromohalobacter salexigens* como factoría celular de compuestos de interés biomédico (Extremed)” (P11-CVI-7293, financiado por la Junta de Andalucía). Responsable: Carmen Vargas Macías.

*A mi madre*



## Agradecimientos

En primer lugar el más sincero de mis agradecimientos va dirigido a mis dos directores de Tesis, Manuel Cánovas y Vicente Bernal.

Manuel, gracias por darme la oportunidad de conocer y de incorporarme al mundo de la investigación científica, por apoyarme y confiar siempre en mí a lo largo de estos años, en los momentos buenos y en los menos buenos. Por preocuparte siempre de que mis condiciones fueran las mejores. Gracias.

Vicente, gracias por enseñarme la excelencia, por ayudar tanto en mi formación, y sobre todo por tu empeño en transmitirme siempre motivación. Por tu infinita paciencia con mis dudas y desánimos, por acompañarme siempre en cada paso, por estar siempre dispuesto a ayudar en todas las circunstancias. Gracias sobre todo, por enseñarme que la calidad académica, la científica y la personal, pueden ir de la mano. Gracias.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla, en especial a Carmen, por tu asistencia en la distancia, por ser la artífice de todo, y hacer posible el proyecto de Chromohalobacter. Gracias a Manuel, y los insondables caminos de sus circuitos neuronales, por su motivación e implicación. A Joaquín, Montse, Rosa, Francine, por todo lo que han ayudado a construir entre todos.

Al equipo del ITQB en Lisboa. A Helena, por acogerme y hacer posible mi estancia. En especial a Nuno, por su asistencia científica y logística, y a Ana Esteves, Luís, Dušica, Ana Lúzia y a todo el departamento de Cell Physiology & NMR por convertir el “purtuguesh” en mi tercera lengua y enseñarme trabajo en equipo.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología. En especial al equipo del que entré a formar parte al incorporarme: Sara, Sergio, Emilia. Sara, tu entusiasmo fuera de serie siempre es contagioso, la ciencia debe mucho a investigadores como tú. Gracias por animarme tantas horas tediosas de laboratorio, por tu compañerismo durante tantos años y empujarme siempre a creer en mí. Sergio, “el método”, de tu mano me convertí en iniciado del ritual del rigor experimental, imprescindible en esta ciencia. Gracias por contagiarme siempre tu curiosidad escrupulosa. Emilia, la sonrisa del laboratorio, gracias por hacernos reír tanto, y por prestar siempre ayuda desinteresada. Vosotros tres me enseñasteis el trabajo en equipo.

A todos los profesores del departamento, Teresa, Arturo, Pedro y José Luis. Por estar dispuestos siempre a asistir ante cualquier problema académico o científico. A Narci, por recordarme que existía vida tras las paredes del laboratorio, a David, por tu perenne y paciente ayuda logística, a Berenice, compañera en todo y para todo, a Juana Mari, incansable trabajadora, a Maria José y sus reactores, la tercera pata de Chromohalobacter en Murcia, a Juampedro, “ha sido divertido”, a Paula, Cristina, Ángel, Ana Belén, Corina, Mariajo, Lali y una infinidad de TFM, TFG, erasmus de cada esquina del mundo, alumnos internos, todo ese “turnover” que renovaba el aire en el departamento.

Y gracias a Ana y Julia, el relevo. El laboratorio ahora es un lugar aún mejor.

A la asistencia y paciencia de los miembros del equipo de Instrumentación Científica del SAI: Diego, Ana, Maria José y Lola. Sin vuestro “expertise” en RMN y HPLC esta Tesis cabría en un Post-it.

Y en la vida del más allá de la Universidad, en el mundo, gracias a toda mi familia. Gracias por vuestro respaldo y confianza. A mi madre, por seguir con tanto interés, (a veces demasiado), todos los avatares de esta Tesis, y por creer en mí. Y al clan Hernández: gracias, Manuela, sin tu asistencia yo podría llegar a doctor. Inma, quiero otra doctora en la familia. Elena, por tu cariño infinito. A mis abuelos, que inocularon el gusanillo académico en la familia. A mi padre, Marisol, Ángel, Elena y a primos, tíos, y a todos los que preguntan “¿pero aún sigues con eso?”

A Marcos, una parte de esta Tesis es tuya por derecho. A Encarni, 14 años de alegrías y dolores de cabeza académicos, científicos y personales compartidos, y que sean muchos más. A Aurora (para tú) y Mariola, por hacerme tanto de reír. A José David, por ser mi azote, siempre con cariño. A Urška, *mala punca*, por tu ilusión e interés desde la distancia, aunque no entendieras ni media letra. A Mariano, que seguro que no se lo cree. A Alfonso, Marcell y tantos que me animasteis a empezar este camino. A Sandra, Paloma, Pedro, Cris, Álex, Teresa, Mavi, Milagros, Paola, Andrés, Laurie, Dani, Theor..... y el resto de teatreros, por alegrarme tanto el último año de Tesis, sois una “terapia” barata y efectiva! Y a José Ángel, porque sí. Y puestos así no terminaría, así que a todos los que me dejo, que son muchos, que me hayan apoyado de una u otra forma.

# RESUMEN

## Introducción

Los organismos procariotas halófilos son capaces de prosperar en entornos con altas concentraciones de sal. Estos se pueden clasificar en dos categorías generales, estando por un lado aquellos que acumulan en el citoplasma iones inorgánicos para compensar la osmolaridad externa (principalmente arqueas y bacterias anaerobias), y los que acumulan solutos compatibles en el interior celular (Brown, 1990; Oren, 2002). Entre estos últimos se encuentra *Chromohalobacter salexigens*. Se trata de una bacteria halófila y halotolerante capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones salinas. *C. salexigens* acumula como solutos compatibles mayoritarios ectoína e hidroxiectoína (Arahal *et al.*, 2001). En las últimas décadas estas sustancias han cobrado un gran interés, lo que ha provocado la aparición de métodos biotecnológicos para su producción industrial, tales como el ordeñado bacteriano (Sauer y Galinski, 1998). Este interés se debe a las aplicaciones biomédicas, cosméticas y biotecnológicas de las ectoínas y a la dificultad de establecer un proceso de síntesis química asequible (Lippert y Galinski, 1992; da Costa *et al.*, 1998; Lentzen y Schwarz, 2006).

El conocimiento detallado del metabolismo celular es de vital importancia para el desarrollo de estrategias de mejora de cepas, mediante ingeniería genética y metabólica, que permitan diseñar procesos de producción biotecnológicos más eficientes. Actualmente, el conocimiento que se tiene del metabolismo de *C. salexigens* es parcial, basado principalmente en la información disponible en su anotación genómica (Ates *et al.*, 2011; Copeland *et al.*, 2011) y en resultados de diversos estudios ómicos (Salvador, 2014). Además de esto, es necesaria una aproximación experimental que ayude a complementar, corregir o apoyar esta información. Con todo esto se busca en última instancia un conocimiento global más profundo del metabolismo de *C. salexigens*, y con ello posiblemente ayudar a superar la carencia de un microorganismo modelo de metabolismo de la osmoadaptación, al modo de *Escherichia coli* como modelo de bacteria mesófila.

## Objetivos

Los objetivos que motivaron esta Tesis Doctoral fueron la obtención de evidencias experimentales de los rasgos más importantes del metabolismo central y de ectoínas de *C. salexigens*, su relación con la osmoadaptación y el mantenimiento de la homeostasis celular, y la aplicación de este conocimiento a la optimización de las estrategias de cultivo para la producción de ectoínas. Estos objetivos se plantearon con la siguiente secuencia de objetivos

parciales: i) Esbozar de una imagen general de la red metabólica basándose en la información genética y metabólica disponible en las bases de datos, ii) aplicar de esta imagen en el diseño de trabajos experimentales con *C. salexigens* y obtener pruebas de las principales rutas metabólicas del carbono y el nitrógeno, iii) racionalizar el conocimiento obtenido en estos resultados y aplicarlos en la mejora de estrategias de cultivo para producción de ectoínas y iv) analizar e identificar las diferentes rutas de consumo de varias fuentes de carbono y analizar sus diferencias e implicaciones en relación con la osmoadaptación.

## **Resultados y discusión**

En el Capítulo I de la Tesis se introduce el papel de las ectoínas dentro de los diferentes solutos compatibles empleados de forma natural por los organismos halófilos. Se expone el conocimiento que se tiene de sus rutas de síntesis y degradación en los microorganismos que las sintetizan y/o acumulan. Se enumeran las diferentes aplicaciones de interés industrial, biológico y médico que se han ido descubriendo, así como las que están en fase de desarrollo y se discuten los mecanismos fisicoquímicos de sus efectos sobre macromoléculas biológicas y células. Por último, se detalla el estado del arte en los métodos y estrategias de producción biotecnológica industrial de ectoínas, y las perspectivas de las nuevas estrategias de mejora de estos métodos.

En el Capítulo III se aborda el primer estudio conjunto *in silico* y experimental del metabolismo central de *C. salexigens*. Del estudio de la información disponible en el momento en la anotación genómica de *C. salexigens* surge una imagen general de las posibles rutas de su metabolismo de carbono y central, y de síntesis de ectoínas (Figura III.3). Mediante la aplicación de diversas técnicas analíticas, como HPLC, RMN y espectrometría de masas se confirma un rasgo central del metabolismo de *C. salexigens*: la presencia de un metabolismo *overflow* a baja salinidad (excreción de piruvato y acetato), que conlleva una menor eficiencia en el consumo de la fuente de carbono y la síntesis de biomasa. Los estudios de rastreo de marcaje con glucosa marcada isotópicamente mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN, junto con técnicas espectrofotométricas de medida de actividades enzimáticas completan la imagen general del metabolismo, arrojando dos resultados principales: i) *C. salexigens* carece aparentemente de la enzima Pfk, lo que le impide metabolizar la glucosa mediante la glucólisis, y emplea en su lugar la ruta de Entner-Doudoroff (ED) como vía principal y ii) existe un alto nivel de anaplerosis y una rigidez en la distribución de flujos del metabolismo central que se mantiene independientemente del nivel de la demanda biosintética impuesta por la salinidad exterior. Esta rigidez puede ser una de las causas de la menor eficacia del metabolismo a baja salinidad y consecuencia de la necesidad primaria de osmoadaptación del microorganismo. Por su parte, la elección de la ruta de ED como

vía principal para la metabolización de la glucosa junto con los altos niveles de anaplerosis, aparecen como posibles estrategias desarrolladas por *C. salexigens* para satisfacer la demanda biosintética en forma de NADPH que exige la síntesis de ectoínas.

En el Capítulo IV se aborda el análisis de la interrelación entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno. Se comprueba cómo la proporción C/N en el medio de cultivo afecta a la eficiencia metabólica de *C. salexigens*, afectando especialmente al metabolismo *overflow* y al rendimiento de la síntesis de ectoínas. La información obtenida del estudio permite optimizar el diseño de las condiciones de cultivo (composición y modo de operación). Se analiza por primera vez el perfil metabólico de una cepa de *C. salexigens* deficiente en la síntesis de ectoínas (*C. salexigens* CHR62), y se ensayan diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas en ambas cepas, CHR61 y CHR62, incluyendo la ectoína, que actúa como fuente de carbono y nitrógeno. Finalmente, se aplica el conocimiento obtenido para diseñar una estrategia de alimentación optimizada en cultivos “*fed-batch*” de *C. salexigens*. El análisis de los resultados revela tres hechos principales: i) una proporción alta de C/N produce una menor eficiencia metabólica en forma de mayor metabolismo *overflow*, mientras que la presencia de ectoína como fuente de carbono y nitrógeno en el medio reduce esta ineficiencia, ii) la eficacia en la síntesis de ectoínas es mayor cuando el medio es pobre en fuentes de C y N, y iii) los flujos relativos del metabolismo central, no se ven afectados por la composición del medio en términos de C y N, lo que vuelve a poner de manifiesto la rigidez del metabolismo central. Estos resultados apuntan a que *C. salexigens* ha evolucionado de forma que su metabolismo prioriza la adaptación por un lado al crecimiento en altas concentraciones de sal y a una disponibilidad de nutrientes limitada.

En el Capítulo V, se aborda en mayor profundidad el estudio de las rutas de catabolización de la fuente de carbono, comparando dos de las más importantes, glucosa y fructosa. A partir de la información genómica se preveían dos rutas posibles para el metabolismo de la fructosa: la ruta de Entner-Doudoroff y la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas. El crecimiento en fructosa resultó más eficiente que en glucosa, especialmente a bajas salinidades, donde no se observó metabolismo *overflow*, y se alcanzaron mayores niveles de biomasa. Los estudios de <sup>13</sup>C-RMN confirmaron la contribución de ambas rutas en la síntesis de ectoínas, estimándose de un 85% para ED y un 15% para EMP, independientemente de la concentración de sal. Se confirmó la presencia de varias enzimas de ambas rutas mediante aplicación de las técnicas de <sup>31</sup>P-RMN y RT-PCR. Estas técnicas también ayudaron a confirmar la carencia de actividad Pfk detectable. Además, se clonaron por primera vez genes de *C. salexigens* no relacionados con el metabolismo de las ectoínas en *E. coli*. Los genes de estas proteínas presentaron mayores niveles de expresión al crecer en fructosa que en glucosa. Se pudo confirmar mediante métodos

espectrofotométricos la actividad que se les atribuía a dos de estas proteínas: 1-fosfofructoquinasa (1Pfk) a *csal2647* y fructoquinasa (Frk) a *csal0931*, representantes de las rutas de EMP y ED, respectivamente, mientras que no se consiguió asignar una actividad a la enzima codificada por *Csal0639*. El resultado principal de este capítulo fue la confirmación de que *C. salexigens* dispone de una ruta glucolítica para el crecimiento en fructosa. Esto hace al metabolismo en fructosa más eficiente, posiblemente debido a la diferencia en el rendimiento energético y redox de ambas rutas. El caso de *C. salexigens* es similar al de *P. putida*, que presenta un esquema similar para la metabolización de la fructosa. En ambas especies, la disponibilidad de más de una ruta para la metabolización de la fuente carbono, con diferentes rendimientos energéticos y redox, supone una ventaja importante para la adaptación a un entorno que exige una alta producción de cofactores reducidos.

El conjunto de todos estos resultados indica que las condiciones ambientales imponen a *C. salexigens* dos limitaciones principales: por un lado una gran demanda biosintética para síntesis de solutos compatibles, a la que se ha adaptado mediante el desarrollo de una rigidez metabólica que sacrifica ciertos aspectos como la eficiencia del consumo de la fuente de carbono; por otro lado la probable escasez de nutrientes del medio, a la que la misma rigidez metabólica de *C. salexigens* parece suponer también una adaptación, ya que hace el metabolismo más eficiente en la producción de ectoínas cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada.

Para poder poner en contexto toda esta información es necesario conocer mejor el papel ecológico que juega *C. salexigens* en su medio natural, para evaluar hasta qué punto las limitaciones que suponen la rigidez metabólica, la carencia de glucólisis para metabolización de la glucosa, la rápida oxidación de la glucosa (aparentemente no regulada) y la presencia de *overflow*, son tales o han aparecido como adaptaciones que la hacen más competitiva en su hábitat, o que ayuden al mantenimiento del ecosistema del que forma parte.

Además, también es necesaria la integración de estos resultados para el desarrollo de modelos del metabolismo de *C. salexigens* mediante técnicas de FBA o MFA que ayuden al diseño de cepas mejoradas por ingeniería metabólica, y a una comprensión más profunda de la interrelación entre las características descritas por los resultados.

## **Conclusiones**

- La ruta empleada para la asimilación de la glucosa es la ruta de ED, mientras que la glucólisis no es funcional debido a la carencia de la enzima Pfk. Esta elección podría ser el resultado de una adaptación a la gran demanda biosintética de las ectoínas.
- *C. salexigens* posee un metabolismo central del carbono rígido, reflejado por unas ratios de flujo del nodo del piruvato-acetil coenzima A-oxalacetato que no varían con

la salinidad, ni con la proporción C/N en el medio de crecimiento. Esta rigidez hace el metabolismo menos eficiente en medios pobres en fuente de nitrógeno y con baja salinidad.

- Las condiciones en las que el metabolismo es menos eficiente se reflejan en un menor crecimiento, y la aparición de metabolismo *overflow* (excreción de ácidos orgánicos).
- *C. salexigens* metaboliza la fructosa mediante dos rutas alternativas, las rutas de ED y EMP. La primera de ellas es mayoritaria, debido a sus altas necesidades de cofactores reducidos. La disponibilidad adicional de la ruta de EMP hace al metabolismo en fructosa más eficiente que en glucosa, lo que se traduce en ausencia de *overflow* en fructosa, y mayor síntesis de biomasa.

### **Bibliografía**

Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J., y Ventosa, A. (2001) *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.

Ates, O., Oner, E.T., y Arga, K.Y. (2011) Genome-scale reconstruction of metabolic network for a halophilic extremophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. *BMC Syst Biol* **5**: 12.

Brown, A.D. (1990) *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, .

Copeland, A., O'Connor, K., Lucas, S., Lapidus, A., Berry, K.W., Detter, J.C., et al. (2011) Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11(T)). *Stand Genomic Sci* **5**: 379-88.

Costa, M.S. da, Santos, H., y Galinski, E.A. (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-53.

Lentzen, G., y Schwarz, T. (2006) Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 623-34.

Lippert, K., y Galinski, E. (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 61-65.

Oren, A. (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 56-63.

Salvador, M. (2014) Análisis multi-ómico de la respuesta a estrés osmótico y térmico de la bacteria extremófila *Chromohalobacter salexigens*. .

Sauer, T., y Galinski, E. (1998) Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* **59**: 128.



# Índice

<b>Resumen</b>	i
<b>Índice</b>	vii
<b>Capítulo I: Las ectoínas y la protección celular frente al estrés: usos y producción biotecnológica</b>	1
Resumen	3
Introducción: las ectoínas como solutos compatibles	4
Importancia y usos de las ectoínas	17
Procesos de producción de ectoínas	31
Sistemas de producción	39
Perspectivas	45
Conclusiones	46
Bibliografía	47
<b>Capítulo II: Objetivos</b>	61
<b>Capítulo III: La relación entre metabolismo central y osmoadaptación en <i>Chromohalobacter salexigens</i></b>	65
Resumen	67
Introducción	68
Materiales y métodos	70
Resultados	74
Discusión	92
Conclusiones	95
Bibliografía	96
<b>Capítulo IV: La influencia de la composición del medio sobre la producción de ectoínas y metabolismo <i>overflow</i> en <i>Chromohalobacter salexigens</i>: hacia el cultivo en alta densidad</b>	101
Resumen	103
Introducción	104
Materiales y métodos	107
Resultados y discusión	110
Conclusiones	122
Bibliografía	123
<b>Capítulo V: Metabolismo de fructosa en <i>Chromohalobacter salexigens</i>: interacción entre las rutas de Embden-Meyerhof-Parnas y Entner-Doudoroff</b>	125
Resumen	127
Introducción	128
Materiales y métodos	130
Resultados	137
Discusión	150
Conclusiones	153
Bibliografía	155
<b>Capítulo VI: Discusión final y conclusiones</b>	159
Introducción	161
Discusión	164
Conclusiones	168
Bibliografía	170
<b>Anexo I</b>	173
<b>Anexo II</b>	213



# CAPÍTULO I

## Las ectoínas y la protección celular frente al estrés: usos y producción biotecnológica

*Este capítulo es una adaptación del siguiente trabajo:*

Pastor J M, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka L N, Iborra J L, Vargas C, Nieto J J, Cánovas M.

*"Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production"*

Biotechnology Advances 2010;28:782.



**RESUMEN**

Los microorganismos producen y acumulan solutos compatibles con el objetivo de protegerse a sí mismos de presiones ambientales. Entre ellos, las ectoínas (muy extendidas en la naturaleza) están recibiendo una atención creciente por parte de la comunidad científica debido a sus múltiples aplicaciones. De hecho, el incremento de la demanda comercial ha llevado a la multiplicación de intentos de mejora de sus procesos de producción. En esta revisión, se analiza la importancia de las aplicaciones actuales y potenciales de las ectoínas como agentes protectores de macromoléculas, células y tejidos, así como su potencial como agentes terapéuticos en ciertas enfermedades, y se discuten las teorías actuales para la comprensión de las bases moleculares de su actividad biológica. Se describen los condicionantes genéticos, bioquímicos y ambientales de la biosíntesis de ectoínas mediante cepas productoras naturales y mejoradas. Se discuten las principales limitaciones de los bioprocesos empleados actualmente en la producción de ectoínas, haciendo énfasis en los diferentes microorganismos, ambientes, estrategias de ingeniería molecular y de fermentación empleados para optimizar la producción y recuperación de las ectoínas. Se explica además cómo la aplicación combinada de estrategias de ingeniería metabólica y de bioprocesos permite una comprensión más profunda de los factores principales que controlan el proceso de producción. Para terminar, esta revisión aspira a recopilar y actualizar el estado del arte en usos y aplicaciones de las ectoínas y de la producción a partir de bacterias a escala industrial, haciendo énfasis en la importancia del diseño del reactor y las estrategias de operación, junto con los aspectos de ingeniería metabólica y la necesidad de retroalimentación entre los resultados *in silico* y experimentales para la optimización de la bioproducción.

## INTRODUCCIÓN: LAS ECTOÍNAS COMO SOLUTOS COMPATIBLES

Los microorganismos halófilos que viven en hábitats con una fuerza iónica alta se enfrentan al estrés hiperosmótico cambiando la composición de sus lípidos de membrana y regulando la concentración intracelular de solutos de bajo peso molecular. Como resultado de este último tipo de respuesta, las células son capaces de mantener un adecuado equilibrio osmótico en condiciones de estrés hipersalino, lo que resulta crítico para evitar que la célula pierda agua, y se produzcan una deshidratación y plasmólisis irreversibles y para generar una turgencia dentro de los límites necesarios para el crecimiento (Brown, 1990; Roesser y Müller, 2001). Las células usan diferentes estrategias para la regulación de su osmolaridad interna. Una de ellas consiste en la acumulación de sales inorgánicas, principalmente KCl, para contrabalancear la salinidad externa. Esta estrategia es la adoptada por las haloarqueas halófilas extremas, bacterias aerobias halófilas moderadas del orden *Haloanaerobiales* y la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Oren, 1999; Oren *et al.*, 2002; Roberts, 2004). Dado que las enzimas y orgánulos de los organismos que aplican esta estrategia se ven obligados a trabajar en ambientes con una fuerza iónica alta, han evolucionado hasta desarrollar un número de grandes cambios para hacer posible la vida bajo estas condiciones extremas. El mayor de todos esos cambios adaptativos es que las enzimas de los organismos acumuladores de KCl son mucho más ácidas que las correspondientes proteínas ortólogas de organismos mesófilos (Lanyi, 1974; Dennis y Shimmin, 1997). Esta adaptación, sin embargo, no resulta útil para la colonización de hábitats de salinidad baja o moderada dado que siempre es necesaria una concentración intracelular de sal alta para que el plegamiento y la actividad de las enzimas sean los correctos. Otra estrategia, más versátil, es la acumulación de “solutos compatibles”, que son moléculas orgánicas sintetizadas en masa en el citoplasma, por lo general muy solubles, de bajo peso molecular, la mayor parte de ellas o bien sin carga o de naturaleza zwitteriónica. Estas moléculas proveen un equilibrio osmótico sin interferir en los procesos normales del metabolismo, y dado que no tienen un gran efecto en la fuerza iónica, no se requiere una adaptación especial de los sistemas intracelulares (enzimas y orgánulos) (Brown, 1990; Oren, 1999). El nivel de acumulación de solutos compatibles lo determina la osmolaridad del entorno (Poolman y Glaasker, 1998). Tras un choque hipoosmótico, las células pueden reestablecer su equilibrio osmótico liberando los osmolitos a través de sistemas específicos de evacuación, que son canales mecanosensibles diferentes de los sistemas de captación (Morbach y Krämer, 2002). Así, esta estrategia capacita a los organismos para una rápida adaptación a un ambiente osmóticamente cambiante ajustando simplemente las reservas internas de solutos para contrarrestar la osmolaridad del ambiente. Por este motivo, esta estrategia de osmoadaptación está muy extendida en la naturaleza, no sólo en bacterias (Ventosa

*et al.*, 1998) y algunas arqueas (Roesser y Müller, 2001), sino también en eucariotas, incluyendo células de hongos, de plantas y de animales (Yancey, 2005; Burg y Ferraris, 2008).

Los solutos compatibles se distribuyen entre unas pocas clases estructurales como azúcares (trehalosa, sacarosa), polioles (glicerol, sorbitol, manitol,  $\alpha$ -glucosilglicerol, manosilglicerol, y manosilgliceramida), diaminoácidos N-acetilados (como N-acetilglutaminilglutamina), betaínas (como glicina betaína y derivados), aminoácidos (prolina, glutamato, glutamina y alanina) y derivados. El último grupo incluye las ectoínas (ectoína e hidroxiectoína). Se ha demostrado que la mayor parte de las bacterias utiliza una gama de diferentes solutos para alcanzar el equilibrio osmótico, dependiendo principalmente de la duración del estrés osmótico, el nivel de salinidad, la disponibilidad de sustratos y osmolitos en el entorno o la fuente de carbono usada en el medio de crecimiento (Roberts, 2005).

### **Microorganismos productores de ectoínas, rutas biosintéticas y regulación**

La capacidad de sintetizar ectoínas está más extendida entre  $\alpha$ - y  $\gamma$ -*Proteobacteria* y *Actinobacteridae*, aunque se ha observado también en un número menor de  $\beta$ -,  $\delta$ - y  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, *Firmicutes* y un *Plantomycete* (Tabla I.1).

La ectoína puede considerarse un aminoácido heterocíclico o como un derivado parcialmente hidrogenado de la pirimidina (ácido 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-primimidincarboxílico) (Galinski *et al.*, 1985) (Figura I.1). Fue descubierto en la bacteria halófila extrema y fotótrofa *Halorhodospira halochloris* (anteriormente *Ectothiorhodospira halochloris*) y caracterizada mediante espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN, espectrometría de masas y espectroscopía infrarroja (Galinski *et al.*, 1985). Esta bacteria es capaz de crecer en concentraciones de NaCl de hasta 5 M (Raymond y Siström, 1969), lo que hace la acumulación del soluto compatible obligatoria para la supervivencia. Los principales solutos compatibles producidos fueron glicinbetaína o trehalosa (dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno), aunque también se sintetizaba ectoína en la fase exponencial de crecimiento. La ectoína es uno de los solutos compatibles más ampliamente extendidos entre los microorganismos halotolerantes y halófilos, desde las bacterias fotosintéticas del género *Halorhodospira* a bacterias quimioheterótrofas, incluyendo  $\gamma$ -proteobacterias de los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Marinobacter* (Roberts, 2005), actinobacterias, incluyendo miembros de los géneros *Brevibacterium* y *Streptomyces*, firmicutes, incluyendo varias especies del género *Bacillus* y de géneros estrechamente relacionados con éste, como *Virgibacillus*, *Salibacillus* o *Halobacillus*

(Malin y Lapidot, 1996; Kuhlmann y Bremer, 2002), y *Marinococcus halophilus* (Louis y Galinski, 1997), entre otros acumuladores de ectoínas (Tabla I.1).

La hidroxiectoína fue descubierta en el productor de actinomicina D *Streptomyces parvulus* (Inbar y Lapidot, 1988). Este soluto compatible es más común entre bacterias halotolerantes/halófilas Gram positivas, incluyendo *Nocardiosis sp.*, *Streptomyces griseolus*, *Brevibacterium linens* o *M. halophilus* (Severin *et al.*, 1992; Frings *et al.*, 1995), pero a menudo se sintetiza junto con ectoína en menores cantidades en muchas otras especies productoras de ectoínas (Tabla I.1). A pesar de ser químicamente casi idéntica a la ectoína, la hidroxiectoína parece conferir propiedades protectoras adicionales, derivadas de su naturaleza hidroxilada. Así, mientras que la principal función de la ectoína es servir como osmoprotector, la hidroxiectoína parece además jugar un papel importante en la protección frente al estrés por calor. Por ejemplo, *Halomonas elongata*, *Chromohalobacter salexigens* y *Streptomyces griseus* acumulan hidroxiectoína en respuesta a una subida de temperatura, y un mutante de *C. salexigens* privado de la principal ectoína hidroxilasa (la enzima que transforma ectoína en hidroxiectoína) es termosensible, lo que supone una prueba de que la hidroxiectoína funciona como termoprotector *in vivo* (Wohlfarth *et al.*, 1990; Malin y Lapidot, 1996; García-Esteva, Argandoña, *et al.*, 2006). Esta propiedad favoreció la emergencia de procesos industriales centrados específicamente en la producción de hidroxiectoína (Frings *et al.*, 1995; Schiraldi *et al.*, 2006).

La ruta biosintética de las ectoínas fue estudiada y establecida desde el punto de vista bioquímico en *H. halochloris*, *H. elongata* DSM 2581 (Peters y Galinski, 1990) y *H. elongata* DSM 3043 (Cánovas *et al.*, 1998). Esta última cepa, junto con *H. elongata* ATCC 33174, fueron reclasificadas en el género *Chromohalobacter*, como la nueva especie *C. salexigens* DSM 3043 y ATCC 33174 (Arahal *et al.*, 2001). Por claridad, todas ellas serán referidas como *C. salexigens* a lo largo de esta revisión, con el fin de diferenciarlas del resto de cepas de *H. elongata*, que no fueron reclasificadas. La ruta biosintética de las ectoínas comienza con la fosforilación de L-aspartato y comparte los primeros dos pasos enzimáticos con la biosíntesis de aminoácidos de la familia del aspartato: la conversión del L-aspartato en L-aspartilfosfato por la aspartato quinasa (Ask), y la síntesis de L-aspartato- $\beta$ -semialdehído a partir de L-aspartilfosfato, catalizado por la L-aspartato- $\beta$ -semialdehído deshidrogenasa (Asd). A partir de este intermediario general, la ruta específica de la biosíntesis de ectoínas tiene lugar en tres pasos. Primero, el L-aspartato- $\beta$ -semialdehído se convierte en ácido L-diaminobutírico (por acción de la enzima ácido L-diaminobutírico transaminasa, EctB o ThpB), y posteriormente se acetila a ácido N-g-acetildiamoniobutírico (NADA) por acción de la enzima ácido L-diaminobutírico acetil transferasa (EctA o ThpA). Finalmente, la condensación cíclica del NADA lleva a la formación de ectoína a través de la

actividad de la enzima ectoína sintasa (EctC o ThpC) (Figura I.2). La principal ruta de síntesis de hidroxiectoína implica la hidroxilación de la ectoína por la ectoína hidroxilasa (EctD o ThpD), que ha sido caracterizada en *C. salexigens* y *Streptomyces chrysomallus* (Grammel, 2000; García-Estepa, Argandoña, *et al.*, 2006) (Figura I.2).

Además, se ha propuesto una ruta secundaria para la síntesis de hidroxiectoína en *C. salexigens* sin la implicación de la ectoína, partiendo del precursor de ectoína NADA (Figura I.2). Sin embargo, la(s) primera(s), enzima(s) para esta ruta alternativa parece tener muy poca afinidad por el NADA, ya que un mutante *ectC*, afectado en el gen codificante de ectoína sintasa, acumula grandes cantidades del precursor de la ectoína. Este hecho sugiere que o bien la(s) enzima(s) de la ruta alternativa para síntesis de hidroxiectoína hidroxilan NADA de forma inespecífica, o que la ruta alternativa funciona bajo condiciones ambientales diferentes a las ensayadas hasta ahora (Cánovas *et al.*, 1999).

Se han identificado genes que codifican las enzimas para la síntesis de ectoínas en 50 genomas bacterianos y en una arquea, *Nitrosopumilus maritimus* (Lo *et al.*, 2009). En estos organismos, los genes *ectABC* se organizan generalmente en forma de operón, pero existen raras excepciones (hasta el momento) reseñables. Por ejemplo, la  $\gamma$ -proteobacteria *Nitrosococcus oceani* porta *ectABD* y *ectCask* (donde *ask* codifica para aspartato quinasa) en dos unidades transcripcionales separadas. La  $\alpha$ -proteobacteria *Marinobacter aquaeolei* es una excepción, llevando *ectABask* en una unidad transcripcional, tres copias de *ectC* y dos copias de *ectD*, todas repartidas a lo largo del cromosoma. La redundancia de *ectD* ocurre también en la  $\gamma$ -proteobacteria *C. salexigens*, que porta dos copias funcionales de *ectD* (Vargas *et al.*, 2008). En un subgrupo de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -*Proteobacteria* existe un gen que codifica para un supuesto regulador transcripcional (*ectR*), aguas arriba de *ectA*, que se transcribe en la misma dirección que *ectABC* en  $\beta$ -*Proteobacteria*, y en la dirección opuesta en  $\alpha$ - y  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Lo *et al.*, 2009). En  $\alpha$ -,  $\beta$ -*Proteobacteria*, *Actinobacteridae*, un subgrupo de *Firmicutes* y en *N. maritimus*, el gen *ectD* sigue a los genes *ectABC* como parte del mismo operón. Esta organización también puede encontrarse en algunas  $\gamma$ -proteobacterias, pero en cierto número de miembros de esta subdivisión, incluyendo *C. salexigens*, *ectD* aparece distante del operón *ectABC*. Finalmente, en  $\alpha$ -*Proteobacteria* y algunos miembros de  $\gamma$ - y  $\delta$ -*Proteobacteria*, el gen *ask* se sitúa inmediatamente aguas abajo del operón *ectABC(D)*, con el que se contrascribe. La posición en el cromosoma del gen *ask* sugiere que podría regularse transcripcionalmente junto con los genes *ectABC(D)* (Lo *et al.*, 2009).

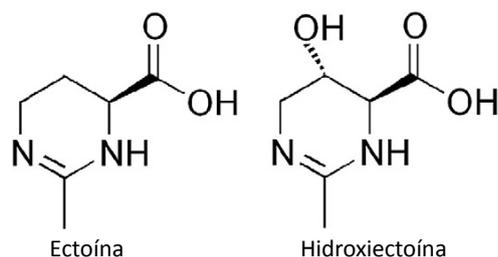
**Tabla I.1.** Productores microbianos de ectoínas: cepas y condiciones.

Microorganismo	Solutos Compatibles	Concentración de sal	Fuente de carbono	Referencia
<b>Actinobacterias</b>				
<i>Brevibacterium epidermis</i> DSM 20659	Ectoína	1 M (0 M para el choque hipoosmótico)	Glutamato monosódico + extracto de levadura	(Onraedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Brevibacterium linens</i>	Ectoína	1 M	L-glutamato (la síntesis <i>de novo</i> fue la forma de producción principal)	(Bernard y Jebbar, 1992)
<i>Brevibacterium</i> sp. JCM 6894	Ectoína	2 M (choque hiperosmótico)	Glucosa + extracto de levadura + polipeptona	(Nagata y Wang, 2001)
<i>Kocuria varians</i> CCM3316	Ectoína, betaína, trehalosa, hidroxietoína	1,71 M	Extracto de levadura	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Nesterenkonia halobia</i> DSM 20541 <sup>T</sup>	Ectoína, betaína, trehalosa, hidroxietoína	1,71 M	Extracto de levadura	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Nocardiopsis</i> sp. A5-1	Ectoína, hidroxietoína, trehalosa	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2)	Ectoína, hidroxietoína	0,5 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2008)
<i>Streptomyces griseolus</i> DSM 40067 <sup>T</sup>	Hidroxietoína, betaína, trehalosa	0,86 M	Extracto de levadura	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<b>Firmicutes</b>				
<i>Bacillus alcalophilus</i> DSM 485 <sup>T</sup>	Ectoína, glutamato	1 M	Glucosa + sesquicarbonato de Na + aminoácidos y vitaminas	(Kuhlmann y Bremer, 2002)
<i>Bacillus agaradhaerens</i> DSM 8721 <sup>T</sup>	Glutamato, ectoína, $\beta$ -glutamato	1,3 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus clarkii</i> DSM 8720 <sup>T</sup>	Glutamato, ectoína, hidroxietoína, $\beta$ -glutamato	1,8 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus halodurans</i> DSM 497 <sup>T</sup>	Glutamato, ectoína, $\beta$ -glutamato	1,6 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus mojavenis</i> DSM9205 <sup>T</sup>	Glutamato, prolina, ectoína	1,5 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus pseudoalcaliphilus</i> DSM 8725 <sup>T</sup>	Glutamato, ectoína	1 M	Glucosa + sesquicarbonato de Na	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715 <sup>T</sup>	Glutamato, prolina, ectoína, alanina	1,6 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)
<i>Gracilibacillus halotolerans</i> DSM 11805 <sup>T</sup>	Glutamato, ectoína, hidroxietoína	2 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)

Microorganismo	Solutos compatibles <sup>0</sup>	Concentración de sal	Fuente de carbono	Referencia
<b>Firmicutes</b>				
<i>Halobacillus halophilus</i> DSMZ 2266 <sup>T</sup>	Ectoína, prolina, glutamato, glutamina	Gradiente ascendente 0,4-3 M	Glucosa + vitaminas	(Saum y Müller, 2008)
<i>Halobacillus trueperi</i> DSM 10404 <sup>T</sup>	Glutamato, ectoína, hidroxiectoína, N-ε-acetil lisina	2,5 M	Glucosa + vitaminas + elementos traza + aminoácidos	(Bursy <i>et al.</i> , 2007)
<i>Marinococcus halophilus</i> DSM 20408 <sup>T</sup>	Ectoína, hidroxiectoína	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Marinococcus</i> sp. M52	Hidroxiectoína	1,54 M	Peptona de pescado	(Schiraldi <i>et al.</i> , 2006)
	Hidroxiectoína, ectoína	1,54 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
	Hidroxiectoína, ectoína, glutamato	1,71 M	Glucosa + peptone de pescado	(Frings <i>et al.</i> , 1995)
<i>Salimicrobium albus</i> DSM 20748 <sup>T</sup>	Ectoína, alanina, hidroxiectoína	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Sporosarcina pasteurii</i> DSM 33 <sup>T</sup>	Ectoína, glutamato	0,68 M (sacarosa)	Glucosa + urea + aminoácidos y vitaminas	(Kuhlmann y Bremer, 2002)
<i>Sporosarcina psychrophila</i> DSM 3 <sup>T</sup>	Ectoína, glutamato	1 M	Glucosa + aminoácidos y vitaminas	(Kuhlmann y Bremer, 2002)
<i>Virgibacillus marismortui</i> DSM 12325 <sup>T</sup>	Glutamato, ectoína, hidroxiectoína	1,8 M	Glucosa	(Bursy <i>et al.</i> , 2008)
<i>Virgibacillus pantothenicus</i> DMS 26	Ectoína, glutamato, hidroxiectoína	1 M	Glucosa + aminoácidos y vitaminas	(Kuhlmann y Bremer, 2002)
<i>Virgibacillus salexigens</i> DSM 11438	Ectoína, glutamato	3,4 M	Glucosa + aminoácidos y vitaminas	(Kuhlmann y Bremer, 2002)
<b>Proteobacterias</b>				
<b>α-Proteobacterias</b>				
<i>Rhodovibrio salinarum</i> BN 40	Betaína, ectoína	3,42	Medio fotótrofo	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Rhodovibrio sulfidophilum</i> DSM 1374 <sup>T</sup>	Ectoína	1,71 M	Medio fotótrofo	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<b>γ-Proteobacterias</b>				
<i>Chromohalobacter marismortui</i> ATCC 17056	Ectoína, betaína	1,71 M	Extracto de levaduras	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043 <sup>T</sup>	Ectoína, hidroxiectoína, glutamato, glutamine	3 M	Glucosa	(Canovas <i>et al.</i> , 1997)
	Ectoína, hidroxiectoína, glutamato, trehalosa, NADA	2,5 M	Glucosa	(García-Esteba, Cánovas, <i>et al.</i> , 2006)
<i>Halomonas boliviensis</i> DSM 15516 <sup>T</sup>	Ectoína, hidroxiectoína	2,58 M	Glucosa + glutamato	(Guzmán <i>et al.</i> , 2009)
<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597	Ectoína, hidroxiectoína, glicina betaína	Gradiente ascendente 0-3 M	Glucosa + extracto de levadura + elementos traza	(Aston y Peyton, 2007)

Microorganismo	Solutos compatibles	Concentración de sal	Fuente de carbono	Referencia
<b>Proteobacterias</b>				
<i>γ-Proteobacterias</i>				
<i>Halomonas campisalis</i> ATCC 700597	Ectoína, hidroxiectoína, glicina betaína	Gradiente ascendente 0-3 M	Glucosa + nitrato de Na + elementos traza	(Aston y Peyton, 2007)
<i>Halomonas elongata</i> ATCC 33173 <sup>T</sup>	Ectoína, glutamato, glicina betaína, alanina, hidroxiectoína	1,3-1,7-4,3 M	Glucosa	(Wohlfarth <i>et al.</i> , 1990)
<i>Halomonas elongata</i> DSM 142	Ectoína, hidroxiectoína	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
	Ectoína		Glucosa	(Peters y Galinski, 1990)
	Ectoína, trehalosa, betaína	Gradiente ascendente 0,51-4,28 M	Glucosa	(Maskow y Babel, 2001)
	Ectoína, glutamato, alanina, NADA, hidroxiectoína	2,56 M (medio del cultivo) 0 M (medio hipoosmótico)	Glucosa	(Sauer y Galinski, 1998)
<i>Halomonas elongata</i> K63	Ectoína, alanina, NADA, hidroxiectoína	2,56 M	Glucosa	(Ono <i>et al.</i> , 1998)
<i>Halomonas halophila</i> CCM 2833 <sup>T</sup>	Ectoína, glutamato, alanina	1,71 M	Glucosa	(Wohlfarth <i>et al.</i> , 1990)
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662 <sup>T</sup>	Ectoína, hidroxiectoína	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
	Ectoína, glutamato	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Halomonas halodenitrificans</i> DSM 735 <sup>T</sup>	Ectoína	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Halomonas variabilis</i> DSM 3051 <sup>T</sup>	Hidroxiectoína, betaína, ectoína, trehalosa	1,71 M	Extracto de levadura	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Halorhodospira abdelmalekii</i> DSM 2110 <sup>T</sup>	Betaína, ectoína, trehalosa	3,42 M	Medio fotótrofo	(Wohlfarth <i>et al.</i> , 1990)
<i>Halorhodospira halochloris</i> DSM 1059 <sup>T</sup>	Ectoína		Acetato, bicarbonato (crecimiento fotótrofo)	(Peters y Galinski, 1990)
<i>Halorhodospira halophila</i> DSM 244 <sup>T</sup>	Betaína, ectoína, trehalosa	3,42 M	Medio fotótrofo	(Wohlfarth <i>et al.</i> , 1990)
	Betaína, ectoína, trehalosa	3,42 M	Medio fotótrofo	(Wohlfarth <i>et al.</i> , 1990)
<i>Marinobacter hydrocarbonocalsticus</i>	Ectoína, betaína, glutamato, β-glutamato	1,5 M	Eicosano (única fuente de carbono)	(Fernandez-Linares <i>et al.</i> , 1996)
<i>Pantoea aglomerans</i> CPA-2	Ectoína, glicina betaína	1,2 M	Sacarosa + extracto de levadura	(Cañamás <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 <sup>T</sup>	Betaína, hidroxiectoína, ectoína	1,71 M	Extracto de levadura	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Pseudomonas halosaccharolytica</i> CCM 2851	Ectoína, alanina, hidroxiectoína	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Thioalkalibacter halophilus</i> DSMZ 19224	Ectoína, glicina betaína	3 M	Glucosa	(Banciu <i>et al.</i> , 2008)
<i>Vibrio alginolyticus</i> DSM 2171 <sup>T</sup>	Ectoína, alanina	1,71 M	Glucosa	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Vibrio cholerae</i> O139 cepa MO10	Ectoína	0,5M	Mezcla de aminoácidos	(Pflughoeft <i>et al.</i> , 2003)
<i>Vibrio costicola</i> CCM 2811	Ectoína, betaína	1,71 M	Extracto de levadura	(Severin <i>et al.</i> , 1992)
<i>Vibrio fischeri</i> DSM 507	Ectoína, glutamato, betaína	0,86 M	Complejo	(Schmitz y Galinski, 1996)
<i>Vibrio fischeri</i> DSM 7151	Glutamato, ectoína, betaína	0,86 M	Complejo	(Schmitz y Galinski, 1996)
<i>Vibrio harveyi</i> DSM 2165	Ectoína, GABA, glutamato, alanina	0,86 M	Glicerol	(Schmitz y Galinski, 1996)
<i>Vibrio harveyi</i> DSM 6904	Ectoína, glutamato	0,86 M	Glicerol	(Schmitz y Galinski, 1996)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633	Ectoína	1 M	Mezcla de aminoácidos	(Naughton <i>et al.</i> , 2009)

Con frecuencia, los organismos cuentan con dos o más isoenzimas para la síntesis de aspartil fosfato, cuya regulación alostérica sugiere que tienen diferentes funciones en la síntesis de varios productos derivados del aspartato (treonina, metionina, lisina y ectoína). Sin embargo, *C. salexigens* es atípica, teniendo una única aspartato quinasa, que además no se encuentra próxima al operón *ectABC* en este organismo. No se ha estudiado el control de la aspartato quinasa en *C. salexigens*, pero, dado que esta enzima cataliza la primera reacción de una ruta de síntesis de múltiples precursores biosintéticos además de ectoína, sería tan importante como interesante la elucidación de su control transcripcional y alostérico en este y otros organismos productores de ectoínas. La treonina inhibe el crecimiento de *C. salexigens* DSM 3043 en medio mínimo con glucosa, hecho que concuerda con la posibilidad de que este aminoácido fuera un retro inhibidor alostérico de la aspartato quinasa, aunque esta inhibición no revirtió en presencia en el medio de lisina y/o metionina o glicina betaína (que podrían suplantar a la ectoína como solutos compatibles) (K. O'Connor y L. Csonka, datos no publicados). Si la única aspartato quinasa de *C. salexigens* está sujeta a regulación alostérica por su(s) producto(s) biosintético(s) final(es), podría incrementarse la producción de ectoínas mediante la superproducción de una forma mutante de esta enzima, que fuera insensible a la inhibición alostérica.



**Figura I.1.** Estructura química de las ectoínas.

El conocimiento de la regulación de la síntesis de ectoína es importante si se quieren generar cepas modificadas para la mejora de la producción de ectoínas para un posible uso industrial futuro. En bacterias Gram negativas, la mayor parte de los estudios de regulación se han llevado a cabo en *C. salexigens* (Figura I.3). Por otro lado, los datos fisiológicos indican que los niveles de ectoína e hidroxiectoína son máximos durante la fase estacionaria y que la acumulación de ectoína aumenta con la salinidad, mientras que la acumulación de hidroxiectoína aumenta tanto con la salinidad como con la temperatura (García-Esteva, Argandoña, *et al.*, 2006). Esta regulación tiene lugar, al menos en parte, a nivel transcripcional. Ensayos de protección con S1 y fusiones transcripcionales con el gen marcador *lacZ* demostraron que los genes de síntesis de ectoínas (*ectABC*) pueden expresarse a partir de dos regiones

promotoras diferentes. Una se localiza en aguas arriba de *ectA* y se compone de cuatro supuestos promotores (*PectA1-4*) y la segunda es un promotor interno localizado en aguas arriba de *ectB* (*PectB*). La expresión de las fusiones transcripcionales *PectA-lacZ* y *PectB-lacZ* es máxima durante la fase estacionaria (en concordancia con los datos fisiológicos), pero también se transcriben a niveles reducidos en baja salinidad, sugiriendo que *ectABC* puede ser parcialmente constitutivo. La expresión de *PectA* está osmorregulada (expresión heteróloga en *E. coli*), y los ensayos de protección con S1 indican que *PectA1*, *PectA3* y *PectA4* son los promotores osmorregulados en la región *PectA*. La expresión de *PectA* y especialmente la de *PectB* se induce al crecer a altas temperaturas, y se reprime en presencia de osmoprotectores (betaína y ectoína), del inhibidor de la ADN girasa, ácido nalidíxico, y en presencia de un exceso de hierro (este último sólo en el caso de *PectA*) (Calderón *et al.*, 2004). En conjunto estos datos sugieren que la transcripción de los genes de síntesis de ectoínas implica múltiples promotores que permiten la regulación del sistema en respuesta a un número de factores ambientales, que incluyen salinidad, temperatura, osmoprotectores externos y hierro. Para asegurar una expresión adecuada en respuesta un entorno cambiante, es necesaria la participación de un número de factores de transcripción pertenecientes a diferentes rutas de regulación. El análisis *in silico* de las secuencias en las regiones -10 y -35 aguas arriba de *ectA*, *ectB* y *ectD* mostraron que *PectA1* y *PectA2* se solapan con posibles sitios de unión del principal factor vegetativo  $\sigma^{70}$  (Calderón *et al.*, 2004) y el regulador de la homeostasis del hierro Fur (Argandoña *et al.*, 2010), mientras que *PectA3* es similar a los promotores dependientes de  $\sigma^5$  y *PectB* podría ser reconocido por el factor de estrés térmico  $\sigma^{32}$  (Calderón *et al.*, 2004).

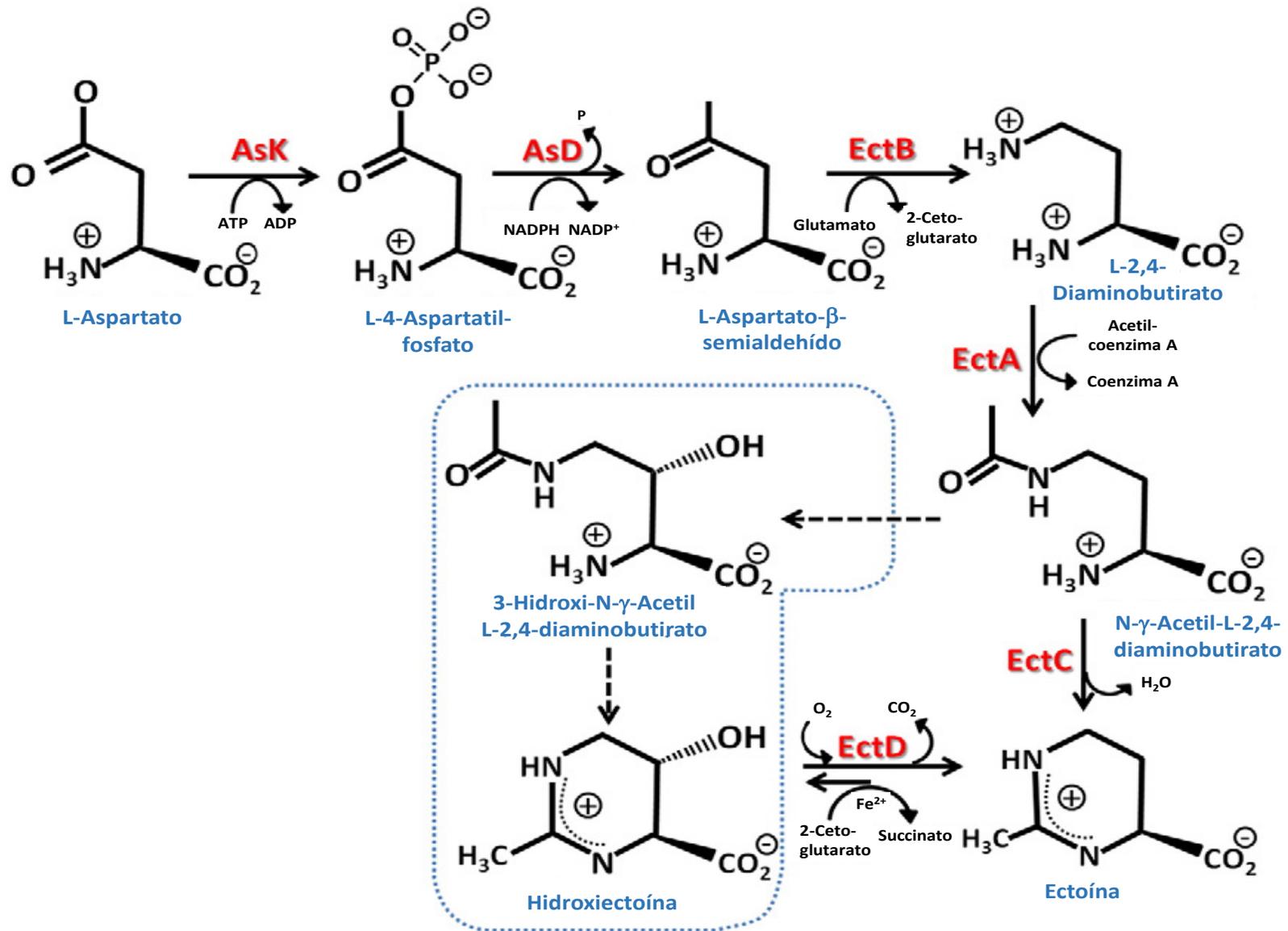


Figura I.2. Ruta de síntesis de ectoínas en *C. salexigens*.

Aunque la inducción por temperatura de la expresión de *PectA* y *PectB* sugería inicialmente que, además de la osmoprotección, la ectoína podría tener un papel fisiológico en la termoprotección de *C. salexigens* (Calderón *et al.*, 2004), los niveles de ectoína no aumentan en respuesta a la temperatura (García-Esteba, Argandoña, *et al.*, 2006). Una explicación para este hecho es que a altas temperaturas *C. salexigens* transforma rápidamente la ectoína en hidroxiectoína, reduciendo con ello los niveles de ectoína. Esto es compatible con la inducción a alta temperatura de los genes de síntesis de ectoínas, dado que la ectoína es el precursor de la hidroxiectoína. Las células de *C. salexigens* que crecen en presencia de betaína no acumulan ectoína en ninguna de las salinidades probadas (Calderón *et al.*, 2004), en consonancia con la asunción general de que el transporte de solutos compatibles está priorizada frente a su síntesis, debido a que esta última es menos favorable energéticamente (Oren, 1999). Dado que la betaína reprime sólo parcialmente la expresión de *PectA* y *PectB*, es posible inferir la existencia de un mecanismo de control post transcripcional que podría operar a nivel de actividad enzimática. Sin embargo, no pueden descartarse otros mecanismos alternativos como un aumento del flujo de ectoínas al exterior celular en presencia de betaína.

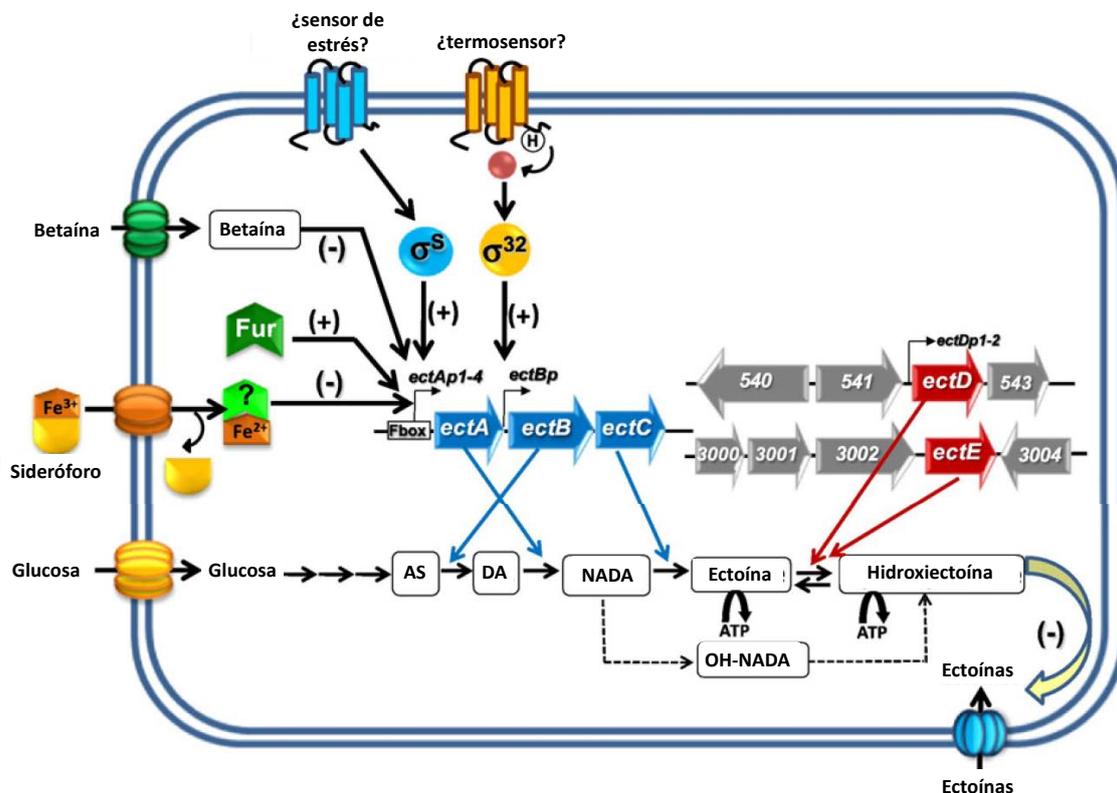


Figura I.3. Acumulación de ectoínas en *C. salexigens* y mecanismos de regulación transcripcional.

En bacterias Gram positivas, la regulación de la síntesis de ectoínas se ha abordado en *Salibacillus pasteurii* (Kuhlmann y Bremer, 2002) y en *M. halophilus* (Louis y Galinski, 1997; Bestvater y Galinski, 2002). Análisis de extensión del cebador mostraron que los genes *ectABC* de *Salibacillus pasteurii* se expresan desde un único promotor cuyas secuencias -10 y -35 se asemejan a las secuencias consenso de promotores reconocidos por el principal factor sigma vegetativo  $\sigma^A$  (ortólogo de  $\sigma^{70}$  de Gram negativas). Sin embargo, en *M. halophilus*, el análisis asistido por ordenador del ADN aguas arriba de *ectABC* reveló la presencia de un posible sitio de unión para  $\sigma^B$  (ortólogo de  $\sigma^S$  de Gram negativas), como el mejor candidato para la regulación de la transcripción en este organismo (Louis y Galinski, 1997; Bestvater y Galinski, 2002). Curiosamente, una fusión transcripcional de esta región promotora (denominada como *ectUp*) con el gen marcador *gfp* no sólo se expresó sino que además se indujo por estrés osmótico en *E. coli* (Louis y Galinski, 1997; Bestvater y Galinski, 2002). Esto podría explicarse por la presencia de secuencias en esta región promotora que fueran reconocidas por los factores sigma  $\sigma^{70}$  o  $\sigma^S$ . Así como  $\sigma^S$  en bacterias Gram negativas,  $\sigma^B$  controla la respuesta general de estrés en bacterias Gram positivas, y es en parte responsable del control transcripcional de algunos genes osmorregulados, como *opuE* y *opuD* de *Bacillus subtilis*, los cuales codifican para los sistemas de incorporación de prolina y glicina betaína, respectivamente (Bremer, 2000). Hasta la fecha, la implicación de  $\sigma^A$  y/o  $\sigma^B$  en el control de la síntesis de ectoína en cualquiera de estos dos microorganismos del tipo *Bacillus* no ha sido demostrada experimentalmente.

El transporte de ectoína y su regulación han sido extensamente estudiados por HJ Kunte y colaboradores en la Gram negativa *H. elongata* DSM 2581 y la Gram positiva *M. halophilus* (ver la revisión Kunte (Kunte, 2006). Estos autores hallaron una unidad transcripcional en *H. elongata* que contenía tres genes, *teaABC*, que resultaron esenciales para la incorporación de ectoína (Grammann *et al.*, 2002). Análisis *in silico* predijeron la pertenencia de TeaABC a la familia de los transportadores TRAP, consistente en dos posibles proteínas transmembrana (TeaB y TeaC) y una proteína periplásmica de unión a ectoína (TeaA) (Grammann *et al.*, 2002; Tetsch y Kunte, 2002). En el genoma de *C. salexigens* se encuentran ortólogos de *teaABC* de *H. elongata*, pero organizados de una forma distinta (tea en una hebra, seguido de *teaABC* en la hebra opuesta). Existen evidencias experimentales de que este sistema es el principal responsable de la asimilación de ectoínas en *C. salexigens* (J. Rodríguez-Moya y C. Vargas, datos no publicados). Por otro lado, se previó que el principal transportador de ectoína de *M. halophilus* fuera una proteína de 525 residuos, hidrofóbica y osmorregulada. Además compartía un grado de identidad significativo con transportadores de betaína-colina-carnitina (BCCTs). Se apuntó a que esta proteína tendría una gran afinidad por la ectoína (Vermeulen y Kunte, 2004).

## Las ectoínas como fuente de carbono y energía

Además de su protección contra el estrés, una función secundaria importante de los solutos compatibles es servir como fuentes de carbono, energía o nitrógeno, ya sea como reservas intracelulares o como fuentes externas disponibles para otros organismos mediante la liberación al entorno tras la muerte o tras un choque hipoosmótico de las cepas productoras. Carbohidratos tales como el glicerol, glucosilglicerol, trehalosa, sacarosa y aminoácidos como prolina, glutamato y alanina, los cuales son solutos compatibles comunes en una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, actinomicetos y micro algas, pueden ser usados como fuentes de carbono, nitrógeno y energía por una amplia variedad de microorganismos heterótrofos y fotótrofos (Welsh, 2000). En cambio, el catabolismo de las ectoínas (ectoína e hidroxiectoína) resulta bastante más infrecuente. Así, la especie halotolerante *Sporosarcina pasteurii* sintetiza y acumula ectoína pero no puede degradarla (Kuhlmann y Bremer, 2002). De forma similar, *E. coli* puede usar la ectoína como osmoprotector y la hidroxiectoína como osmo- y termoprotector tomándolas del medio, pero no las puede catabolizar como fuente de carbono o nitrógeno (Jebbar *et al.*, 1992; Malin y Lapidot, 1996).

Existen, sin embargo, algunas bacterias capaces de usar ectoínas con un fin catabólico. De esta forma, *Sinorhizobium meliloti* metaboliza ectoína preferentemente en lugar de acumularla, bajo condiciones de alta osmolaridad, en las que se estimula la síntesis de solutos compatibles endógenos (Talibart *et al.*, 1994). *H. halochloris*, la bacteria fotótrofa del azufre en la que se descubrió la ectoína, puede degradar sus reservas internas de ectoína durante la privación de nitrógeno y sustituirla por trehalosa, liberando así nitrógeno para el crecimiento celular (Galinski y Herzog, 1990). Además, Manzanera *et al.* (Manzanera *et al.*, 2002) mostraron que *Pseudomonas putida* es capaz de incorporar y degradar hidroxiectoína con fines catabólicos, pero no se investigó un proceso similar para la ectoína.

Las rutas encargadas de la degradación de las ectoínas son aún desconocidas. La identificación por Jebbar *et al.*, (Jebbar *et al.*, 2005) de un operón implicado en la incorporación y catabolismo de ectoína en *S. meliloti* (*ehuABCD-eutABCD*) supuso un paso importante en la elucidación de estas rutas. Basándose en homologías de secuencia, se halló que *eutABCDE* codifica para proteínas con posibles funciones en el metabolismo de ectoínas. Además, el análisis de las propiedades del mutante *eutA* demostró de forma inequívoca que al menos algunos de los genes *eut* están implicados en la degradación de ectoína por *S. meliloti*. Aun así, el catabolismo de ectoína en el mutante no desapareció completamente, sugiriendo que *S. meliloti* cuenta con otros genes que codifiquen para enzimas degradadoras de ectoína.

*C. salexigens* emplea las ectoínas como fuente de carbono exclusivamente al crecer en condiciones de osmolaridad óptimas (Vargas *et al.*, 2006). En consonancia con esto, el transporte de ectoína fue máximo en la concentración óptima de sal. En este microorganismo, la metabolización de la ectoína sólo fue parcialmente inhibida por glucosa, indicando la existencia de al menos dos sistemas implicados en el catabolismo de ectoínas en *C. salexigens*. Esta situación podría ser similar a la hallada en *S. meliloti*, donde además de *EutABCDE*, hay pruebas de al menos otra ruta degradadora de ectoínas. En el borrador de la secuencia del genoma de *C. salexigens* (disponible en [http://genome.jgi-psf.org/mic\\_home.html](http://genome.jgi-psf.org/mic_home.html)) se ha encontrado un grupo de 11 genes, orientados todos en la misma dirección, que podrían codificar para ortólogos de *EutB*, *EutC*, *EutD* y *EutE* (“valores E” en BLAST [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST] que van desde 3e-72 a e-140). Sin embargo, no se encontró una correspondencia estadísticamente significativa con *EutA*, y los genes *eutBCDE* estaban organizados de forma distinta y separados del sistema de transporte *ehu* encontrado en *S. meliloti* (C. Vargas, resultados no publicados).

## IMPORTANCIA Y USOS DE LAS ECTOÍNAS

### Protección de macromoléculas

Un papel adicional de los solutos compatibles en general, es que éstos pueden paliar los efectos nocivos del estrés por calor, congelación, desecación, alta salinidad, radicales de oxígeno, radiación, urea y otros agentes desnaturizantes en la integridad de las proteínas, ácidos nucleicos, biomembranas e incluso células completas (da Costa *et al.*, 1998; Lentzen y Schwarz, 2006). Entre los distintos solutos compatibles investigados hasta el momento, las ectoínas han demostrado contar con las propiedades protectoras más potentes (Lippert y Galinski, 1992).

*Efectos sobre la estabilidad enzimática.* Las propiedades estabilizadoras de las ectoínas se han ensayado en numerosos procesos enzimáticos (Tabla I.2). Los aspectos termodinámicos de la estabilización proteica de la hidroxietoína se estudiaron empleando calorimetría diferencial de barrido y ribonucleasa A (Knapp *et al.*, 1999). La estabilización significativa de la ARNasa A por hidroxietoína hace de ésta un estabilizador interesante en procesos biotecnológicos en los que las enzimas se emplean en presencia de agentes desnaturizantes a altas temperaturas (Knapp *et al.*, 1999). La hidroxietoína es capaz además de proteger a la lactato deshidrogenasa (LDH) de la oxidación catalizada por metal y de la oxidación por peróxido

(Andersson *et al.*, 2000), indicando que la protección es independiente de la fuente del daño oxidativo.

Tanto LDH como fosfofructoquinasa son muy susceptibles a la pérdida de actividad por tratamientos de congelación-descongelación, calor, y liofilización. Sin embargo, las actividades de ambas enzimas fueron preservadas por las ectoínas al someterlas a estos tratamientos (Lippert y Galinski, 1992). Al observarse los cambios estructurales de LDH en condiciones de congelación-descongelación y tratamiento con urea, y la protección de la enzima por ectoínas, se propuso que éstas podrían conducir a una conformación más compacta de la enzima, modulando las propiedades del disolvente (Göller y Galinski, 1999), lo que apoya la hipótesis de la “exclusión preferencial de solutos de la superficie proteica” (Arakawa y Timasheff, 1985)(ver Sección “Capacidad protectora de las ectoínas).

El polímero cianoficina es una reserva material de nitrógeno y energía de interés biotecnológico (Joentgen *et al.*, 2001) debido a que el ácido oligoarginil poliaspártico obtenido de su degradación puede emplearse como sustituto biodegradable en varios procesos y productos industriales (Schwamborn, 1998). La ectoína se ha empleado en la estabilización de una nueva cianoficina sintetasa heteróloga para producción *in vitro* de cianoficina y poliamida a escala industrial (Hai *et al.*, 2002). La actividad de la fitasa, una fosfomonoesterasa que hidroliza fitato y libera fosfato inorgánico durante la granulación de piensos (Stahl *et al.*, 2000; Keshavarz, 2000), decrece con frecuencia debido a las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso (Ullah, 1988). Resulta interesante la estabilización de la capacidad catalítica de la fitasa a alta temperatura que proporciona la ectoína, exhibiendo un aumento actividad de hasta siete veces, si la comparamos con la actividad en ausencia de ectoína a alta temperatura (Zhang *et al.*, 2006).

*Efectos sobre la estructura del ADN.* Se ha demostrado que las ectoínas inducen cambios en la estructura del ADN tales que muchas endonucleasas de restricción no son capaces de romperlo (Malin *et al.*, 1999) (Tabla I.2). De esta forma, la adición de solutos compatibles durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede cambiar la conformación del ADN influyendo en la hibridación del cebador y la unión de la polimerasa. Se confirmó que la ectoína aumenta la estabilidad térmica de las ADN polimerasas a temperaturas elevadas y disminuye la temperatura de fusión de la doble hebra de ADN (Lapidot *et al.*, 1995). Este segundo efecto es mayor para moldes de ADN ricos en GC que para aquellos pobres en GC, siendo remarcable en el caso de la homoectoína, un nuevo derivado sintético de la ectoína (Tabla I.2). Además, la homoectoína aumenta la especificidad de las PCRs hasta el 100%, evitando los productos contaminantes suplementados en PCRs con ectoína a determinadas concentraciones (Schnoor *et al.*, 2004). A causa de estas propiedades, las ectoínas pueden potenciar la eficacia de la

reacción en cadena de la polimerasa con ADN molde ricos en GC, y además mejorar los métodos de extensión de cebador o de secuenciación (Lapidot *et al.*, 1995).

La optimización del flujo de trabajo en microarrays de ADN, incluyendo el paso de hibridación, es un objetivo primordial para el desarrollo de protocolos más eficientes. Así, concentraciones milimolares de hidroxietoína, diglicerofosfato de potasio y manosilglicerato de potasio redujeron el ruido de fondo en microchips de ADN (Tabla I.2) y mejoraron la eficiencia de la hibridación (Mascellani *et al.*, 2007). Recientemente se ha puesto de manifiesto que la recombinación y la regulación de la transcripción requieren no sólo la interacción de proteínas específicas de secuencia, sino que con frecuencia depende también de la asociación de proteínas de unión al ADN sin especificidad de secuencia (Azam y Ishihama, 1999; Rimsky *et al.*, 2001; Schröder y Wagner, 2002). Se ha demostrado que la proteína de unión al ADN H-NS estimula la unión al ADN de LRP (proteína reguladora de respuesta a leucina) sin estar presente en el complejo final (Tabla I.2). La presencia del osmolito ectoína, que asegura que los organismos unicelulares mantengan un nivel adecuado de hidratación, también estimula la unión de LRP (Pul *et al.*, 2007).

*Efecto sobre la estructura proteica.* Las proteínas sobreexpresadas, que pueden resultar insolubles o plegarse de forma incorrecta, a menudo se pueden desnaturalizar parcialmente y volver a plegar en presencia de osmolitos (Tabla I.2). Un ejemplo específico es el uso de la hidroxietoína durante la fase de congelación-descongelación del proceso de purificación para aumentar el rendimiento de proteínas citotóxicas funcionales sobreexpresadas y redirigidas al periplasma de *E. coli* (Barth *et al.*, 2000). Asimismo se demostró que la ectoína es capaz de proteger proteínas de la proteólisis por tripsina y trispsinógeno, protegiendo su actividad durante la incubación. Por ello, las ectoínas podrían ejercer como aditivos prometedores en los casos en que sea necesario evitar el uso de inhibidores de proteasas. Este podría ser el caso de las investigaciones en proteasas como objetivo del desarrollo de fármacos.

**Tabla I.2.** Importancia y usos de las ectoínas.

<b>Efecto</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Referencia</b>
<i>Protección de macromoléculas</i>		
Protección de proteínas recombinantes contra degradación, agregación, plegamiento incorrecto y congelación	Hidroxiectoína	(Barth <i>et al.</i> , 2000)
Termoestabilización de cianoficina sintetasa	Ectoína	(Hai <i>et al.</i> , 2002)
Protección de enzimas contra el calor, congelación y desecación	Hidroxiectoína, ectoína	(Lippert y Galinski, 1992)
Termoestabilización de fitasa (90°C)	Ectoína	(Zhang <i>et al.</i> , 2006)
Protección de anticuerpos contra la degradación proteolítica	Ectoína	(Bersch <i>et al.</i> , 2000)
Protección de inmunotoxinas contra estrés por congelación-descongelación	Hidroxiectoína	(Barth <i>et al.</i> , 2000)
Disminución eficaz de la temperatura de fusión del ADN	Ectoína	(Lapidot <i>et al.</i> , 2006)
Mejora de la PCR	Homoectoína	(Schnoor <i>et al.</i> , 2004)
Mejora de microarrays de ADN	Hidroxiectoína	(Mascellani <i>et al.</i> , 2007)
Prevención del corte de ADN plasmídico y del bacteriófago $\lambda$ por endonucleasas del tipo II	Hidroxiectoína	(Malin <i>et al.</i> , 1999)
Protección de enzima LDH contra el daño oxidativo	Hidroxiectoína	(Andersson <i>et al.</i> , 2000)
Estabilización del complejo LRP-ADN en la regulación de la transcripción	Ectoína	(Pul <i>et al.</i> , 2007)
Aumento de la estabilidad y de la temperatura de fusión de la ARNasa A	Hidroxiectoína	(Knapp <i>et al.</i> , 1999)
Protección de LDH contra el calor, urea y congelación-descongelación	Hidroxiectoína, ectoína	(Göller y Galinski, 1999)
Protección de la membrana celular contra agentes surfactantes	Ectoína	(Bünger y Driller, 1999; Bünger <i>et al.</i> , 2001; Graf <i>et al.</i> , 2008)
Optimización de las condiciones de cristalización de proteínas en cristalografía de Rayos X	Ectoína	(Harjes <i>et al.</i> , 2004)
<i>Usos terapéuticos potenciales</i>		
Protección contra inflamación neutrofílica de pulmón no inducida por partículas	Ectoína	(Sydlik <i>et al.</i> , 2009)
Protección del intestino delgado contra la isquemia fría y el daño posterior por calentamiento en la reperfusión	Ectoína	(Wei <i>et al.</i> , 2009)
Protección de células neuronales de la toxicidad inducida por poliglutamina en la enfermedad de Machado-Joseph	Ectoína	(Furusho <i>et al.</i> , 2005)
Inhibición de la agregación y neurotoxicidad del $\beta$ -amiloide de la enfermedad de Alzheimer	Ectoína, hidroxiectoína	(Kanapathipillai <i>et al.</i> , 2005)
Inhibición de la formación del amiloide de insulina	Ectoína	(Arora <i>et al.</i> , 2004)
Protección de zimógenos contra proteólisis	Ectoína	(Kolp <i>et al.</i> , 2006)
Inhibición de la unión <i>in vitro</i> de un péptido de tipo TAT rico en arginina al ARN del elemento TAR del VIH	Hidroxiectoína	(Lapidot <i>et al.</i> , 1995)
Inhibición de la agregación y toxicidad del péptido priónico 106-206	Ectoína	(Kanapathipillai <i>et al.</i> , 2008)
Estabilización de vectores retrovirales empleados en terapia génica	Hidroxiectoína	(Cruz <i>et al.</i> , 2006)

Efecto	Compuesto	Referencia
<i>Protección celular</i>		
Protección contra desecación de <i>Pseudomonas putida</i>	Hidroxiectoína	(Manzanera <i>et al.</i> , 2002)
Protección contra desecación de <i>Escherichia coli</i>	Hidroxiectoína	(Manzanera <i>et al.</i> , 2004a)
Protección contra la desecación de <i>P. putida</i> y <i>E. coli</i> durante la encapsulación en plástico	Hidroxiectoína	(Manzanera <i>et al.</i> , 2004b)
Potenciación del crecimiento y la fermentación alcohólica en <i>Zymomonas mobilis</i>	Ectoína	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
Protección de <i>Halomonas</i> durante la metabolización y detoxificación de fenol	Ectoína	(Maskow y Kleinsteuber, 2004)
Preservación de la actividad respiratoria de <i>E. coli in vivo</i>	Ectoína	(Nagata <i>et al.</i> , 2002)
Osmoprotección de bacterias del ácido láctico	Ectoína	(Baliarda <i>et al.</i> , 2003)
Inducción de termotolerancia en <i>Escherichia coli</i>	Hidroxiectoína	(Malin y Lapidot, 1996)
Estabilización de <i>E. coli</i> durante desecación y almacenamiento	Ectoína, hidroxiectoína	(Louis <i>et al.</i> , 1994)
Inducción de tolerancia a la sal en plantas de tabaco transformadas para producir ectoína	Ectoína	(Moghaieb <i>et al.</i> , 2006)
Inducción de tolerancia a la sal en células de plantas de tabaco transformadas para producir ectoína	Ectoína	(Nakayama <i>et al.</i> , 2000)
<i>Protección de la piel</i>		
Protección antienvjecimiento <i>in vivo</i> de la piel en humanos	Ectoína	(Heinrich <i>et al.</i> , 2007)
Protección <i>in vivo</i> contra la deshidratación de la piel (modelos <i>in silico</i> para explicarlo)	Ectoína	(Graf <i>et al.</i> , 2008)
Protección antienvjecimiento <i>in vitro</i> de la piel en humanos, protección del ADN mitocondrial e inflamación de la respuesta inflamatoria mediada por ceramidas	Ectoína	(Bünger y Driller, 2004)
Inducción de las proteínas de choque térmico y mediación en la respuesta proinflamatoria en queratinocitos humanos	Ectoína	(Buommino <i>et al.</i> , 2005)
Protección de la luz visible <i>in vitro</i>	Ectoína	(Botta <i>et al.</i> , 2008)
Agente hidratante <i>in vivo</i> de la piel humana	Ectoína	(Motitschke <i>et al.</i> , 2002)
Protección <i>in vivo</i> contra la degradación de las células de Langerhans inducida por luz UV	Ectoína	(Beyer <i>et al.</i> , 2000)
Inhibición <i>in vitro</i> de la formación de SBCs y protección <i>in vivo</i> de las células de Langerhans	Ectoína	(Bünger <i>et al.</i> , 2001; Pflücker <i>et al.</i> , 2005)
Bloqueo de la liberación de ceramida inducida por la luz UV en queratinocitos humanos	Ectoína	(Grether-Beck <i>et al.</i> , 2005)
Protección <i>in vivo</i> de la piel contra la deshidratación por agentes surfactantes	Ectoína	(Bünger y Driller, 1999)

## Potencial biomédico de las ectoínas

### Capacidad de estabilización proteica de las ectoínas

Recientemente se ha producido un aumento del reconocimiento de enfermedades asociadas con el plegamiento incorrecto de proteínas (Dobson, 2003). En un subgrupo importante de estas enfermedades, la agregación proteica lleva a la formación de agregados altamente regulares denominados amiloides. Este fenómeno juega un papel clave en el desarrollo de enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y encefalopatías espongiiformes (Harper y Lansbury, 1997; Murphy, 2002) (Tabla I.2). Se ha demostrado que la ectoína es un inhibidor muy eficaz de la formación de amiloide haciendo disminuir sus fases de iniciación y de elongación, en un estudio que tomó la formación del amiloide de insulina *in vitro* como sistema modelo (Arora *et al.*, 2004).

Se ha postulado la potencialidad de las ectoínas como candidatos a terapéuticos antiamiloides para el tratamiento del Alzheimer, dado que inhiben fuertemente la formación del amiloide A $\beta$ 42 *in vitro* y reducen su toxicidad para las células del neuroblastoma humano (Kanapathipillai *et al.*, 2005) (Tabla I.2). Los priones son partículas infecciosas las encefalopatías espongiiformes transmisibles en animales y humanos (Aguzzi y Polymenidou, 2004). Se agregan formando amiloides fibrilares resistentes a proteasas, induciendo así la muerte neuronal por apoptosis, y causando la proliferación e hipertrofia de las células de glía cultivadas (Forloni *et al.*, 1993; Pan *et al.*, 1993). Las células de neuroblastoma coincubadas con ectoína junto con priones mostraron una tasa de supervivencia mayor si la comparamos con muestras control, inhibiendo la formación de amiloides priónicos y reduciendo su citotoxicidad (Kanapathipillai *et al.*, 2008).

El plegado incorrecto de proteínas es también un fenómeno clave en la patogénesis de enfermedades por poliglutaminas como la enfermedad de Machado-Joseph (MJD) (Tabla I.2). Se considera que el plegado incorrecto del fragmento proteico que contiene un tramo de poliglutamina expandido es significativo en la producción de agregados y muerte celular (Kakizuka, 1998; Paulson, 1999; Perutz, 1999). Estudios previos sugieren que la inclusión nuclear no es un agente causante de la citotoxicidad, siendo por el contrario protector, mediante el secuestro de la proteína con tramo extendido de poliglutamina (Ferrigno y Silver, 2000). La ectoína reduce las características apoptóticas mediante la reducción de la cantidad total de agregados y el cambio en su distribución intracelular. Así, reduce la citotoxicidad incrementando la frecuencia de las inclusiones nucleares (Furusho *et al.*, 2005).

## Efectos protectores de las ectoínas en ciertas enfermedades

La administración de ectoína inhibió la señalización inducida por nanopartículas, que es considerada responsable de las reacciones proinflamatorias en células epiteliales del pulmón (Sydlik *et al.*, 2009) (Tabla I.2). Se ha identificado la inhalación de nanopartículas como una importante amenaza del aire de las sociedades modernas industrializadas. Es capaz de inducir inflamación pulmonar, el mecanismo patogénico central responsable de multitud de enfermedades orgánicas y sistémicas (Donaldson *et al.*, 2005). El pulmón, al ser el primer órgano afectado por la inflamación inducida por nanopartículas, se ve seriamente dañado por el reclutamiento y activación constante de células inflamatorias. Enfermedades pulmonares como el enfisema, enfermedad obstructiva pulmonar crónica, fibrosis y cáncer (Macnee, 2007; Bringardner *et al.*, 2008) así como desórdenes sistémicos a nivel cardiovascular y del sistema inmune (Peters *et al.*, 2004) tienen lugar como consecuencia de estos casos.

La isquemia, y el daño subsiguiente por reperfusión (I/R) continúa siendo un importante obstáculo para el trasplante de intestino delgado satisfactorio (Grant *et al.*, 1990). Generalmente se acepta que el daño por I/R es el mecanismo patofisiológico subyacente del daño de las mucosas (Kong *et al.*, 1998). Aunque la mucosa intestinal tiene una alta capacidad regenerativa, se ha demostrado que la recuperación morfológica de una mucosa ílica dañada tras 24 horas de conservación en frío requiere al menos un mes. Este daño prolongado contribuye sin duda no sólo al rechazo del injerto, sino también a varias complicaciones postoperatorias, como translocación bacteriana, absorción de endotoxina y malnutrición duradera (Zou *et al.*, 2005). La ectoína protege de forma eficaz la mucosa ílica y la muscularis reduciendo la ceramida como mediador apoptótico y de estrés oxidativo, causados por el daño mitocondrial simultáneo, mejorando así la función de barrera de la mucosa (Wei *et al.*, 2009) (Tabla I.2).

Otro ejemplo es la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que depende de forma crítica de dos proteínas reguladoras víricas, Tat y Rev. Tat es necesaria en la fase temprana del ciclo vital del virus para una la transcripción eficaz del genoma vírico. Tat actúa uniéndose a una estructura en bucle del ARN, el elemento de respuesta al elemento regulador en trans (TAR), ubicado en el extremo 5' del ARNm vírico (Roy *et al.*, 1990; Cordingley *et al.*, 1990; Dingwall *et al.*, 1990). Se ha visto que la ectoína inhibe la interacción del péptido Tat con el ARN de TA, uniéndose aproximadamente  $10^6$  veces más estrechamente. Además, la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]-ectoínas tanto por células HeLa como por líneas de fibroblastos humanos en condiciones normales de crecimiento facilita su consideración como fármacos antivirales potenciales (Lapidot *et al.*, 1995) (Tabla I.2).

Para terminar, la hidroxiectoína permitió el almacenamiento a largo plazo (vida media superior a 185 días, entre los mejores resultados hasta el momento) de vectores retrovirales, los cuales son herramientas prometedoras de la terapia génica. Este es un efecto bastante interesante, ya que actualmente la pérdida de infectividad de estos vectores durante su transporte y almacenamiento es un impedimento importante para que se extienda su uso (Cruz *et al.*, 2006) (Tabla I.2).

### **Capacidad de protección celular de las ectoínas.**

Las ectoínas no sólo estabilizan proteínas y otras macromoléculas sino que además son potentes protectores celulares (Tabla I.2). Así, la adición de ectoínas al medio de cultivo revirtió la inhibición del crecimiento de *E. coli* causada por estrés osmótico y térmico (Malin y Lapidot, 1996). Uno de los mecanismos es la recuperación de la capacidad de asimilación de glucosa (Nagata *et al.*, 2002). La hidroxiectoína extracelular, cuando se emplea en bacterias previamente sometidas a un tratamiento osmótico, es tan efectiva como la trehalosa en la mejora de la anhidrobiosis de *E. coli* (Manzanera *et al.*, 2004a). Louis *et al.* (Louis *et al.*, 1994) comprobaron que la ectoína y la hidroxiectoína estabilizan células de *E. coli* durante los procesos de secado al aire y liofilización. En *P. putida*, la hidroxiectoína resultó superior a la trehalosa como excipiente seco para almacenamiento (Manzanera *et al.*, 2002), promoviendo de esta forma un nuevo método para el secado y encapsulación en plástico de la bacteria, demostrando una aplicación potencial como recubrimiento de semillas (Manzanera *et al.*, 2004b). Se ha comprobado también que la ectoína puede servir como osmoprotector específico para la bacteria del ácido láctico *Tetragenococcus halophila*, empleada en la fermentación de la salsa de soja (Baliarda *et al.*, 2003). La adición de ectoína mejoró el crecimiento celular, la utilización de glucosa y protegió las enzimas relacionadas durante la fermentación alcohólica en la bacteria etanológica Gram negativa *Zymomonas mobilis* (Zhang *et al.*, 2008), que presenta la ventaja sobre *Saccharomyces cerevisiae* de una mayor conversión de azúcar en etanol (Jeffries, 2005) (Tabla I.2).

Se ha visto recientemente que la suplementación de ectoína mejora enormemente la producción de biodiesel mediante conversión enzimática de triglicéridos en aceite de semillas de algodón usando lipasas inmovilizadas, facilitando la reutilización de enzima y mejorando sustancialmente la concentración de éster metílico tras cada reciclado (Wang y Zhang, 2010).

Nakayama *et al.*, (Nakayama *et al.*, 2000) transformaron células de planta de tabaco con genes de la síntesis de ectoínas de *H. elongata*. A pesar del bajo nivel de acumulación de este

soluto, la síntesis heteróloga de ectoína produjo un aumento en la tolerancia hiperosmótica. Al integrar más tarde esos genes de manera estable en el genoma de la planta de tabaco usando *Agrobacterium* como vector génico, la velocidad de producción de ectoína resultó mucho mayor, particularmente en las raíces. La ectoína protegió la conductancia estomática y la actividad carboxilativa, evitando el descenso de la velocidad fotosintética provocado por la salinidad (Moghaieb *et al.*, 2006). Los datos pusieron de manifiesto dos formas en que la ectoína favorecía la tolerancia a la salinidad de las plantas de tabaco. En primer lugar, la ectoína mejoró el mantenimiento de la función de las raíces, de forma que la incorporación de agua a los brotes se hacía de forma constante. En segundo lugar, la ectoína potenció el aporte de nitrógeno a las hojas, elevando la transpiración y protegiendo las proteínas del complejo Rubisco de los efectos nocivos de la sal, mejorando así la tasa fotosintética (Moghaieb *et al.*, 2006) (Tabla I.2). Este estudio abrió la posibilidad de emplear los genes de síntesis de ectoínas para la generación de cultivos vegetales transgénicos con una mayor tolerancia a condiciones de estrés osmótico y abiótico incorporada, como la sequía o la salinidad. Para terminar, los genes del operón *ectABC* de *M. halophilus* se transfectaron en plántulas de tabaco vía *Agrobacterium tumefaciens*. Los transcritos estaban destinados a los cloroplastos, para alcanzar mayor estabilidad. Se detectó ectoína en las plantas transfectadas, aunque sólo de forma cualitativa. Como resultado, en estas plantas se halló un incremento de la tolerancia a la sal desde 100 mM hasta 300 mM a 25°C, y una mayor estabilidad de la actividad Rubisco (Rai *et al.*, 2006).

### **Capacidad de las ectoínas de protección de la piel.**

El efecto acumulativo de factores externos tales como radiación, viento, humedad y temperaturas extremas produce el envejecimiento de la piel (Rabe *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la ectoína protege y estabiliza las membranas de células previamente tratadas contra el efecto dañino de surfactantes así como la piel humana de factores que en condiciones normales llevarían a la deshidratación de la piel (Bünger y Driller, 1999) (Tabla I.2). Por tanto, la ectoína funciona como un agente hidratante más potente que el glicerol, y proporciona una hidratación eficaz a largo plazo (Graf *et al.*, 2008). Además, una exposición prolongada a rayos UVA puede provocar fotocarcinogénesis (Sander *et al.*, 2004), inmunosupresión (Nagata y Wang, 2001), fotodermatitis y fotoenvejecimiento (Krutmann, 2000; Fourtanier *et al.*, 2006). Las ectoínas protegen la piel de los efectos de la radiación UVA de diferentes formas. Uno de los mecanismos del daño por exposición a UVA es la formación de ceramida por un mecanismo mediado por oxígeno singulete. La exposición de queratinocitos primarios humanos a UVA produce un incremento en los niveles de ceramida, y como consecuencia, se activa una cascada

de señalización intracelular que provoca la expresión de la molécula proinflamatoria de adhesión intracelular 1. La ectoína puede evitar estos efectos negativos de forma satisfactoria gracias a su capacidad de amortiguar los efectos del oxígeno singulete (Bünger y Driller, 2004; Grether-Beck *et al.*, 2005).

Las mutaciones a gran escala el ADN mitocondrial de fibroblastos dérmicos humanos, denominada “deleción común”, son dependientes de la dosis y el tiempo de exposición a radiación UVA (Berneburg *et al.*, 1997; Berneburg *et al.*, 1999; Bünger y Driller, 2004). Este daño al ADN viene acompañado por un marcado aumento de la expresión de la metaloproteasa-1 de la matriz, seguido de la formación de arrugas en la piel (Fligiel *et al.*, 2003; Krutmann y Schroeder, 2009), pero la ectoína puede evitarlo. Para restaurar la homeostasis celular, pueden activarse algunos mecanismos de defensa celular induciendo la expresión de varios genes, incluyendo las proteínas de choque térmico (Hsps) (Giannessi *et al.*, 2003). Puede inducirse aún más la expresión de Hsp70 en los queratinocitos epidérmicos mediante tratamiento con calor, dando lugar a un estado resistente contra los efectos nocivos de la radiación solar UVB (Souil *et al.*, 2001). La expresión de la proteína Hsp70B9, un miembro de la familia Hsp70, se induce exclusivamente por estrés, y no se produce en células no estresadas (Leung *et al.*, 1990; Tavaría *et al.*, 1996). Cuando se trataron queratinocitos con ectoína y choque térmico por calor, se observó un marcado aumento de la forma constitutiva de Hsp70 y una sobreexpresión significativa de Hsp70B9. La capacidad de la ectoína para inducir la expresión de Hsps y reducir las señales proinflamatorias redundante en un mecanismo citoprotector de los queratinocitos (Buommino *et al.*, 2005). Aparte de la protección de la piel del daño directo a los queratinocitos, también tiene lugar la protección de las células de Langerhans, elementos clave en el sistema inmune de la piel (Tavaría *et al.*, 1996; Beyer *et al.*, 2000; Bünger *et al.*, 2001; Pflücker *et al.*, 2005) (Tabla I.2).

Una vez que las células han sido dañadas hasta un punto que no permite su reparación, tiene lugar la muerte celular o apoptosis para proteger el cuerpo de la proliferación de unas células tan seriamente dañadas, que probablemente sean mutantes. Estas células se forman en la epidermis humana como resultado de la radiación UV y poseen características especiales; son las células llamadas “sunburn cells” (células quemadas por el sol, SBCs) (Iizuka *et al.*, 1988). Existe una razón característica entre la tasa de formación de SBCs y la dosis de radiación administrada. Esta proporción podría, sin embargo, aumentar hasta dosis mucho mayores de UV, mediante el tratamiento previo con ectoína (Bünger *et al.*, 2001; Pflücker *et al.*, 2005).

La luz visible también induce el daño al ADN, ya que produce la aparición de pequeños tramos de ADN monocatenario (“single-strand breaks”, SSBs), el intercambio entre cromátidas

hermanas (Sideris *et al.*, 1981) y la producción de especies reactivas de oxígeno intracelular (“reactive oxygen species”, ROS) (Omata *et al.*, 2006), provocando así un efecto genotóxico vía lesiones oxidativas del ADN (Pflaum *et al.*, 1998). Usando células y queratinocitos, se ha demostrado que las lesiones en el ADN inducidas por luz visible y UVA/visible se redujeron en presencia de ectoína, siendo los efectos protectores máximos de un 92,7% contra la luz visible, y de un 68,9% contra la luz UVA/visible (Botta *et al.*, 2008).

Dado que la actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de agentes antioxidantes no enzimáticos decrecen con la edad (González-Ulloa y Flores, 1965; Tolmasoff *et al.*, 1980), la ectoína podría prevenir el daño oxidativo en la piel (Heinrich *et al.*, 2007). De hecho, recientemente se han confirmado sus propiedades antienvjecimiento en pruebas clínicas en las que se comparaba ectoína con un producto del cuidado de la piel de alta calidad (Heinrich *et al.*, 2007).

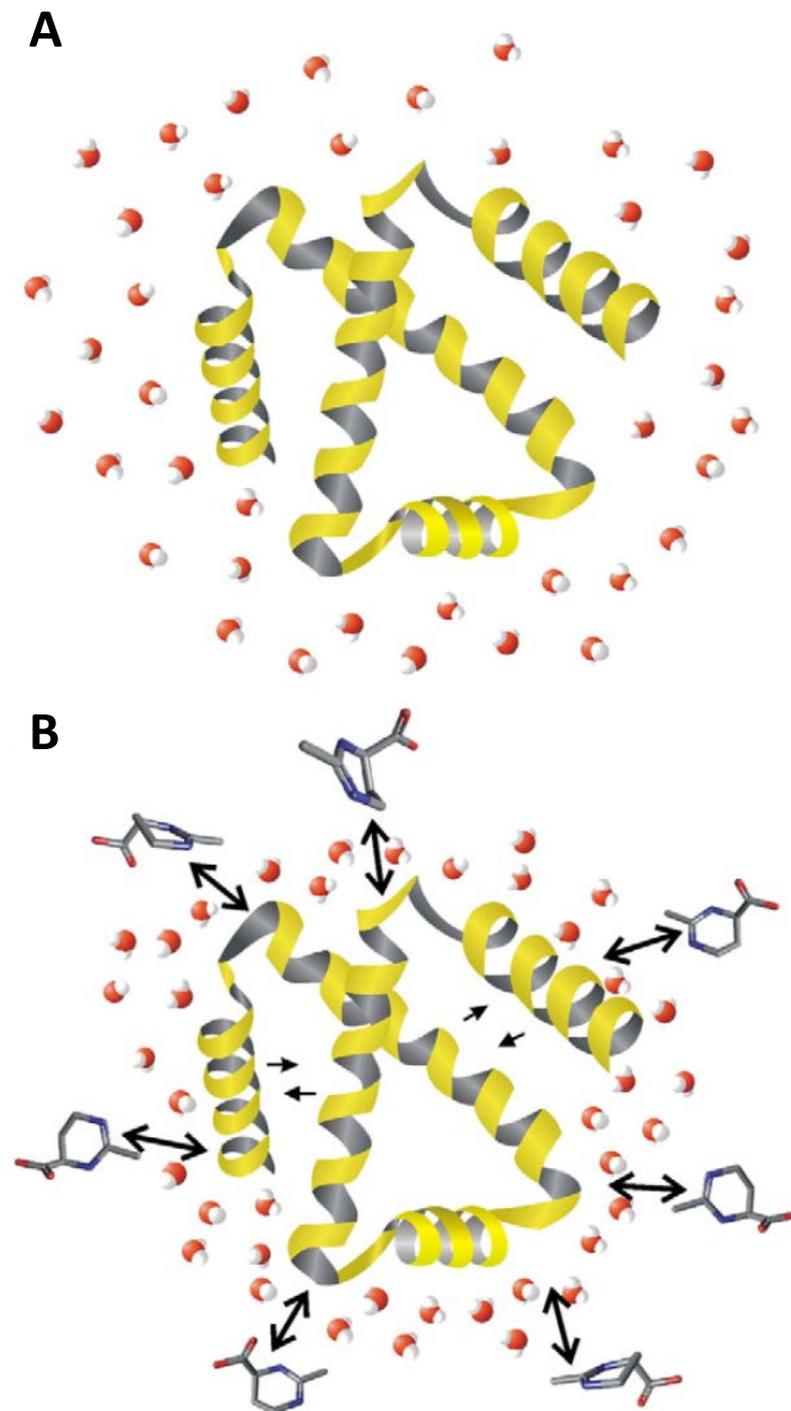
### **Comprendiendo la actividad de las ectoínas**

Los solutos compatibles son de naturaleza anfipática y capaces de “humedecer” proteínas hidrófobas. Se ha propuesto que los solutos compatibles pueden revertir la inhibición osmótica puesto que elevan el contenido total de agua, y con ello, el volumen del citoplasma celular (Cayley *et al.*, 1992). Las propiedades de formación y ruptura de estructuras de los solutos compatibles influyen de manera indirecta en las capas de hidratación y por tanto las actividades de las proteínas implicadas (Wiggins, 1990), como se discute más abajo. Existen diferentes teorías para explicar cómo la función protectora de los solutos compatibles trabaja en ambientes de escasez de agua. Seguidamente se enumeran las más importantes. El “modelo de exclusión preferencial” fue propuesto como mecanismo universal de estabilización proteica por los solutos compatibles (Arakawa y Timasheff, 1985; Timasheff, 2002) (Figura I.4). Este modelo propone que, a causa de la interacción desfavorable con la superficie de las proteínas, los osmolitos protectores quedan excluidos de éstas, al contrario de lo que ocurre con los solutos desnaturizantes, que están en contacto con dicha superficie. De esta forma, las moléculas de soluto compatible son expulsadas de la capa de hidratación inmediata de las proteínas, y en consecuencia, el desplegamiento necesita energía adicional y resulta termodinámicamente desfavorable (Lee y Timasheff, 1981; Kurz, 2008). Esto, a su vez, lleva a una hidratación preferencial de la proteína dado que se ve forzada a ocupar un volumen menor con el fin de minimizar la superficie expuesta, favoreciendo así su conformación nativa. Puesto que los

solutos compatibles no interactúan directamente con la superficie de la proteína, la actividad catalítica permanece inalterada (Galinski *et al.*, 1997; Kolp *et al.*, 2006).

De acuerdo con este modelo, el denominado “efecto osmofóbico” explica como este efecto puede ser universal (Bolen y Baskakov, 2001). Los enlaces por puente de hidrógeno, y las interacciones de Van der Waals, electrostáticas e hidrofóbicas son responsables del plegamiento de las proteínas. Se ha propuesto incluso que la interacción desfavorable del soluto con el esqueleto peptídico sienta las bases moleculares de la exclusión del soluto, y en consecuencia, del efecto estabilizador (Liu y Bolen, 1995; Wang y Bolen, 1997; Qu *et al.*, 1998). Este “efecto osmofóbico” resulta relevante en disoluciones muy concentradas y en organismos que requieren alta concentración intracelular de osmolitos. En contraste con el efecto hidrofóbico, que induce a los residuos de los aminoácidos no polares a agregarse en el interior de la proteína, el efecto osmofóbico influye en la conformación del esqueleto peptídico. De hecho, se ha propuesto que la configuración del esqueleto proteico es el condicionante más importante de la estabilización o desnaturalización (Burg y Ferraris, 2008). Ninguna interacción de los osmolitos con los residuos hidrofóbicos de la proteína desplegada supera el efecto osmofóbico, ni interfiere con el efecto hidrofóbico (Roberts, 2005). ¿Por qué el esqueleto proteico repele los solutos estabilizadores? Bennion y Daggett (Bennion y Daggett, 2004) mostraron que las metilaminas alteran la estructura del agua, produciendo una mayor organización de la misma a través de enlaces por puente de hidrógeno más fuertes entre sus moléculas. Posiblemente, el enlace peptídico de las proteínas es menos capaz de interactuar (y por tanto de hidratarse) con el agua organizada alrededor de las metilaminas que con el resto del agua (Yancey, 2005).

Por otro lado, la “teoría de la sustitución del agua” (Clegg *et al.*, 1982; Crowe *et al.*, 1990) se basa en la observación de que muchos organismos son capaces de perder más del 50% del agua celular, y volver a la completa actividad tras la rehidratación. Las estructuras celulares pueden protegerse por la acumulación de ciertos solutos compatibles y sus interacciones con superficies. Dado que, en este modelo, el agua es reemplazada por solutos, parece exactamente lo opuesto al “modelo de exclusión preferencial”. La sustitución parece ser una situación muy especial que tiene lugar en actividades de agua extremadamente bajas, mientras que el modelo de exclusión es válido para rangos de concentración de solutos más diluidos. La importancia de este modelo radica en el hecho de que la afinidad relativa de un soluto por el agua o por la proteína, bien puede ser dependiente de la concentración, especialmente cuando está implicada la desecación (por ejemplo, en actividad de agua muy baja) (Kaniyas y Acker, 2006).



**Figura I.4.** Mecanismo de estabilización de los solutos compatibles. Siguiendo el modelo de exclusión preferencial, la conformación nativa de la proteína (A) se ve favorecida por la presencia de moléculas de soluto compatible (B). Se genera una proteína plegada compacta al expulsar los solutos compatibles de la capa inmediata de hidratación de la proteína, minimizando el volumen que queda excluido para los solutos. Las esferas pequeñas representan moléculas de agua, y los esqueletos carbonados representan moléculas de ectoína.

Manzanera et al., (Manzanera *et al.*, 2004a) mostraron que, a pesar de que la hidroxiectoína funciona bien como protector extracelular, era menos efectiva que la trehalosa como estabilizador intracelular. Una posible explicación a esto, en el contexto de la hipótesis de la sustitución del agua, es que la hidroxiectoína cuenta únicamente con un grupo OH por molécula, mientras que la trehalosa tiene múltiples grupos hidroxilo. *P. putida* resultó menos tolerante a la desecación en trehalosa que en hidroxiectoína, aunque tal diferencia no se encontró en el caso de *E. coli* (Manzanera *et al.*, 2002). Se postuló que *P. putida* podría contener estructuras extracitoplasmáticas sensibles a la desecación en el periplasma o la membrana externa a las que la hidroxiectoína puede proteger, pero que no son accesibles a la trehalosa como resultado de la selectividad de las porinas.

Según Crowe et al., (Crowe *et al.*, 1990), los grupos hidroxilo (OH) pueden sustituir parcialmente a las moléculas de agua. Se ha demostrado que durante la deshidratación generalizada, se generalizan los enlaces de hidrógeno entre los grupos OH de la trehalosa y los residuos polares de las proteínas, manteniendo el estado conformacional de las proteínas secas similar al observado antes de la deshidratación. Se demostró asimismo que la trehalosa interacciona directamente con los residuos polares de la cabeza de la fosfatidilcolina deshidratada, implicando probablemente enlaces de hidrógeno entre los grupos OH de la trehalosa y el fosfato, sugiriendo con ello que la trehalosa puede jugar además un papel en la estabilización de bicapas lipídicas (Crowe *et al.*, 1990). Lippert y Galinski (Lippert y Galinski, 1992) especularon que los grupos OH libres de la hidroxiectoína y la trehalosa (pero no de la glicina betaína y la ectoína) eran necesarios para la estabilización eficaz de las enzimas ensayadas mediante formación de enlaces de hidrógeno en macromoléculas.

Las ectoínas han servido como modelo de estudio de estas interacciones gracias a sus aplicaciones biotecnológicas (Lentzen y Schwarz, 2006; Kurz, 2008). Es conocido el hecho de que la ectoína minimiza la desnaturalización que ocurre tras la retirada de las moléculas de agua haciendo el desplegamiento menos favorable. En un estudio con proteasas, se ha presumido que la ectoína desplaza el equilibrio plegamiento-desplegamiento hacia las conformaciones plegadas, preservando parcialmente así la actividad de estas enzimas (Kolp *et al.*, 2006). Los grupos de moléculas de agua alrededor de la molécula de ectoína son estables por largos períodos de tiempo, mucho más largos que en las mezclas de agua y glicerol, en las que se desintegran por la difusión de las moléculas de agua fuera de las esferas (Graf *et al.*, 2008). Los aspectos termodinámicos de la estabilización proteica por hidroxiectoína se estudiaron empleando calorimetría diferencial de barrido, con ribonucleasa A bovina como proteína modelo. Los cálculos del número de moléculas de agua adicionales que se unen a la ARNasa

desplegada arrojaron un número sorprendentemente bajo en el caso de este osmolito (Knapp *et al.*, 1999). Es más, Yu y Nagoka (Yu y Nagaoka, 2004) aportaron unos resultados interesantes a partir de simulaciones de dinámica molecular realizadas para modelos de mezclas agua-ectoína alrededor del inhibidor de quimotripsina 2 (CI2). Según sus conclusiones, la ectoína mantiene el agua en la superficie haciendo más lenta la difusión alrededor de la proteína; la desaceleración de la difusión de agua en la superficie de las proteínas debería ser de origen microscópico, estando relacionada con la estabilización cinética y termodinámica de la estructura tridimensional de las macromoléculas.

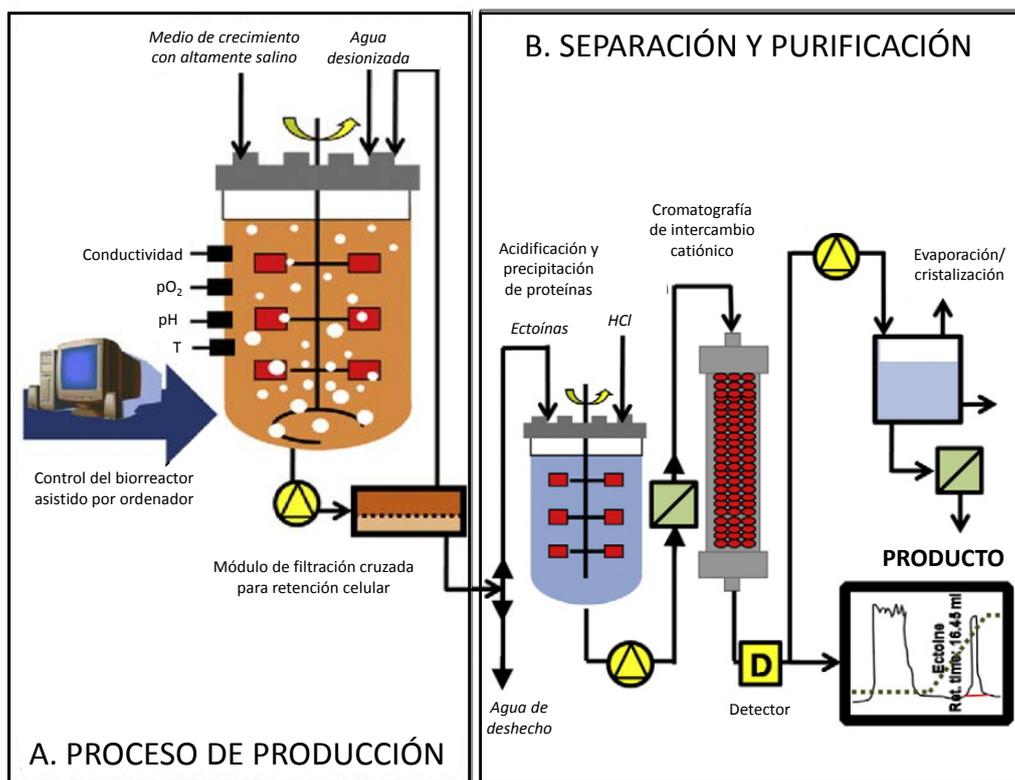
Comparando las diferentes interacciones que se observaron entre CI2 y un péptido menor, se demostró que en el modelo de exclusión pueden influir diferentes parámetros (Yu *et al.*, 2007). Así, la ectoína juega un papel indirecto en la alteración de las propiedades del disolvente y en la modificación de la estabilidad de las proteínas (Göller y Galinski, 1999). Sin embargo, debe señalarse que una posible coevolución de las estructuras proteicas con la composición celular de osmolitos no ha recibido hasta ahora demasiada atención.

## PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE ECTOÍNAS

La creciente demanda comercial de ectoínas ha provocado la multiplicación de los intentos de mejorar su producción en bacterias. En la Tabla I.1 se muestra un resumen de diferentes productores microbianos de ectoínas, así como de las fuentes de carbono y las condiciones de producción aplicadas.

Hasta mediados de los noventa no existía ningún método eficaz y optimizado para la producción de ectoínas en cantidad suficiente para ser explotado comercialmente, y éstas eran o bien extraídas de los productores naturales con bajos rendimientos (Sauer y Galinski, 1998) o (esta era el método predominante) sintetizada químicamente (Koichi *et al.*, 1991). Para conseguir un aporte a gran escala de ectoínas que satisficiera los requerimientos industriales, los métodos de producción de ectoínas se han optimizado mediante procesos de alimentación discontinua (fed-batch) y choques hipoosmóticos (ordeñado bacteriano) (Figura I.5). La razón por la cual se han desarrollado procesos de producción de ectoínas a partir de bacterias podría explicarse por la mayor especificidad en la síntesis del producto alcanzada en comparación con la síntesis química, que generalmente consiste en una serie de reacciones que rebajan el rendimiento final del proceso y que puede incrementar el número de pasos de separación y subproductos generados. Estos subproductos tienden a ser químicamente similares al producto

objetivo, a causa de la baja estereoselectividad de la síntesis química, lo que hace los procesos subsiguientes de purificación aún más dificultosos. La regio- y estereoselectividad de una biotransformación enzimática permite la producción específica de los isómeros buscados. Además, los procesos biotecnológicos tienden a ser bastante más respetuosos con el medio ambiente debido a que se evita el uso de disolventes orgánicos y de sustancias químicas tóxicas. Los métodos bacterianos, sin embargo, requieren grandes cantidades de nutrientes y condiciones de cultivo finamente ajustadas como pH, aireación y alimentación de nutrientes durante la operación de los fermentadores. Hasta el día de hoy, se han empleado principalmente sistemas de producción por lotes y de alimentación discontinua para la producción de ectoínas (Tablas I.1, I.3 y I.4).



**Figura I.V.** Diagrama general del proceso industrial de bioproducción de ectoína.

## Ectoína

El “ordeñado bacteriano” es un procedimiento de fermentación para la extracción a gran escala de metabolitos internos. Estos procesos se han descrito en varios microorganismos, como *Escherichia coli* (Tsapis y Kepes, 1976), *Synechocystis* sp. (Reed *et al.*, 1986) y algunas especies de *Halorhodospira* (Fischel y Oren, 1993), para la excreción de solutos internos. En el caso de la bioproducción de ectoína, se escogió la bacteria *H. elongata* debido ciertas características especiales que no se habían encontrado en otras especies, como una tolerancia amplia a la salinidad (siendo capaz de crecer en medios con un amplio rango de concentraciones de sal) y especialmente a causa de su capacidad de responder a un choque hipoosmótico mediante una rápida liberación de las reservas intracelulares de ectoína para resintetizarlas después rápidamente al transferir las células a un medio hiperosmótico (Figura I.5). *H. elongata* fue usada posteriormente como biofactoría para la producción de ectoína (Sauer y Galinski, 1998) (Tabla I.4). De hecho, el primer proceso patentado para la producción de ectoína con dicha bacteria correspondió a la firma alemana Bitop AG (Galinski *et al.*, 1994), que usó *H. elongata* ATCC 33173 como sintetizador de ectoína.

Sauer y Galinski (Sauer y Galinski, 1998) reportaron el cultivo aeróbico de *H. elongata*, a 25 °C, en un medio con NaCl 15% p/v (2,57 M). La estrategia consistió en una fermentación de alta densidad celular (alcanzando hasta 48 g<sub>PS</sub>/L) en un reactor tanque alimentado, proveyendo glucosa como fuente de carbono y cloruro de amonio como fuente de nitrógeno (Tabla I.4 y Figura I.5). Los choques hipoosmóticos se llevaron a cabo una vez alcanzada una densidad óptica adecuada. Se usó filtración tangencial para retener las células, al mismo tiempo que se reemplazaba el 80% del volumen del medio con agua destilada. Tras una hora para la recuperación de la osmolaridad celular interna, se retiró y recogió la misma proporción de medio conteniendo las ectoínas excretadas, y se reemplazó con el medio salino original, comenzando así un nuevo ciclo de síntesis de ectoínas. El máximo rendimiento final en ectoína resultó 155 mg/g<sub>PS</sub> (Tabla I.4).

Se han considerado también especies del género *Brevibacterium* como factorías factibles para la producción de ectoínas (Tablas I.1 y I.3). Al igual que con *H. elongata*, se ha descrito un método basado en un choque hipoosmótico usando la cepa *Brevibacterium* sp. JCM 6894 (Nagata *et al.*, 2008). A diferencia del método de Sauer y Galinski, los choques hipoosmóticos se llevaron a cabo centrifugando la biomasa y resuspendiendo los agregados celulares en agua destilada (Tabla I.4). Sin embargo, el rendimiento en ectoína y la productividad resultaron menores que los alcanzados en un proceso anteriormente descrito en *Brevibacterium epidermis*, que no empleó específicamente choques hipoosmóticos, pero en el que se aplicó un

proceso final de extracción con agua destilada y etanol (Onraedt *et al.*, 2005) y una concentración de sal 1 M. Este es un punto importante, ya que uno de los principales problemas de este tipo de procesos son los inconvenientes que implica trabajar con altas concentraciones de sal, principalmente la corrosión del equipamiento y la reducción de la velocidad de crecimiento y de la densidad celular máxima, dando lugar a una menor producción de ectoína (Tabla I.4).

Una forma de esquivar las desventajas de los medios altamente salinos en los procesos industriales de producción de ectoínas podría consistir en el uso de cepas que pudieran sintetizar este compuesto de forma natural al mismo tiempo que ser capaces de crecer en concentraciones de sal relativamente bajas. Siguiendo esta estrategia, Zhang *et al.* usaron una cepa excretora de ectoínas de *Halomonas salina* crecida en fermentadores por lotes con NaCl 0,5 M y con glutamato monosódico como fuente de carbono y nitrógeno. Llevaron a cabo además cultivos paralelos de *H. elongata* DSM 2581<sup>T</sup>, un cepa no excretora de ectoínas a modo de comparación. Este estudio señaló también la aplicación potencial de cultivos continuos de células inmovilizadas o libres para producir ectoína (Zhang *et al.*, 2009).

En la mayoría de microorganismos, la respuesta osmoprotectora implica la formación de más de un soluto compatible. En las Tablas I.1 y I.3, se representa en paralelo con la producción de ectoínas, la de otros compuestos que también pueden obtenerse, incluyendo aminoácidos como glutamato, prolina o alanina y otros. Este es el caso del halófilo *Halomonas boliviensis*, para el que se ha descrito un proceso de coproducción de ectoínas y el biopolímero poli(3-hidroxiбутирато (PHB). Por tanto, mediante la aplicación de una fermentación en un reactor con alimentación discontinua, y la recolección secuencial de cada producto, se obtuvo un rendimiento en ectoína similar o ligeramente superior a los alcanzados en procesos previamente descritos en los que la ectoína era el único compuesto objetivo. Es más, también ha sido posible la obtención de hidroxiectoína (50 mg/L) en NaCl al 15% (p/v) (Guzmán *et al.*, 2009). Más recientemente, se han aplicado dos pasos para la producción de biomasa y ectoína respectivamente por la misma bacteria. Se investigó la optimización de algunos parámetros de los nutrientes en cada paso mediante la aplicación de la metodología de la superficie de respuesta. Se obtuvo una concentración de ectoína de 6 g/L, y la productividad global fue de 9,1 g/L-día, estando entre las mayores obtenidas hasta entonces (Tabla I.4) (Van-Thuoc, Guzmán, Quillaguamán, *et al.*, 2010).

Más recientemente, Fallet *et al.*, (Fallet *et al.*, 2010) usaron un proceso integrado consistente en dos biorreactores continuos conectados en serie. Esta cascada superó en eficacia a los procesos reportados hasta el momento para la producción de ectoínas en términos de titre

y productividad (ver Tabla I.4) y ejemplifica el potencial de la optimización de procesos mediante el cultivo continuo con módulos integrados de procesado posterior del producto.

### 5-Hidroxiectoína

El derivado hidroxilado de la ectoína, la hidroxiectoína, ha sido también objeto de interés económico, dadas sus características biológicas específicas que la hacen distinta de otros solutos compatibles, como su aplicabilidad en la mejora de la termorresistencia de proteínas y células, y una mayor capacidad de estabilización que la ectoína (ver secciones previas). De ahí que se hayan descrito varios procesos para explotarla de forma eficaz. Las desventajas de la síntesis química de la ectoína resultan incluso más relevantes en el caso de la hidroxiectoína, debido a que el grupo hidroxilo añade otro centro quiral a la molécula, lo que hace la alternativa biotecnológica aún más interesante. Hasta ahora, el microorganismo explotado con este objetivo ha sido *Marinococcus* M52, rindiendo grandes cantidades de hidroxiectoína a partir de ectoína durante la fase estacionaria del cultivo (Frings *et al.*, 1995). Se desarrolló un método de producción que implicaba alta densidad celular aplicando alimentación exponencial y choques hipoosmóticos para la extracción, el cual alcanzó 134,8 mg/g<sub>PS</sub>. Schiraldi *et al.*, (Schiraldi *et al.*, 2006) mejoró aún más estos resultados, optimizando la concentración de oxígeno disuelto y la composición del medio de cultivo y obteniendo un rendimiento en hidroxiectoína máximo. De este modo, un contenido de oxígeno disuelto superior al 10% durante el cultivo dio lugar a una acumulación de hidroxiectoína más rápida que la de ectoína (alcanzando la hidroxiectoína hasta 1,6 g/L). Además, se implementó un nuevo método de extracción basado en choques hipoosmóticos acoplados a permeabilización térmica para recuperar de la biomasa los productos deseados, mejorando el paso de extracción, y con ello, también la productividad. Sin embargo, el paso de permeabilización no permite la aplicación de los ciclos de síntesis/extracción de ectoína, ya que las células no pueden ser reutilizadas, lo que impone una limitación a la optimización del bioproceso. Por último, optimizando un cultivo con alimentación discontinua en dos pasos del halófilo *H. boliviensis*, Van Thuoc *et al.*, (Van-Thuoc, Guzmán, Quillaguamán, *et al.*, 2010) logró una productividad de hidroxiectoína de 2,0 g/L, lo que supone entre 2 y 5 veces más que lo alcanzado con *Marinococcus* M52. Esta productividad de hidroxiectoína se sitúa entre las más altas reportadas hasta ahora (Tabla I.4).

## Productores heterólogos de ectoínas

Paralelamente a todo lo descrito más arriba, se han llevado a cabo muchos estudios que incluían expresión heteróloga de las rutas de síntesis de ectoínas en organismos tanto procariotas como eucariotas (Tabla I.3). Dos son los objetivos principales que han impulsado estos estudios, por un lado, los beneficios de transferir resistencia a estrés abiótico a organismos que carecen de ella de forma natural, con el fin de mejorar algunas propiedades biológicas interesantes, y por otro lado, las ventajas de deshacerse de los inconvenientes que surgen del uso de medios con alto contenido salino en los procesos industriales de producción de ectoína. En este último caso, los procariotas son usados como organismo hospedador de forma casi exclusiva, debido a que resultan mucho más adecuados para el escalado sistemático de bioprocesos y a la disponibilidad de técnicas para su modificación genética. *E. coli* es, con diferencia, el hospedador más usado, ya que es un organismo modelo de aplicaciones de ingeniería genética en biotecnología. En las dos últimas décadas, *E. coli* se ha usado como hospedador para la expresión heteróloga del grupo de genes de síntesis de ectoína (que con frecuencia aparece de forma natural como un operón), *ectA*, *ectB* y *ectC*, de diferentes halófilos (Figura I.3). Las fuentes de tales genes más usadas han sido *M. halophilus* y el propio *C. salexigens*, entre otros (Rajan, Joseph, Thampuran, James, Kumar, Viswanathan, *et al.*, 2008) (Tabla I.3).

Los genes de síntesis de ectoínas de *M. halophilus* son homólogos a los de *H. elongata* y *C. salexigens*, y presentan la misma organización en un grupo (*ectABC*). Fueron clonados y expresados por primera vez en una cepa de *E. coli*, a partir de una biblioteca genética (Louis y Galinski, 1997). *E. coli* es capaz de crecer en concentraciones de sal de hasta 0,5 M de NaCl en medio mínimo a causa de su capacidad intrínseca de ajustar sus reservas intracelulares de glutamato potásico y trehalosa. A 0,8 M de NaCl, ya se requieren para el crecimiento solutos compatibles más eficientes, como betaína o ectoína, mientras que en concentraciones superiores a 1 M, incluso los solutos compatibles aportados externamente son incapaces de hacer posible el crecimiento (Le Rudulier y Bouillard, 1983). Se han seleccionado de una biblioteca genética clones con una tolerancia osmótica incrementada, y los genes heterólogos allí clonados se fueron identificados como *ectA*, *ectB* y *ectC*, mostrando por tanto, por primera vez, como un organismo no halófilo puede expresar genes funcionales de una ruta de estrés salino. Los clones que llevaban los genes *ectABC* sintetizaron hasta 1 mmol/g<sub>PS</sub> a 0,85M de NaCl. Posteriormente se llevaron a cabo más estudios de expresión heteróloga de genes de *M. halophilus* en *E. coli*, centrándose en los mecanismos reguladores implicados en la síntesis tanto de ectoína como de los aminoácidos derivados del aspartato, sin conseguir una expresión

completa de los genes *ectABC* en *E. coli* (Bestvater *et al.*, 2008). La retroinhibición y/o represión por L-lisina, L-treonina y L-metionina, que opera normalmente en *E. coli*, demostraron ser los principales mecanismos que impedían a la cepa transformada alcanzar unos niveles intracelulares de ectoína sintetizada tan altos como los logrados por incorporación a partir del medio por la cepa silvestre. Este hecho se demostró proveyendo a la cepa transformada de *E. coli* con una aspartato quinasa desregulada alostéricamente de *Corynebacterium glutamicum*. Es más, la expresión de los genes *ectABC* promovió el crecimiento de *E. coli* en salinidades superiores a 0,5 M (Louis y Galinski, 1997; Bestvater *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguno de dichos estudios logró una acumulación y excreción de ectoínas superiores a las de los productores naturales, como *M. halophilus* o especies de *Brevibacterium*.

Por otro lado, la transformación de *E. coli* con genes de síntesis de ectoínas de *H. elongata* (He *et al.*, 2006) o *C. salexigens* (Canovas *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 2007) no fue capaz de hacer crecer a las células hospedadoras en medios altamente salinos, pero se alcanzaron altos rendimientos de acumulación intracelular de ectoína. Los genes de ectoínas de *C. salexigens* se introdujeron en una cepa de *E. coli* empleando un vector controlado por un promotor *tet*. Esta cepa transgénica sintetizó 6 g/L de ectoína con un rendimiento temporal de 40 mg/L·h, siendo la mayor parte de la ectoína excretada (Schubert *et al.*, 2007).

También se ha abordado el uso de otras especies hospedadoras, como en el caso de *B. subtilis* y *C. salexigens* DSM 3043 (Kuhlmann y Bremer, 2002; Prabhu *et al.*, 2004). Los genes de síntesis de ectoínas de una de las principales especies productoras, *B. pasteurii*, se clonaron en células de *B. subtilis*, que sintetizaban prolina como su principal soluto compatible, y la expresión heteróloga dio lugar a la producción de ectoína. Otro estudio se centró en la mejora de la bioproducción mediante “ordeñado” de hidroxiectoína. Clonando y expresando *thpD*, el gen codificante de ectoína hidroxilasa de *Streptomyces chrysomallus* en *C. salexigens*, se consiguió un 100% de conversión en hidroxiectoína de la ectoína producida de forma natural (Prabhu *et al.*, 2004). Esto permitió la producción de ectoína a una menor concentración de sal (1,7 M de NaCl), aunque no se informó del rendimiento absoluto en producción de hidroxiectoína. Debe destacarse que este es el único ejemplo de producción heteróloga de hidroxiectoína descrito en la bibliografía. De hecho, la cepa no modificada *Marinococcus* M52 continúa siendo la opción preferida para la producción a escala industrial de hidroxiectoína.

**Tabla I.3.** Características de los productores heterólogos.

Hospedador	Origen	Genes	Localización de los genes heterólogos	Rendimiento	Aumento del rango de salinidad	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	<i>Marinococcus halophilus</i>	<i>ectABC, orfA</i> <sup>1</sup>	Plásmido	1 <sup>2</sup>	De 0,51 a 0,86 M	(Louis y Galinski, 1997)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	<i>ectABC</i>	Plásmido	ND	ND	(Cánovas <i>et al.</i> , 1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>ectABC</i>	Genoma	ND	ND	(Kuhlmann y Bremer, 2002)
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	<i>Streptomyces crysomallum</i>	<i>thpD</i>	Plásmido	100 <sup>4</sup>	ND <sup>5</sup>	(Prabhu <i>et al.</i> , 2004)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Halomonas</i> sp. BIS-1	<i>ectABC</i>	Plásmido	0,003 <sup>2</sup>	ND	(He <i>et al.</i> , 2006)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Marinococcus halophilus</i>	<i>ectABC</i>	Plásmido	ND	De 0,1 a 0,3 M (a 25°C)	(Rai <i>et al.</i> , 2006)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	<i>ectABC</i>	Plásmido	1,9 <sup>3</sup>	ND	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>Marinococcus halophilus</i>	<i>ectABC</i>	Plásmido	0,4 <sup>2</sup>	De 0,51 a 0,86 M	(Bestvater <i>et al.</i> , 2008)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus halodurans</i>	<i>ectABC</i>	Plásmido	6 <sup>3</sup>	ND	(Rajan <i>et al.</i> , 2008)

1. *orfA* no está relacionado con el metabolismo de ectoínas.
2. mmol de producto/gramo de peso seco.
3. mg/mL de producto (no se determinó la biomasa).
4. Porcentaje de conversión de ectoína en hidroiectoína, el rendimiento absoluto no se determinó.
5. El organismo hospedador es halotolerante.

## SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

El primer paso que hay que tomar antes de la instalación de una bioproducción industrial es escoger el sistema de producción, en este caso el microorganismo productor de ectoína/hidroxiectoína. Dicho sistema ha de cumplir algunos requerimientos básicos que han de ser analizados previo al diseño del proceso. La temperatura de crecimiento y el pH no han de ser muy extremos, ya que impondría severas restricciones en el escalado, afectando probablemente al equipamiento usado. El microorganismo productor podría ser un productor natural de ectoínas o podría ser una cepa diseñada por ingeniería genética a partir de un microorganismo no halófilo. Se prefieren los microorganismos aerobios, ya que la respiración rinde mucha más biomasa. También ha de tenerse en cuenta una concentración de sal óptima para la síntesis de ectoínas, dados los inconvenientes que imponen los medios altamente salinos, como se ha explicado previamente.

Como las ectoínas son osmoprotectores, normalmente se acumulan en el citoplasma con el fin de compensar la osmolaridad externa, lo que implica la necesidad de un proceso adecuado de extracción. La aplicabilidad del método de “ordeñado” empleado generalmente en la extracción de ectoínas también está condicionada por el sistema de producción escogido. Las bacterias Gram negativas son mucho más sensibles a cambios en la salinidad externas, y la tasa de supervivencia depende del modo en que se aplique el choque hipoosmótico, especialmente de los cambios en el rango de salinidad. Por otro lado, las bacterias Gram positivas soportan los cambios osmóticos mucho mejor que las Gram negativas a causa de su rígida pared celular, pero no excretan los solutos compatibles acumulados intracelularmente al ser sometidas a un tratamiento de choque hipoosmótico, como es el caso de *Marinococcus* sp. M52 (Frings *et al.*, 1995). En consecuencia, el cambio de medio y el choque hipoosmótico se usan normalmente en Gram negativas para expulsar ectoínas, mientras que en Gram positivas se requiere el desalado del medio previo a la extracción de ectoínas por otros métodos.

Este proceso de “ordeñado” impone algunas restricciones en el desarrollo y la eficacia del proceso, y complica el procesado posterior del producto. Es por eso que se desea el uso de un microorganismo capaz de excretar ectoínas sin requerir cambios en la osmolaridad externa. Con tal fin, muy probablemente sea esencial el uso de un microorganismo no halófilo. Un ejemplo exitoso de esto fue *E. coli* llevando los genes del grupo *ectABC* de *C. salexigens* (Schubert *et al.*, 2007).

Como se ha dicho más arriba, existen dos tipos principales de sistemas de producción adecuados para abordar la bioproducción de ectoína: microorganismos no halófilos portadores

de genes heterólogos de síntesis de ectoína, y productores naturales (halófilos), cultivados en condiciones óptimas para la acumulación de ectoína. Dependiendo de cuál de los dos sistemas de producción se escoja, pueden surgir diferentes ventajas o inconvenientes específicos, que condicionen el establecimiento posterior del sistema de reacción. A lo largo de las secciones previas, se han dado muchos ejemplos de productores de ectoína tanto naturales como modificados genéticamente. En la mayoría de los casos, los productores naturales mostraron mayores niveles de acumulación de ectoínas, en parte a causa de la ausencia de los cuellos de botella metabólicos impuestos por el metabolismo central del organismo hospedador para el funcionamiento de la ruta de síntesis heteróloga, como se demostró en el caso de *E. coli* (Bestvater *et al.*, 2008). Además, el uso de organismos heterólogos implica ciertos inconvenientes derivados del uso de plásmidos como vectores génicos que, hasta ahora, es la opción más común a la hora de general microorganismos heterólogos sintetizadores de ectoína. El desarrollo de medios de cultivos adecuados y de las estrategias de alimentación, permitiendo una producción y recuperación óptimas de ectoína al mismo tiempo que se mantiene el cultivo de alta densidades son algunos de las mayores dificultades para muchas bacterias halófilas.

Otra estrategia factible, a medio camino entre estas dos, es la mejora de microorganismos halófilos mediante cepas mejoradas. Un ejemplo de esto son células de *H. elongata* portando el gen *thpD* de *Streptomyces crysomallum* para la mejora de la síntesis de hidroxiectoína (Prabhu *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayoría de los procesos escalables para la producción de ectoínas descritos hasta ahora, emplean productores naturales y técnicas de “ordeñado”. Por tanto, aún son necesarios mayores esfuerzos en la mejora de cepas y en la generación de productores halófilos y recombinantes no halófilos óptimos con el fin de incrementar la productividad y esquivar las desventajas de los bioprocesos clásicos.

## **SISTEMAS DE REACTOR**

De acuerdo con las características específicas del sistema de producción escogido, debe escogerse una configuración adecuada del reactor que permita una ejecución adecuada del proceso de producción. Dado que el principal papel de las ectoínas es compensar la osmolaridad externa acumulándose intracelularmente, las células deben sintetizarlas constantemente durante el crecimiento, aunque se acumulan especialmente una vez que se alcanza la fase estacionaria del cultivo. Por tanto, para una alta producción de ectoínas es importante lograr una alta densidad celular en el fermentador. Los cultivos de alta densidad celular (HCDC por sus siglas en inglés) son un tipo de fermentación que aspira a alcanzar la mayor densidad de biomasa posible. Estas

técnicas se han aplicado durante mucho tiempo para la bioproducción de antibióticos, proteínas recombinantes, metabolitos, polímeros, etc., principalmente en levaduras y mesófilos (Obón *et al.*, 1997; Riesenber y Guthke, 1999; Cánovas *et al.*, 2003; Shiloach y Fass, 2005; Bernal *et al.*, 2007), y más recientemente (desde principios de los años noventa) también en algunos tipos de extremófilos, entre ellos varios halófilos (Schiraldi y de Rosa, 2002). Las mayores densidades celulares alcanzadas en HCDC optimizados varían ampliamente dependiendo de la naturaleza del microorganismo cultivado. Los HCDC tradicionales de mesófilos y levaduras suelen alcanzar entre 100 y 250 g/L (Riesenber y Guthke, 1999), mientras que esos valores en halófilos son normalmente menores. En el caso específico de los productores de ectoínas, se encuentran en el rango de 40 a 60 g/L (Tabla I.4) (Frings *et al.*, 1995; Sauer y Galinski, 1998; Onraedt *et al.*, 2005; Schiraldi *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2009; Van-Thuoc, Guzmán, Quillaguamán, *et al.*, 2010; Fallet *et al.*, 2010).

Es ampliamente conocido que los reactores de alimentación discontinua permiten alcanzar mayores niveles de biomasa máxima que los reactores por lotes, ya que la limitación del crecimiento a causa del agotamiento de algunos componentes esenciales del medio se evita añadiendo periódicamente alimentación con o bien medio fresco o nutriente(s) seleccionado(s). Más aún, el rendimiento en biomasa puede mejorarse aún más aplicando filtración tangencial para sustituir el medio de crecimiento por otro fresco, deshaciéndose así de los metabolitos excretados como ciertos ácidos orgánicos, que inhibirían el crecimiento. La máxima densidad celular alcanzable con un determinado microorganismo depende fuertemente de las condiciones de cultivo, es decir, del pH, la aireación, la composición del medio y la temperatura (Riesenber y Guthke, 1999; Shiloach y Fass, 2005). Para la mayoría de los procesos descritos hasta ahora en la bibliografía hubo que optimizar varios de estos parámetros para incrementar los niveles de biomasa máxima. Como se discute más arriba, la temperatura y el pH raramente alcanzan valores extremos, y por tanto, son normalmente fáciles de controlar y escalar. En el caso de los microorganismos aerobios, a altas densidades celulares se requiere un mayor aporte de oxígeno, y han de aplicarse altas velocidades de agitación y aireación. Sin embargo, en las etapas finales de los cultivos de alimentación discontinua, cuando se alcanza la máxima densidad celular, es mucho más difícil mantener tal aireación (Riesenber y Guthke, 1999). Este hecho puede resultar crítico en algunos casos, especialmente en aquellos en los que la aireación afecta directamente a la velocidad de síntesis del producto. Este fue el caso de la producción de hidroxiectoína por *Marinococcus* sp. M52 (Schiraldi *et al.*, 2006). A un determinado valor de  $pO_2$ , la proporción de la síntesis de hidroxiectoína/ectoína fue constante durante la fase exponencial, y se incrementó en la fase estacionaria. El incremento del oxígeno disuelto ( $pO_2$ ) en el medio de cultivo permitió aumentar más aún la proporción de síntesis de hidroxiectoína en la fase exponencial del cultivo.

El rendimiento de los HCDC también se ve afectado por la composición del medio de cultivo. Las fuentes de carbono y nitrógeno pueden inhibir el crecimiento a altas concentraciones, y otros nutrientes y sales pueden precipitar. Por esta razón, HCDC con alimentación discontinua emplean diferentes estrategias de aporte semicontinuo de medio fresco durante el proceso, para mantener la concentración de nutrientes en un rango de concentraciones adecuado (Frings *et al.*, 1995; Schiraldi *et al.*, 2006). En muchos casos, la composición del medio ha de optimizarse para la máxima producción de ectoínas. Normalmente se usan sales de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono y energía (Tabla I.4). Para la síntesis óptima de hidroxiectoína en cultivos de *Marinococcus* sp. M52 se ajustó la proporción peptona de pescado/glucosa, y para *B. epidermis* se usó glutamato de sodio como fuente tanto de carbono como de nitrógeno (Tabla I.4) (Onraedt *et al.*, 2005).

En algunos casos, se acoplaron dos o más reactores con el fin de optimizar separadamente los procesos de crecimiento celular y de bioproducción. Una estrategia útil es la aplicación de un proceso de alimentación discontinua para la obtención de una alta masa celular en una primera etapa, y tras un paso de filtración, transferir las células a un segundo reactor con alimentación discontinua con medio fresco en el que tiene lugar la síntesis/excreción del producto. Esta estrategia es especialmente útil cuando las condiciones para un crecimiento óptimo son distintas de las necesarias para una síntesis óptima del producto. Se ha aplicado para la producción de ectoína (Van-Thuoc, Guzmán, Quillaguamán, *et al.*, 2010; Van-Thuoc, Guzmán, Thi-Hang, *et al.*, 2010), y para la obtención simultánea de ectoína y poli(3-hidroxibutirato) (Guzmán *et al.*, 2009).

Aunque los reactores de alimentación discontinua son los escogidos normalmente para los HCDC, existen otras opciones que pueden aportar otras ventajas. Los reactores continuos permiten un control fino de variables que no puede llevarse a cabo en cultivos discontinuos, y permiten alcanzar un estado estacionario metabólico/fisiológico, lo que favorece la reproducibilidad. En reactores continuos estándar, la biomasa máxima es menor que en los reactores de tipo discontinuo, debido a la pérdida continua de células en la salida del reactor. Sin embargo, se pueden alcanzar altas densidades celulares acoplando un sistema de retención, como la filtración tangencial, o mediante inmovilización celular (Riesenber y Guthke, 1999; Obón *et al.*, 1999; Cánovas *et al.*, 2003; Shiloach y Fass, 2005). Este sistema se ha aplicado recientemente en la producción de ectoína por *C. salexigens* DSM 3043 en un sistema de dos reactores continuos acoplados, el primero de ellos dedicado a la obtención de masa celular, y en el segundo, el medio con alta densidad celular del primero se sometía a un choque osmótico con medio hipotónico para liberar las ectoínas sintetizadas (Fallet *et al.*, 2010). Hasta la fecha, este es el único caso de un proceso de producción de ectoína con reactores continuos. La excelente productividad

reportada por estos autores fomenta nuevas investigaciones en el desarrollo de sistemas de cultivo continuos para la producción de solutos compatibles.

La principal ventaja del proceso de “ordeñado” es que permite la extracción del producto deseado de forma repetida, sin una pérdida significativa de la viabilidad celular. Aun así, como se ha explicado, es aplicable únicamente a microorganismos Gram negativos. De hecho, el choque hipoosmótico es ampliamente utilizado como procedimiento de extracción en muchos procesos de producción de ectoínas (Sauer y Galinski, 1998; Nagata *et al.*, 2008; Van-Thuoc, Guzmán, Quillaguamán, *et al.*, 2010; Fallet *et al.*, 2010). En el caso de las bacterias Gram positivas, el medio de cultivo se cambia por agua destilada, seguido de una extracción con disolventes orgánicos (generalmente, metanol o etanol) para una separación completa de las ectoínas (Frings *et al.*, 1995; Onraedt *et al.*, 2005). Para evitar el uso de disolventes orgánicos en la extracción, se ha descrito un método de permeabilización térmica, usando únicamente agua destilada como medio de intercambio (Schiraldi *et al.*, 2006). El inconveniente principal de estos métodos de extracción/permeabilización es que las células no se pueden reciclar y devolver al reactor, lo que hace disminuir la productividad final del proceso. Además, la clase de método de recuperación utilizado tiene un gran impacto en las operaciones posteriores de concentración y purificación del producto. Mientras que los choques hipoosmóticos con agua destilada permiten una mejor retirada de las sales antes de la extracción con disolventes orgánicos o mediante permeabilización térmica, muy frecuentemente, estos choques deben llevarse a cabo en presencia de una concentración mínima de sal para mantener las células viables. Por tanto, el producto así obtenido ha de ser desalado posteriormente durante la purificación (Sauer y Galinski, 1998; Van-Thuoc, Guzmán, Quillaguamán, *et al.*, 2010; Fallet *et al.*, 2010). En los procesos industriales, las operaciones de separación y purificación vienen acopladas a la etapa de “ordeñado” o extracción. Si el proceso de ordeñado se ha empleado para la extracción, el desalado y concentración se realizan con técnicas cromatográficas, como resinas de intercambio catiónico o de retardo iónico (Sauer y Galinski, 1998). Por otro lado, la extracción de ectoína con disolventes orgánicos arrastra muchos más contaminantes, como sales y metabolitos y proteínas celulares, y hace necesarios varios pasos de purificación adicionales (centrifugación/filtración) (Frings *et al.*, 1995; Onraedt *et al.*, 2005), lo que plantea nuevas restricciones al desarrollo del proceso.

**Tabla I.4.** Sistemas de reactor usados para la producción de ectoínas.

Microorganismo	Producto	Subproductos	Rendimiento (mg/g <sub>PS</sub> )	Productividad (g/L-día)	Biomasa máxima (g/L)	Sistema de reactor	Extracción del producto	Fuente de carbono	[NaCl]	Excreción de ectoínas tras el choque	Referencia
<i>Brevibacterium epidermis</i> DSM 20659	Ectoína		160	2	50	Fed-batch	Choque hipoosmótico, extracción con etanol	Glutamato sódico y extracto de levaduras	1 M	50%	(Onraedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Brevibacterium</i> sp. JCM 6894	Ectoína		150	0,34	X	Discontinuo	Extracción con agua	Polipeptona y extracto de levaduras	2 M	50%	(Nagata <i>et al.</i> , 2008)
<i>Firmicutes</i>	Hidroxiectoína	Glutamato	135	1,21	56	Fed-batch-Discontinuo <sup>10</sup>	Extracción con metanol	Glucosa y peptona de pescado	1,71 M	0%	(Frings <i>et al.</i> , 1995)
<i>Marinococcus</i> sp. M52	Hidroxiectoína		70-80	0,8-0,9	45	Discontinuo-Fed-batch <sup>10</sup>	Permeabilización térmica <sup>11</sup>	Glucosa y peptona de pescado	1,54 M	0% <sup>15</sup>	(Schiraldi <i>et al.</i> , 2006)
<i>Chromohalobacter salexigens</i> DSM 3043	Ectoína, hidroxiectoína		540 (Ect) 400 (H-Ect)	32,5 (Ect) 17,5 (H-Ect)	61	Continuo con retención celular	Choques hipoosmóticos	Glucosa	1,84 M	95%	(Fallet, Rohe, y Franco-lara, 2010)
<i>Escherichia coli</i> DH5α <sup>1</sup>	Ectoína		270	0,96	22	Discontinuo	Excretado por las células	Glucosa	0 M	-	(Schubert <i>et al.</i> , 2007)
<i>Halomonas boliviensis</i> DSM 15516	Ectoína, PHB	Hidroxiectoína	170	3,4	33,5	Fed-batch en dos pasos	Permeabilización térmica <sup>11</sup>	Glucosa y glutamato sódico <sup>12</sup>	21,3 <sup>14</sup> M	95%	(Guzmán <i>et al.</i> , 2009)
	Ectoína, hidroxiectoína	PHB <sup>2</sup>	154 (Ect) 36 (H-Ect)	9,1 (Ect) 2,0 (H-Ect) <sup>8</sup>	62,4 <sup>9</sup>	Fed-batch en dos pasos	Choques hipoosmóticos	Glucosa y glutamato sódico <sup>13</sup>	25,5 <sup>14</sup> M	75%	(Van-Thuoc, Guzmán, Quillaguamán, <i>et al.</i> , 2010)
<i>Halomonas elongata</i> DSM 142	Ectoína	Hidroxiectoína	1553	5,3 <sup>4</sup> , 1,3 <sup>5</sup>	48	Discontinuo-Fed-batch	Choques hipoosmóticos	Glucosa	2,57 M	90%	(Sauer y Galinski, 1998)
<i>Halomonas salina</i> DSM 59280	Ectoína		358 <sup>6</sup> , 220 <sup>7</sup>	7,9	19,4	Discontinuo	Excretado	Glutamato sódico	0,5 M	-	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)

X = no se informa.

- Transformada con el plásmido pASK con el operón *ectABC* de *C. salexigens* DSM 3043.
- La producción de PHB aumentó con cada ciclo de extracción por choque hipoosmótico.
- En mg/g<sub>PS</sub>·ciclo.
- Calculado para todo el proceso hasta el primer ciclo de extracción.
- Calculado para todo el proceso hasta el novena ciclo.
- Contenido total de ectoína.
- Ectoína excretada.8. La productividad máxima de hidroxiectoína fue 5,7 g/L-día, y se alcanzó en NaCl 3,15 M en el segundo fed-batch.

9. La densidad celular máxima fue 78,6 g/L, y se alcanzó en NaCl 2,12 M en el segundo fed-batch.

10. Con un cambio de medio, durante el fed-batch.

11. La temperatura óptima de permeabilización fue 55 °C.

12. Para favorecer la producción de PHB, se dejó de proveer glutamato desde el principio del segundo fed-batch.

13. Sólo se proveyó glutamato en el primer fed-batch.

14. La concentración de sal que se da es la del segundo fed-batch, la del primero fue 0,77 M.

15. El choque hipoosmótico se hizo a temperatura ambiente. Se obtuvo un 100% de extracción con permeabilización térmica.

## PERSPECTIVAS

En general, las metodologías actuales para la producción a gran escala de ectoínas implican cultivos de alta densidad celular con alimentación discontinua y “ordeñado bacteriano” para la extracción (Tabla I.4). Estos bioprocesos se ven afectados por numerosos inconvenientes que están aún por resolver.

Dado que la alta salinidad requerida en la mayor parte de los procesos descritos hasta ahora (hasta 2,5 M, Tabla I.1) puede afectar al equipamiento usado para el cultivo y a los procesos de separación y purificación posteriores, el principal objetivo debería centrarse en la identificación de nuevas cepas naturales productoras de ectoínas o el desarrollo de nuevos biocatalizadores capaces de producir ectoínas en concentraciones de sal bajas o moderadas. Además de esto, las células deberían poder crecer hasta altas densidades y los procesos deberían ser adaptables a los escalados demandados por la producción industrial. También queda espacio para la mejora de las operaciones de separación y purificación. Recientemente, el desarrollo de un procedimiento para extracción de ectoína mediante permeabilización celular ha puesto de manifiesto las ventajas de técnicas más respetuosas con el medio ambiente (Schiraldi *et al.*, 2006). Y además, puede ya preverse la mejora del ordeñado bacteriano o incluso el desarrollo de cepas excretoras de ectoína (Zhang *et al.*, 2009).

Es posible que la siguiente generación de tecnologías se centre en cepas productoras de ectoínas que puedan usar fuentes de carbono baratas. Un ejemplo podría ser tecnología basada en CO<sub>2</sub> (fotótrofos) o CH<sub>4</sub> (metanótrofos). Se han reportado varios casos de productores de ectoínas fotótrofos y metanótrofos. Resulta muy interesante explorar el potencial tecnológico de estos cultivos, ya que tales tecnologías podrían ser beneficiosas para el medio ambiente si están ligadas a la mitigación de CO<sub>2</sub> o CH<sub>4</sub>.

Como se ha dicho más arriba, aún se necesitan mayores esfuerzos para mejorar las estrategias de cultivo microbiano a gran escala, particularmente para microorganismos extremófilos. Una mayor eficiencia en la producción de biomasa dependerá de la capacidad para redirigir flujos metabólicos para optimizar el crecimiento y para adaptar las estrategias de cultivo actuales de manera que cumplan con las necesidades microbianas mediante el control de parámetros como la agitación, pH, salinidad y aireación. Se necesita una mejor descripción del metabolismo central de las cepas productoras, poniendo especial interés en la capacidad de usar la fuente de carbono para la generación de energía y componentes metabólicos básicos, y al mismo tiempo, una síntesis equilibrada de ectoínas. Con el fin de mejorar la eficacia metabólica, los ciclos fútiles y los mecanismos de del metabolismo *overflow* deben de poder ser descritos,

entendidos y minimizados. Asimismo debe de profundizarse en el conocimiento de los mecanismos reguladores implicados en el control coordinado de ectoínas y aminoácidos de la familia del aspartato, así como en la identificación de cuellos de botella metabólicos que deban ser objetivo de ingeniería genética. Todo esto implicará una caracterización bioquímica exhaustiva de las enzimas implicadas y de su regulación por producto.

Para terminar, se necesita abordar estas tareas desde la perspectiva de la Biología de Sistemas para la comprensión del proceso de producción de ectoínas, que describa la conexión entre las rutas biosintéticas con el metabolismo central. La base para la identificación de nuevas estrategias de optimización serán los modelos metabólicos que describan la actividad de las cepas. Un modelo que comprenda tanto el metabolismo como el reactor, y que conecte la macrocinética del reactor con la microcinética celular, debería mostrar puntos de control a niveles macroscópicos (operaciones en el reactor) y microscópicos (moleculares) en los que se pueda incrementar la conversión y la productividad.

## **CONCLUSIONES**

En esta revisión, se han discutido los usos actuales y la importancia de las ectoínas, desde la protección y estabilización de proteínas y ácidos nucleicos hasta su papel como terapéutico para ciertas enfermedades evitando daños a células completas y pérdida de viabilidad. El gran número de aplicaciones identificadas hasta ahora, junto con algunas nuevas que se prevén para los próximos años, llevará de forma segura a un crecimiento de la demanda mundial de ectoínas. En los últimos años, este hecho ha dado lugar a la multiplicación de intentos de mejorar la producción con bacterias.

Las metodologías actuales para la producción de ectoínas a gran escala surgen de estudios iniciales fundamentales de su papel en la osmoprotección microbiana. Los ingenieros de bioprocesos han desarrollado metodologías escalables para el cultivo industrial de microorganismos halófilos y para la recuperación de estos solutos compatibles. Hasta ahora, los esfuerzos de la ingeniería molecular para la generación de productores mesófilos recombinantes no han tenido demasiado éxito. Con el fin de desarrollar nuevos procesos más eficientes, han de diseñarse nuevas estrategias, y la Ingeniería Metabólica y la Biología de Sistemas son herramientas de gran valor para abordar de una forma racional el desarrollo de microorganismos mejorados. Por tanto, se prevé una cooperación más estrecha entre investigación fundamental e investigación aplicada.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aguzzi, A., y Polymenidou, M. (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell* **116**: 313-327.
- Andersson, M.M., Breccia, J.D., y Hatti-Kaul, R. (2000) Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnol Appl Biochem* **32**: 145-153.
- Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J., y Ventosa, A. (2001) *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.
- Arakawa, T., y Timasheff, S.N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**: 411-4.
- Argandoña, M., Nieto, J.J., Iglesias-Guerra, F., Calderón, M.I., García-Esteba, R., y Vargas, C. (2010) Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3575-89.
- Arora, A., Ha, C., y Park, C. (2004) Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Lett* **564**: 121-5.
- Aston, J., y Peyton, B. (2007) Response of *Halomonas campisalis* to saline stress: changes in growth kinetics, compatible solute production and membrane phospholipid fatty acid composition. *FEMS Microbiol Lett* **274**: 196-203.
- Azam, T., y Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**: 33105-13.
- Baliarda, A., Robert, H., Jebbar, M., Blanco, C., Deschamps, A., y Marrec, C. Le (2003) Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *Int J Food Microbiol* **84**: 13-20.
- Banciu, H., Sorokin, D., Tourova, T., Galinski, E., Muntyan, M., Kuenen, J., y Muyzer, G. (2008) Influence of salts and pH on growth and activity of a novel facultatively alkaliphilic, extremely salt-tolerant, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium *Thioalkalibacter halophilus* gen. nov., sp. nov. from South-Western Siber. *Extrem Life under Extrem Cond* **12**: 391-404.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E., y Engert, A. (2000) Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1572-9.
- Bennion, B., y Daggett, V. (2004) Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: a chemical chaperone at atomic resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6433-8.
- Bernal, V., Sevilla, A., Cánovas, M., y Iborra, J.L. (2007) Production of L-carnitine by secondary metabolism of bacteria. *Microb Cell Fact* **6**: 31.

- Bernard, T., y Jebbar, M. (1992) Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J Gen Microbiol* **139**: 129-136.
- Berneburg, M., Gattermann, N., Stege, H., Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T., y Krutmann, J. (1997) Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol* **66**: 271-5.
- Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kürten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., y Krutmann, J. (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* **274**: 15345-9.
- Bersch, S., Vangala, M., Schwarz, T., y Kaufmann, M. (2000) Protection of antibodies against proteolytic degradation by compatible solutes. In *Biomolecule Stabilisation. From Molecular Interpretations to Bio-Industrial Applications*. Lisboa.
- Bestvater, T., y Galinski, E. (2002) Investigation into a stress-inducible promoter region from *Marinococcus halophilus* using green fluorescent protein. *Extrem Life under Extrem Cond* **6**: 15-20.
- Bestvater, T., Louis, P., y Galinski, E.A. (2008) Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems* **4**: 12.
- Beyer, N., Driller, H., y Bunger, J. (2000) Ectoine, an innovative, multifunctional, active substance for the cosmetic industry. *Seife, Öle, Fette, Wachse* **126**: 26-9.
- Bolen, D., y Baskakov, I. (2001) The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**: 955-963.
- Botta, C., Giorgio, C. Di, Sabatier, A., y Méo, M. De (2008) Genotoxicity of visible light (400-800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *J Photochem Photobiol B* **91**: 24-34.
- Bremer, E. (2000) Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In *Bacterial Stress Response*. ASM Press, Washington D.C. pp. 77-99.
- Bringardner, B., Baran, C., Eubank, T., y Marsh, C.B. (2008) The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* **10**: 287-302.
- Brown, A.D. (1990) *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, .
- Bünger, J., Degwert, J., y Driller, H. (2001) The protective function of compatible solute ectoine on the skin cells and its biomolecules with respect to UV radiation, immunosuppression and membrane damage. *IFSCC Mag* **4**: 1-6.
- Bünger, J., y Driller, H. (1999) Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Euro Cosmet* **7**: 22-4.
- Bünger, J., y Driller, H. (2004) Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced

premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* **17**: 232-7.

Buommino, E., Schiraldi, C., Baroni, A., Paoletti, I., Lamberti, M., Rosa, M. De, y Tufano, M. (2005) Ectoine from halophilic microorganisms induces the expression of hsp70 and hsp70B' in human keratinocytes modulating the proinflammatory response. *Cell Stress Chaperones* **10**: 197-203.

Burg, M., y Ferraris, J. (2008) Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem* **283**: 7309-13.

Bursy, J., Kuhlmann, A.U., Pittelkow, M., Hartmann, H., Jebbar, M., Pierik, A.J., y Bremer, E. (2008) Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7286-96.

Bursy, J., Pierik, A.J., Pica, N., y Bremer, E. (2007) Osmotically induced synthesis of the compatible solute hydroxyectoine is mediated by an evolutionarily conserved ectoine hydroxylase. *J Biol Chem* **282**: 31147-55.

Calderón, M., Vargas, C., Rojo, F., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L., Ventosa, A., y Nieto, J. (2004) Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043T. *Microbiology* **150**: 3051-63.

Cánovas, D., Borges, N., Vargas, C., Ventosa, A., Nieto, J.J., y Santos, H. (1999) Role of N<sub>γ</sub>-acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3774-3779.

Canovas, D., Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Rhodes, D., *et al.* (1997) Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**: 25794-801.

Cánovas, D., Vargas, C., Calderón, M., Ventosa, A., y Nieto, J. (1998) Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol* **21**: 487-97.

Cánovas, M., Maiquez, J., Diego, T. De, Buend, B., Espinosa, G., y Iborra, J.L. (2003) Membrane cell retention systems for continuous production of L-carnitine using *Proteus* sp . *J Memb Sci* **214**: 101-111.

Cañamás, T., Viñas, I., Usall, J., Magan, N., Morelló, J., y Teixidó, N. (2007) Relative importance of amino acids, glycine-betaine and ectoine synthesis in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 in response to osmotic, acidic and heat stress. *Lett Appl Microbiol* **45**: 6-12.

Cayley, S., Lewis, B.A., y Record, M.T. (1992) Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **174**: 1586-95.

Clegg, J., Seitz, P., Seitz, W., y Hazlewood, C. (1982) Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. *Cryobiology* **19**: 306-16.

Cordingley, M., LaFemina, R., Callahan, P., Condra, J., Sardana, V., Graham, D., *et al.* (1990) Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Proc Natl Acad*

*Sci U S A* **87**: 8985-9.

Costa, M.S. da, Santos, H., y Galinski, E.A. (1998) An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **61**: 117-53.

Crowe, J., Carpenter, J., Crowe, L., y Anchozdoguy, T. (1990) Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* **27**: 219-231.

Cruz, P., Silva, A., Roldão, A., Carmo, M., Carrondo, M., y Alves, P. (2006) Screening of novel excipients for improving the stability of retroviral and adenoviral vectors. *Biotechnol Prog* **22**: 568-76.

Dennis, P., y Shimmin, L. (1997) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **61**: 90-104.

Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M., Green, S., Heaphy, S., Karn, J., *et al.* (1990) HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J* **9**: 4145-53.

Dobson, C. (2003) Protein folding and disease: a view from the first Horizon Symposium. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 154-60.

Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., *et al.* (2005) Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* **2**: 10.

Fallet, C., Rohe, P., y Franco-Lara, E. (2010) Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress. *Biotechnol Bioeng* **107**: 124-33.

Fernandez-Linares, L., Faure, R., Bertrand, J.C., y Gauthier, M. (1996) Ectoine as the predominant osmolyte in the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* grown on eicosane at high salinities. *Lett Appl Microbiol* **22**: 169-172.

Ferrigno, P., y Silver, P.A. (2000) Polyglutamine expansions: proteolysis, chaperones, and the dangers of promiscuity. *Neuron* **26**: 9-12.

Fischel, U., y Oren, A. (1993) Fate of compatible solutes during dilution stress in *Ectothiorhodospira marismortui*. *FEMS Microbiol Lett* **113**: 113-118.

Fligiel, S.E.G., Varani, J., Datta, S.C., Kang, S., Fisher, G.J., y Voorhees, J.J. (2003) Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 *in vitro*. *J Invest Dermatol* **120**: 842-8.

Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., y Tagliavini, F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**: 543-6.

Fourtanier, A., Bernerd, F., Bouillon, C., Marrot, L., Moyal, D., y Seité, S. (2006) Protection of skin biological targets by different types of sunscreens. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **22**: 22-32.

- Frings, E., Sauer, T., y Galinski, E.A. (1995) Production of hydroxyectoine: high cell-density cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *J Bacteriol* **43**: 53-61.
- Furusho, K., Yoshizawa, T., y Shoji, S. (2005) Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis* **20**: 170-8.
- Galinski, E.A., y Herzog, R.M. (1990) The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ectothiorhodospira halochloris*). *Arch Microbiol* **153**: 607-613.
- Galinski, E.A., Pfeiffer, H.P., y Trüper, H.G. (1985) 1,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid. A novel cyclic amino acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira*. *Eur J Biochem* **149**: 135-9.
- Galinski, E.A., Stein, M., Amendt, B., y Kinder, M. (1997) The kosmotropic (structure-forming) effect of compensatory solutes. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* **117**: 357-365.
- Galinski, E.A., Trüper, H.G., y Sauer, T. (1994) Prod. of natural substances, e.g. new hydroxy:ectoin deriv — by in vitro release from cells, esp. microorganisms, following application of stress. .
- García-Esteba, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J.J., y Vargas, C. (2006) The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol* **188**: 3774-84.
- García-Esteba, R., Cánovas, D., Ventosa, A., Csonka, L.N., Nieto, J.J., y Vargas, C. (2006) Osmoprotection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by N $\gamma$ -acetyldiaminobutyrate, the precursor of the compatible solute ectoine. *Syst Appl Microbiol* **29**: 626-633.
- Giannessi, D., Caselli, C., Vitale, R.L., Crucean, A., Murzi, B., Ry, S. Del, *et al.* (2003) A possible cardioprotective effect of heat shock proteins during cardiac surgery in pediatric patients. *Pharmacol Res* **48**: 519-29.
- Göller, K., y Galinski, E.A. (1999) Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives. *J Mol Catal B Enzym* **7**: 37-45.
- González-Ulloa, M., y Flores, E.S. (1965) Senility of the face: Basic study to understand its causes and effects. *Plast Reconstr Surg* **36**: 239-46.
- Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F., y Driller, H. (2008) The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin Dermatol* **26**: 326-33.
- Grammann, K., Volke, A., y Kunte, H.J. (2002) New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581(T). *J Bacteriol* **184**: 3078-85.
- Grammel, N. (2000) Molekulargenetische und biochemische Analyse der Biosynthese von 2-Methyl-4-carboxy-3,4,5,6-tetrahydropyrimidin und seinem 5-Hydroxyderivat, zwei

salzstreßinduzierbaren Osmolyten, in *Streptomyces chrysomallus*. .

Grant, D., Wall, W., Mimeault, R., Zhong, R., Ghent, C., Garcia, B., *et al.* (1990) Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet* **335**: 181-4.

Grether-Beck, S., Timmer, A., Felsner, I., Brenden, H., Brammertz, D., y Krutmann, J. (2005) Ultraviolet A-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to ceramide de novo synthesis. *J Invest Dermatol* **125**: 545-53.

Guzmán, H., Van-Thuoc, D., Martín, J., Hatti-Kaul, R., y Quillaguamán, J. (2009) A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 1069-77.

Hai, T., Oppermann-Sanio, F.B., y Steinbüchel, A. (2002) Molecular characterization of a thermostable cyanophycin synthetase from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain MA19 and in vitro synthesis of cyanophycin and related polyamides. *Appl Environ Microbiol* **68**: 93-101.

Harjes, S., Scheidig, A., y Bayer, P. (2004) Expression, purification and crystallization of human 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate synthetase 1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 350-2.

Harper, J.D., y Lansbury, P.T. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* **66**: 385-407.

He, J., Huang, X., Gu, L.-F., Jiang, J.-D., y Li, S.-P. (2006) Cloning of the ectoine biosynthesis gene *ectABC* from *Halomonas* sp. BYS-1 and salt stressed expression in *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Sin* **46**: 28-32.

Heinrich, U., Garbe, B., y Tronnier, H. (2007) In vivo assessment of Ectoin: a randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Skin Pharmacol Physiol* **20**: 211-8.

Iizuka, H., Ishida-Yamamoto, A., Kajita, S., Tsutsui, M., y Ohkuma, N. (1988) Effects of UVB irradiation on epidermal adenylate cyclase responses in vitro: its relation to sunburn cell formation. *Arch Dermatol Res* **280**: 163-7.

Inbar, L., y Lapidot, A. (1988) The structure and biosynthesis of new tetrahydropyrimidine derivatives in actinomycin D producer *Streptomyces parvulus*. Use of <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-labeled L-glutamate and <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**: 16014-22.

Jebbar, M., Sohn-Bösser, L., Bremer, E., Bernard, T., y Blanco, C. (2005) Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol* **187**: 1293-304.

Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T., y Blanco, C. (1992) Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *J Bacteriol* **174**: 5027-35.

Jeffries, T.W. (2005) Ethanol fermentation on the move. *Nat Biotechnol* **23**: 40-41.

Joentgen, W., Groth, T., Steinbüchel, A., Hai, T., y Oppermann, F. (2001) Polyaspartic acid

homopolymers and copolymers, biotechnological production and use thereof. .

Kakizuka, A. (1998) Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders? *Trends Genet* **14**: 396-402.

Kanapathipillai, M., Ku, S.H., Girigoswami, K., y Park, C.B. (2008) Small stress molecules inhibit aggregation and neurotoxicity of prion peptide 106-126. *Biochem Biophys Res Commun* **365**: 808-13.

Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M., y Park, C.B. (2005) Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid. *FEBS Lett* **579**: 4775-80.

Kanias, T., y Acker, J.P. (2006) Mammalian cell desiccation: Facing the challenges. *Cell Preserv Technol* **4**: 253-277.

Keshavarz, K. (2000) Nonphytate phosphorus requirement of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. *Poult Sci* **79**: 748-63.

Knapp, S., Ladenstein, R., y Galinski, E.A. (1999) Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extrem Life under Extrem Cond* **3**: 191-8.

Koichi, M., Mitsuhiro, M., Tatsuo, N., y Yoshio, S. (1991) Preparation of tetrahydropyrimidine derivatives used for medical agent, etc., by reacting e.g. acetonitrile with e.g. methyl 2,4-diaminobutyrate. .

Kolp, S., Pietsch, M., Galinski, E.A., y Gütschow, M. (2006) Compatible solutes as protectants for zymogens against proteolysis. *Biochim Biophys Acta* **1764**: 1234-42.

Kong, S.E., Blennerhassett, L.R., Heel, K.A., McCauley, R.D., y Hall, J.C. (1998) Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg* **68**: 554-61.

Krutmann, J. (2000) Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci* **23 Suppl 1**: S22-6.

Krutmann, J., y Schroeder, P. (2009) Role of mitochondria in photoaging of human skin: The defective powerhouse model. *J Invest Dermatol Symp Proc* **14**: 44-9.

Kuhlmann, A.U., y Bremer, E. (2002) Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **68**: 772-783.

Kunte, H.J. (2006) Osmoregulation in bacteria: Compatible solute accumulation and osmosensing. *Environ Chem* **3**: 94.

Kurz, M. (2008) Compatible solute influence on nucleic acids: many questions but few answers. *Saline Systems* **4**: 6.

Lanyi, J.K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**: 272-90.

Lapidot, A., Ben-Asher, E., y Eisenstein, M. (1995) Tetrahydropyrimidine derivatives inhibit binding of a Tat-like, arginine-containing peptide, to HIV TAR RNA *in vitro*. *FEBS Lett* **367**: 33-8.

Lapidot, A., Iakobashvili, R., y Malin, G. (2006) Methods for DNA amplification and sequencing. .

- Lee, J.C., y Timasheff, S.N. (1981) The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem* **256**: 7193-201.
- Lentzen, G., y Schwarz, T. (2006) Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 623-34.
- Leung, T.K., Rajendran, M.Y., Monfries, C., Hall, C., y Lim, L. (1990) The human heat-shock protein family. Expression of a novel heat-inducible HSP70 (HSP70B') and isolation of its cDNA and genomic DNA. *Biochem J* **267**: 125-32.
- Lippert, K., y Galinski, E. (1992) Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 61-65.
- Liu, Y., y Bolen, D.W. (1995) The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* **34**: 12884-91.
- Lo, C.-C., Bonner, C.A., Xie, G., D'Souza, M., y Jensen, R.A. (2009) Cohesion group approach for evolutionary analysis of aspartokinase, an enzyme that feeds a branched network of many biochemical pathways. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **73**: 594-651.
- Louis, P., y Galinski, E.A. (1997) Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**: 1141-1149.
- Louis, P., Trüper, H.G., y Galinski, E.A. (1994) Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 684-688.
- Macnee, W. (2007) Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* **28**: 479-513, v.
- Malin, G., Iakobashvili, R., y Lapidot, A. (1999) Effect of tetrahydropyrimidine derivatives on protein-nucleic acids interaction. Type II restriction endonucleases as a model system. *J Biol Chem* **274**: 6920-9.
- Malin, G., y Lapidot, A. (1996) Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces strains* and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. *J Bacteriol* **178**: 385-95.
- Manzanera, M., García de Castro, A., Tøndervik, A., Rayner-Brandes, M., Strøm, A.R., y Tunnacliffe, A. (2002) Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4328-33.
- Manzanera, M., Vilchez, S., y Tunnacliffe, A. (2004a) High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 347-52.
- Manzanera, M., Vilchez, S., y Tunnacliffe, A. (2004b) Plastic encapsulation of stabilized *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3143-5.
- Mascellani, N., Liu, X., Rossi, S., Marchesini, J., Valentini, D., Arcelli, D., et al. (2007) Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays. *BMC Biotechnol* **7**: 82.
- Maskow, T., y Babel, W. (2001) Calorimetrically obtained information about the efficiency of

- ectoine synthesis from glucose in *Halomonas elongata*. *Biochim Biophys Acta* **1527**: 4-10.
- Maskow, T., y Kleinsteuber, S. (2004) Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol. *Extrem Life under Extrem Cond* **8**: 133-41.
- Moghaieb, R.E.A., Tanaka, N., Saneoka, H., Murooka, Y., Ono, H., Morikawa, H., *et al.* (2006) Characterization of salt tolerance in ectoine-transformed tobacco plants (*Nicotiana tabacum*): photosynthesis, osmotic adjustment, and nitrogen partitioning. *Plant Cell Environ* **29**: 173-82.
- Morbach, S., y Krämer, R. (2002) Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochem a Eur J Chem Biol* **3**: 384-97.
- Motitschke, L., Driller, H.J., y Galinski, E.A. (2002) Ectoin and ectoin derivatives as moisturizers in cosmetics. .
- Murphy, R. (2002) Peptide aggregation in neurodegenerative disease. *Annu Rev Biomed Eng* **4**: 155-74.
- Nagata, S., Maekawa, Y., Ikeuchi, T., Wang, Y.B., y Ishida, A. (2002) Effect of compatible solutes on the respiratory activity and growth of *Escherichia coli* K-12 under NaCl stress. *J Biosci Bioeng* **94**: 384-9.
- Nagata, S., Wang, Y., Oshima, A., Zhang, L., Miyake, H., Sasaki, H., y Ishida, A. (2008) Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock. *Biotechnol Bioeng* **99**: 941-948.
- Nagata, S., y Wang, Y.B. (2001) Accumulation of ectoine in the halotolerant *Brevibacterium* sp. JCM 6894. *J Biosci Bioeng* **91**: 288-93.
- Nakayama, H., Yoshida, K., Ono, H., Murooka, Y., y Shinmyo, A. (2000) Ectoine, the compatible solute of *Halomonas elongata*, confers hyperosmotic tolerance in cultured tobacco cells. *Plant Physiol* **122**: 1239-47.
- Naughton, L., Blumerman, S.L., Carlberg, M., y Boyd, E.F. (2009) Osmoadaptation among *Vibrio* species and unique genomic features and physiological responses of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2802-10.
- Obón, J.M., Maiquez, J.R., Cánovas, M., Kleber, H.P., y Iborra, J.L. (1999) High-density *Escherichia coli* cultures for continuous L(-)-carnitine production. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 760-4.
- Obón, J.M., Máiquez, J.R., Iborra, J.L., Cánovas, M., y Kleber, H.-P. (1997) L(-)-Carnitine production with immobilized *Escherichia coli* cells in continuous reactors. *Enzyme Microb Technol* **0029**: 531-536.
- Omata, Y., Lewis, J.B., Rotenberg, S., Lockwood, P.E., Messer, R.L.W., Noda, M., *et al.* (2006) Intra- and extracellular reactive oxygen species generated by blue light. *J Biomed Mater Res A* **77**: 470-7.
- Ono, H., Okuda, M., Tongpim, S., Imai, K., Shinmyo, A., Sakuda, S., *et al.* (1998) Accumulation of compatible solutes, ectoine and hydroxyectoine, in a moderate halophile, *Halomonas elongata* KS3 isolated from dry salty land in Thailand. *J Ferment Bioeng* **85**: 362-368.

- Onraedt, A.E., Walcarius, B.A., Soetaert, W.K., y Vandamme, E.J. (2005) Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnol Prog* **21**: 1206-12.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334-348.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S., y Galinski, E.A. (2002) Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extrem Life under Extrem Cond* **6**: 491-8.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., *et al.* (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10962-6.
- Paulson, H.L. (1999) Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am J Hum Genet* **64**: 339-45.
- Perutz, M.F. (1999) Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem Sci* **24**: 58-63.
- Peters, A., Klot, S. von, Heier, M., Trentinaglia, I., Hörmann, A., Wichmann, H.E., y Löwel, H. (2004) Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med* **351**: 1721-30.
- Peters, P., y Galinski, E.A. (1990) The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 157-162.
- Pflaum, M., Kielbassa, C., Garmyn, M., y Epe, B. (1998) Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutat Res* **408**: 137-46.
- Pflücker, F., Bünger, J., Hitzel, S., Witte, G., Beck, J., Lergenmüller, M., y Driller, H. (2005) Complete photo protection: Going beyond visible endpoints. *SÖFW-Journal* **131**: 20-30.
- Pflughoeft, K., Kierek, K., y Watnick, P. (2003) Role of ectoine in *Vibrio cholerae* osmoadaptation. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5919-27.
- Poolman, B., y Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29**: 397-407.
- Prabhu, J., Schauwecker, F., Grammel, N., Keller, U., y Bernhard, M. (2004) Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3130-3132.
- Pul, U., Wurm, R., y Wagner, R. (2007) The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism, allostery and macromolecular crowding. *J Mol Biol* **366**: 900-15.
- Qu, Y., Bolen, C.L., y Bolen, D.W. (1998) Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9268-73.
- Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L., y Sauder, D.N. (2006) Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol* **55**: 1-19.
- Rai, M., Pal, M., Sumesh, K.V., Jain, V., y Sankaranarayanan, A. (2006) Engineering for biosynthesis of ectoine (2-methyl 4-carboxy tetrahydro pyrimidine) in tobacco chloroplasts leads

- to accumulation of ectoine and enhanced salinity tolerance. *Plant Sci* **170**: 291-306.
- Rajan, L., Joseph, T.C., Thampuran, N., James, R., Kumar, K., y Viswanathan, C. (2008) Cloning and heterologous expression of ectoine biosynthesis genes from *Bacillus halodurans* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **30**: 1403-7.
- Rajan, L., Joseph, T.C., Thampuran, N., James, R., Kumar, K., Viswanathan, C., y Bansal, K.C. (2008) Cloning and heterologous expression of ectoine biosynthesis genes from *Bacillus halodurans* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **30**: 1403-7.
- Raymond, J.C., y Sistro, W.R. (1969) *Ectothiorhodospira halophila*: A new species of the genus *Ectothiorhodospira*. *Arch Mikrobiol* **69**: 121-126.
- Reed, R.H., Warr, S.R.C., Kerby, N.W., y Stewart, W.D.P. (1986) Osmotic shock-induced release of low molecular weight metabolites from free-living and immobilized cyanobacteria. *Enzyme Microb Technol* **8**: 101-104.
- Riesenberg, D., y Guthke, R. (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 422-30.
- Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M., y Buc, H. (2001) A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol Microbiol* **42**: 1311-23.
- Roberts, M.F. (2004) Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: update 2004. *Front Biosci* **9**: 1999-2019.
- Roberts, M.F. (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **1**: 5.
- Roesser, M., y Müller, V. (2001) Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ Microbiol* **3**: 743-54.
- Roy, S., Delling, U., Chen, C.H., Rosen, C.A., y Sonenberg, N. (1990) A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev* **4**: 1365-73.
- Rudulier, D. Le, y Bouillard, L. (1983) Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Appl Environ Microbiol* **46**: 152-9.
- Sander, C.S., Chang, H., Hamm, F., Elsner, P., y Thiele, J.J. (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* **43**: 326-35.
- Sauer, T., y Galinski, E. (1998) Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* **59**: 128.
- Saum, S.H., y Müller, V. (2008) Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environ Microbiol* **10**: 716-26.
- Schiraldi, C., Maresca, C., Catapano, A., Galinski, E.A., y Rosa, M. De (2006) High-yield cultivation of *Marinococcus* M52 for production and recovery of hydroxyectoine. *Res Microbiol* **157**: 693-9.
- Schiraldi, C., y Rosa, M. de (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol* **20**: 515-21.

- Schmitz, R.P.H., y Galinski, E.A. (1996) Compatible solutes in luminescent bacteria of the genera *Vibrio*, *Photobacterium* and *Photorhabdus* (*Xenorhabdus*): occurrence of ectoine, betaine and glutamate. *FEMS Microbiol Lett* **142**: 195-201.
- Schnoor, M., Voss, P., Cullen, P., Böking, T., Galla, H.-J., Galinski, E.A., y Lorkowski, S. (2004) Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 867-72.
- Schröder, O., y Wagner, R. (2002) The bacterial regulatory protein H-NS: A versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol Chem* **383**: 945-60.
- Schubert, T., Maskow, T., Benndorf, D., Harms, H., y Breuer, U. (2007) Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3343-7.
- Schwamborn, M. (1998) Chemical synthesis of polyaspartates: a biodegradable alternative to currently used polycaroxylate homo- and copolymers. *Polym Degrad Stab* **59**: 39-45.
- Severin, J., Wohlfarth, A., y Galinski, E.A. (1992) The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629-1638.
- Shiloach, J., y Fass, R. (2005) Growing *E. coli* to high cell density: a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* **23**: 345-57.
- Sideris, E.G., Papageorgiou, G.C., Charalampous, S.C., y Vitsa, E.M. (1981) A spectrum response study on single strand DNA breaks, sister chromatid exchanges, and lethality induced by phototherapy lights. *Pediatr Res* **15**: 1019-23.
- Souil, E., Capon, A., Mordon, S., Dinh-Xuan, A.T., Polla, B.S., y Bachelet, M. (2001) Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. *Br J Dermatol* **144**: 260-6.
- Stahl, C.H., Roneker, K.R., Thornton, J.R., y Lei, X.G. (2000) A new phytase expressed in yeast effectively improves the bioavailability of phytate phosphorus to weanling pigs. *J Anim Sci* **78**: 668-74.
- Sydlik, U., Gallitz, I., Albrecht, C., Abel, J., Krutmann, J., y Unfried, K. (2009) The compatible solute ectoine protects against nanoparticle-induced neutrophilic lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **180**: 29-35.
- Talibart, R., Jebbar, M., Gouesbet, G., Himdi-Kabbab, S., Wróblewski, H., Blanco, C., y Bernard, T. (1994) Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance. *J Bacteriol* **176**: 5210-7.
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., y Anderson, R.L. (1996) A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* **1**: 23-8.
- Tetsch, L., y Kunte, H.J. (2002) The substrate-binding protein TeaA of the osmoregulated ectoine transporter TeaABC from *Halomonas elongata*: purification and characterization of recombinant TeaA. *FEMS Microbiol Lett* **211**: 213-8.

- Timasheff, S.N. (2002) Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry* **41**: 13473-82.
- Tolmasoff, J.M., Ono, T., y Cutler, R.G. (1980) Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 2777-81.
- Tsapis, A., y Kepes, A. (1976) Transient breakdown of the permeability barrier of the membrane of *Escherichia coli* upon hypoosmotic shock. *Biochim Biophys Acta* **469**: 1-12.
- Ullah, A.H. (1988) Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. *Prep Biochem* **18**: 443-58.
- Van-Thuoc, D., Guzmán, H., Quillaguamán, J., y Hatti-Kaul, R. (2010) High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process. *J Biotechnol* **147**: 46-51.
- Van-Thuoc, D., Guzmán, H., Thi-Hang, M., y Hatti-Kaul, R. (2010) Ectoine production by *Halomonas boliviensis*: optimization using response surface methodology. *Mar Biotechnol* **12**: 586-93.
- Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., y Nieto, J.J. (2008) Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* **4**: 14.
- Vargas, C., Jebbar, M., Carrasco, R., Blanco, C., Calderón, M.I., Iglesias-Guerra, F., y Nieto, J.J. (2006) Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Appl Microbiol* **100**: 98-107.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., y Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504-44.
- Vermeulen, V., y Kunte, H.J. (2004) *Marinococcus halophilus* DSM 20408T encodes two transporters for compatible solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM. *Extrem Life under Extrem Cond* **8**: 175-84.
- Wang, A., y Bolen, D.W. (1997) A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* **36**: 9101-8.
- Wang, Y., y Zhang, L. (2010) Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. *J Mol Catal B Enzym* **62**: 90-95.
- Wei, L., Wedeking, A., Buttner, R., Kalff, J.C., Tolba, R.H., y Echten-Deckert, G. van (2009) A natural tetrahydropyrimidine protects small bowel from cold ischemia and subsequent warm *in vitro* reperfusion injury. *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell bBiology* **76**: 212-20.
- Welsh, D.T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Lett* **24**: 263-90.
- Wiggins, P.M. (1990) Role of water in some biological processes. *Microbiol Rev* **54**: 432-49.

- Wohlfarth, A., Severin, J., y Galinski, E.A. (1990) The spectrum of compatible solutes in heterotrophic halophilic eubacteria of the family Halomonadaceae. *J Gen Microbiol* **136**: 705-712.
- Yancey, P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**: 2819-30.
- Yu, I., Jindo, Y., y Nagaoka, M. (2007) Microscopic understanding of preferential exclusion of compatible solute ectoine: direct interaction and hydration alteration. *J Phys Chem B* **111**: 10231-8.
- Yu, I., y Nagaoka, M. (2004) Slowdown of water diffusion around protein in aqueous solution with ectoine. *Chem Phys Lett* **388**: 316-321.
- Zhang, L., Lang, Y., Wang, C., y Nagata, S. (2008) Promoting effect of compatible solute ectoine on the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* CICC10232. *Process Biochem* **43**: 642-646.
- Zhang, L., Wang, Y., Zhang, C., Wang, Y., Zhu, D., Wang, C., y Nagata, S. (2006) Supplementation effect of ectoine on thermostability of phytase. *J Biosci Bioeng* **102**: 560-3.
- Zhang, L.-H., Lang, Y.-J., y Nagata, S. (2009) Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extrem Life under Extrem Cond* **13**: 717-24.
- Zou, Y., Hernandez, F., Burgos, E., Martinez, L., Gonzalez-Reyes, S., Fernandez-Dumont, V., *et al.* (2005) Bacterial translocation in acute rejection after small bowel transplantation in rats. *Pediatr Surg Int* **21**: 208-11.

## **CAPÍTULO II**

### **Objetivos**



## OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta Tesis es el que queda recogido en su título, es decir, analizar las características globales más significativas del metabolismo de *C. salexigens*, y su relación con las adaptaciones que ha desarrollado este halófilo para mantener la homeostasis celular en un rango de salinidades amplio. Se busca además aprovechar este conocimiento para estudiar las condiciones óptimas de cultivo que permitan mejor las estrategias de producción de ectoínas. Para un problema de estas características se debe partir de un enfoque doble: por un lado recopilar y analizar la información disponible en recursos bibliográficos e informáticos (anotación genómica, bases de datos genéticos y metabólicos públicas...), y con base en este conocimiento dirigir la planificación del trabajo experimental. Este objetivo amplio puede desglosarse en los siguientes objetivos subordinados:

1. Recopilar la información genética y metabólica de *C. salexigens* disponible en la anotación genómica, y bases de datos metabólicas, para obtener una imagen del metabolismo central previa que ayude a diseñar los experimentos planteados en los objetivos siguientes. Se hará hincapié en el análisis de las rutas del metabolismo de las fuentes de carbono y nitrógeno y las rutas relacionadas con la producción de solutos compatibles (**Capítulo III**).
2. Analizar el metabolismo de *C. salexigens* a diferentes salinidades. Determinar los principales flujos extracelulares a diferentes salinidades: síntesis de biomasa, ectoínas, consumo de fuente de carbono (glucosa), consumo de fuente de nitrógeno (amonio), y excreción de productos secundarios (ácidos orgánicos) (**Capítulo III**).
3. Determinar flujos de carbono intracelulares a diferentes salinidades. Se emplearán fuentes de carbono marcadas isotópicamente que permitan identificar la contribución individual al flujo metabólico de rutas paralelas. Se analizará la topicidad de las principales rutas de interés, estableciéndose la contribución de cada una de ellas a la incorporación de la marca a los productos metabólicos que se puedan analizar. Se hará hincapié en las rutas relacionadas con el consumo de la fuente de carbono y en la formación de precursores biosintéticos de ectoínas. (**Capítulo III**).
4. Estudiar el efecto de la composición del medio sobre el crecimiento, la síntesis de ectoínas y la excreción de productos secundarios, en particular de la proporción de fuentes de carbono y nitrógeno en el medio, y del efecto del tipo de fuente de nitrógeno utilizada. (**Capítulo IV**).

5. Aplicar la información obtenida del objetivo 4 para diseñar una composición de medio de cultivo y una estrategia de cultivo dirigidas a maximizar la producción de biomasa y ectoínas y minimizar la producción de productos secundarios. **(Capítulo IV)**.
6. Analizar la fisiología de *C. salexigens* durante el consumo de fructosa como fuente de carbono y compararla con el consumo de glucosa. Analizar el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento, la producción de ectoínas y la excreción de ácidos orgánicos. **(Capítulo V)**.
7. Identificar las rutas de consumo de la fuente de carbono basado en la información disponible en bases de datos; demostrar experimentalmente y cuantificar la contribución de estas rutas para la fisiología celular. Asignar algunos de los pasos enzimáticos clave de las rutas empíricamente. **(Capítulo V)**.

## CAPÍTULO III

# La relación entre metabolismo central y osmoadaptación en *Chromohalobacter salexigens*

*Este capítulo es una adaptación del siguiente trabajo:*

Pastor J M, Bernal V, Salvador M, Argandoña M, Vargas C, Csonka L N, Sevilla A, Iborra J L, Nieto J J, Cánovas M.

*“Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium Chromohalobacter salexigens”*

The Journal of Biological Chemistry 2013;288:17769.



**RESUMEN**

La osmoadaptación bacteriana implica la acumulación en el citoplasma de solutos compatibles para contrarrestar la osmolaridad extracelular. La bacteria halotolerante y halófila *Chromohalobacter salexigens* es capaz de crecer en concentraciones de NaCl de hasta 3 M en medio mínimo gracias a la síntesis *de novo* de ectoínas. Esta ruta de síntesis está osmorregulada, y su funcionamiento sobrecarga las rutas del metabolismo central retirando gran cantidad de intermediarios metabólicos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT). En consecuencia, el metabolismo de *C. salexigens* se ha adaptado para sostener esta ruta biosintética, siendo más eficiente a alta salinidad que a baja salinidad, como ponen de manifiesto el menor consumo de glucosa, menor acumulación de subproductos, y un mayor rendimiento en biomasa. A baja salinidad, se acumulan extracelularmente productos secundarios (principalmente gluconato, piruvato y acetato). Empleando [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]-, [6-<sup>13</sup>C]- y [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]glucosa como fuente de carbono, se logró determinar qué rutas del metabolismo central están implicadas en la síntesis de ectoínas a partir de glucosa. *C. salexigens* utiliza la ruta de Entner-Doudoroff con preferencia sobre la ruta glucolítica estándar para el catabolismo de la glucosa, y la actividad anaplerótica es alta para reponer los intermediarios del CAT que se retiran para la síntesis de ectoínas. Las razones entre flujos metabólicos a alta y baja salinidad resultaron similares, lo que revela cierta rigidez metabólica, debida probablemente a la especialización en sostener altos flujos de biosíntesis, y explica en parte por qué los rendimientos metabólicos se ven tan afectados por la salinidad. Este trabajo representa una importante contribución para la elucidación de las adaptaciones metabólicas específicas en bacterias acumuladoras de solutos compatibles.

## INTRODUCCIÓN

En los microorganismos halófilos el crecimiento requiere unos niveles de concentración salina relativamente altos. Debido a la diversidad de ambientes en los que pueden desarrollarse, estos microorganismos tienen fisiologías muy variadas. La diversidad metabólica de los microorganismos halófilos y halotolerantes se halla condicionada por la adaptación a nichos ambientales específicos (un caso muy evidente es el de las bacterias alcalófilas, metanófilas o termofílicas) así como por los mecanismos de osmoadaptación que han desarrollado para enfrentarse a la salinidad (Cayol *et al.*, 2000; Oren y Mana, 2003; Trotsenko y Khmelenina, 2002). Como consecuencia de todo ello, las rutas metabólicas que escogen para la asimilación de las fuentes de carbono son igualmente diversas.

Globalmente, las diferentes estrategias de osmoadaptación se pueden clasificar en dos tipos principales. Las arqueas aerobias extremadamente halófilas, bacterias fermentadoras halófilas y la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* emplean la estrategia “*salt-in*”, consistente en la acumulación de iones K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en el citoplasma bacteriano (Oren, 1999; Oren *et al.*, 2002; Roberts, 2004). Una mayor variedad de organismos, entre ellos todas las bacterias mesófilas, algas halófilas, arqueas metanógenas halófilas y bacterias aerobias halotolerantes y halófilas, emplean la estrategia “*organic solutes-in*”, que implica la acumulación de solutos orgánicos compatibles (Severin *et al.*, 1992). Entre las eubacterias halófilas que emplean la estrategia “*organic solutes-in*” es más frecuente una aerobiosis estricta debido a que la síntesis de solutos compatibles es un proceso energético y metabólicamente muy costoso (Ventosa *et al.*, 1998). Químicamente, los solutos compatibles se pueden clasificar en unas pocas familias de compuestos: azúcares (sacarosa y trehalosa), polioles (glicerol, glucosilglicerol, manosilglicerol y arabitol, entre otros), aminoácidos (glutamina y derivados, prolina, alanina), aminas cuaternarias (betaínas y colina) y ectoínas (ectoínas y  $\beta$ -hidroxiectoína). La ectoína es uno de los solutos compatibles más ampliamente distribuidos. Muchas especies productoras de ectoína sintetizan al mismo tiempo cantidades menores de hidroxiectoína (Pastor *et al.*, 2010). Cuando están presentes en el medio de crecimiento, tanto estos compuestos como sus precursores pueden ser incorporados del mismo. Cuando las células han de crecer en medios carentes de solutos compatibles, estos compuestos sólo pueden acumularse tras una síntesis *de novo* (Vargas *et al.*, 2008).

*Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 (anteriormente *Halomonas elongata* DSM 3043) es una  $\gamma$ -proteobacteria de la familia Halomonadaceae (Arahal *et al.*, 2001). Esta bacteria es capaz de crecer en uno de los rangos de salinidad más amplios encontrados en la naturaleza (Canovas *et al.*, 1997; Arahal *et al.*, 2001). En *C. salexigens*, la osmoadaptación se

consigue principalmente mediante la acumulación de ectoína e hidroxiectoína (Vargas *et al.*, 2008). La ruta de síntesis de ectoínas se estableció a partir de estudios realizados en *C. salexigens* y *Halomonas elongata* (Peters y Galinski, 1990; Eisenberg, 1991; Cánovas *et al.*, 1999; Prabhu *et al.*, 2004; García-Esteva *et al.*, 2006).

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *C. salexigens* (Copeland *et al.*, 2011) plantea una oportunidad para comprender las características metabólicas específicas de este microorganismo halófilo y de la relevancia de éstas para la osmoadaptación. Durante el crecimiento normal, los flujos metabólicos se dirigen de forma sustancial hacia rutas biosintéticas, retirando metabolitos intermediarios del metabolismo central. Por ello es crucial una eficacia y acoplamiento perfectos de las rutas metabólicas que conectan las fuentes de carbono con los productos finales (en nuestro caso, los solutos compatibles). Existen dos rutas principales para el catabolismo de azúcares hacia piruvato: la glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof) (EM) y la ruta de Entner-Doudoroff (ED) (Werner *et al.*, 2010). La importancia fisiológica de dichas rutas para el crecimiento de *C. salexigens* no se conoce aún (Werner *et al.*, 2010; Ates *et al.*, 2011; Copeland *et al.*, 2011). La síntesis de ectoínas consume por un lado acetil-coenzima A, producido por la descarboxilación oxidativa del piruvato y, por otro, oxalacetato (OAA), el cual es un intermedio del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y ha de ser repuesto por rutas anapleróticas (Copeland *et al.*, 2011). La relación entre flujos metabólicos de anaplerosis y rutas catabólicas tiene una gran relevancia en la adaptación metabólica.

El número de estudios metabólicos en bacterias halófilas y halotolerantes es escaso, especialmente cuando el objetivo de dichos estudios se centra en la biosíntesis de solutos compatibles. En el presente trabajo, se ha profundizado en el rol del metabolismo central en la osmoadaptación de *C. salexigens*. Mediante el rastreo de marcaje isotópico, se han analizado las rutas para el catabolismo de la glucosa y la forma en que el metabolismo central se enfrenta con la gran carga metabólica que supone la biosíntesis de ectoínas. Los resultados de este trabajo muestran cómo las adaptaciones desarrolladas por esta bacteria afectan a la eficacia metabólica a diferentes salinidades y representan un paso más en la comprensión de la fisiología de las bacterias halófilas y halotolerantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas y cultivos

A lo largo de este trabajo se ha usado *C. salexigens* CHR61, un mutante espontáneo de *C. salexigens* DSM 3043<sup>T</sup> resistente a rifampicina. Para la producción de ectoína y la caracterización de rutas metabólicas, esta cepa se hizo crecer en medio mínimo M63 (pH 7,2) con 16,3 g/litro de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,2 g/litro de KOH, 2 g/litro de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 39,5 mg/litro de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,5 mg/litro de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . El medio M63 se complementó con 35,0, 43,8, 146,0 o 175,2 g/litro de NaCl (correspondientes a 0,6, 0,75, 2,5 y 3 M). Como fuente de carbono se empleó glucosa 20 mM. Se hicieron crecer cultivos aerobios en discontinuo con un volumen de medio de cultivo de 100 ml en frascos Erlenmeyer de medio litro a 37°C en un agitador orbital a 210 rpm.

Los cultivos se iniciaron a partir de un *stock* mantenido en glicerol al 20%. Los precultivos se hicieron crecer en medio SW-2 (con un contenido total de sales del 2%, ó 0,3 M) compuesto por 15,6 g/litro de NaCl, 4,07 g/litro de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,6 g/litro de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/litro de KCl, 67 mg/litro de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 47 mg/litro de NaBr y 13 mg/litro de  $\text{NaHCO}_3$  (Vargas *et al.*, 1997). Los cultivos en M63 se inocularon con un precultivo crecido durante una noche en SW-2 hasta una absorbancia ( $A_{600}$ ) inicial de 0,025. Los *stocks* en glicerol, los medios sólidos de cultivo y los precultivos se suplementaron con rifampicina hasta una concentración final de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### Procedimientos analíticos

#### Crecimiento celular

Para medir la concentración celular, éstas se resuspendieron en una disolución de NaCl de concentración adecuada (entre 0,6 y 3 M), y su absorbancia se midió a 600 nm (Novaspec Plus Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences). Se estableció una correlación entre el peso seco celular ( $g_{\text{PS}}$ ) y  $A_{600}$  para la cepa empleada, según las siguientes ecuaciones empíricas:  $g_{\text{PS}}/\text{litro} = 0,597 \cdot A_{600}$  (para cultivos en 0,6 M),  $g_{\text{PS}}/\text{litro} = 0,557 \cdot A_{600}$  (para 0,75 M), y  $g_{\text{PS}}/\text{litro} = 0,532 \cdot A_{600}$  (para 2,5 y 3 M).

#### Determinación de ácidos orgánicos extracelulares

Los ácidos orgánicos extracelulares se determinaron mediante cromatografía de intercambio iónico. El acetato se analizó en un equipo de HPLC Shimadzu LC-10 (Shimadzu Scientific

Instruments, Columbia, MD), equipado con detectores de índice de refracción diferencial y de diodo (para UV) (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, E.E.U.U.). Se usó una columna de intercambio catiónico HPX-87H (Bio-Rad) para la separación de los ácidos orgánicos. La fase móvil fue  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM a un caudal de 0,5 ml/min y 45°C. Para la detección y cuantificación de gluconato (m/z 195), piruvato (m/z 87), lactato (m/z 89) y citrato (m/z 191) se empleó espectrometría de masas acoplada a HPLC (HPLC-MS). Los análisis se llevaron a cabo con un equipo de HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, E.E.U.U.), acoplado a un espectrómetro de masas de un cuadrupolo Agilent 6120 con una fuente de ionización mediante *electrospray* ortogonal. El espectrómetro de masas se hizo operar en modo de ionización por *electrospray* negativa, usando el modo *SCAN* en un rango de m/z de 50 a 300, mientras que el modo de seguimiento del ion seleccionado se usó para la relación m/z de cada compuesto. El voltaje del *espray* de iones se fijó en 3500 V. Se empleó nitrógeno a un caudal de 12 litros/min como gas de nebulización a una presión de 40 (unidades arbitrarias) y como gas auxiliar. El capilar de transferencia de iones se calentó a 350°C. El voltaje de fragmentación se fijó en 70 V. La separación se llevó a cabo a partir de un volumen de inyección de 10  $\mu\text{l}$ , empleando la misma columna y en las mismas condiciones que en el método anterior, sustituyendo el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mM por ácido fórmico al 0,1%. Se recogieron los datos con un ordenador usando el software *Agilent Station*.

#### Estudios de marcaje isotópico y espectroscopía de RMN

Para los experimentos de marcaje, se hicieron crecer células en 100 ml de medio M63 en presencia de glucosa marcada isotópicamente (CortecNet, Voisins-Le Bretonneux, Francia). Los sustratos marcados isotópicamente usados fueron 100% de [1- $^{13}\text{C}$ ]-, [2- $^{13}\text{C}$ ]- y [6- $^{13}\text{C}$ ]glucosa o 20% de [U- $^{13}\text{C}_6$ ]glucosa. Los cultivos se cosecharon entre la mitad y el final de la fase exponencial ( $A_{600}$  entre 1,5 y 3), y se separaron las células de los sobrenadantes mediante centrifugación (15 min a 16000 x g, 4°C).

Los sobrenadantes se concentraron mediante liofilización, se resuspendieron en 1 ml de metanol deuterado (Sigma) y se usaron para la identificación de subproductos extracelulares. Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se registraron con un espectrómetro Bruker AV200 a 200 MHz y 25°C, con un tiempo de relajación de 1,5 s. Se asignaron las señales de piruvato, gluconato y acetato por comparación con desplazamientos químicos previamente publicados (Spectral Database for Organic Compounds) y se confirmaron comparando con los espectros  $^{13}\text{C}$ -RMN de los compuestos puros.

Los solutos compatibles (ectoínas, glutamato y trehalosa) y los lípidos de membrana se extrajeron mediante una variación del protocolo descrito por García-Esteba *et al.* (García-Esteba *et al.*, 2006). La fase acuosa se empleó para el análisis de solutos compatibles, y la fase orgánica para el de los lípidos de membrana. Se registraron los espectros a 25°C usando un espectrómetro Bruker AV400 y Bruker AV600 a 400 y 600 MHz, respectivamente, y un tiempo de relajación de 3 s. Para la cuantificación relativa se integraron las áreas de los picos.

Determinación espectrofotométrica de los consumos de glucosa y amonio

La glucosa extracelular se determinó con un kit específico para glucosa (basado en la actividad hexoquinasa) (GAHK20, Sigma). El amonio extracelular se determinó con otro kit enzimático (11112732035, de R-Biopharm, Darmstadt, Alemania). Ambos kits se utilizaron de acuerdo con las indicaciones de los fabricantes. Las medidas se llevaron a cabo en un lector de microplacas de 96 pocillos Synergy HT (Bio-Tek, Winooski, E.E.U.U.)

### **Ensayos enzimáticos**

Todos los ensayos enzimáticos se optimizaron para las condiciones, medios y el microorganismo empleados en este estudio. Las medidas se llevaron a cabo en un lector de microplacas de 96 pocillos Synergy HT (Bio-Tek, Winooski, E.E.U.U.). Se definió una unidad de actividad enzimática como el número de micromoles de sustrato consumido o de producto formado por minuto, y se normalizó con respecto a los miligramos de proteína (U/mg).

En cada caso, se extrajeron muestras comprendiendo el volumen completo de cultivo, y se centrifugaron (15 min a 16000 x g, 4°C) y resuspendieron las células en tampón fosfato 65 mM (pH 7,5). Se precedió a la sonicación de las células en un baño con hielo empleando un sonicador ultrasónico Vibra Cell VC 375 con una sonda de 3 mm de diámetro (Sonic Materials, Danbury, E.E.U.U.), y se centrifugó nuevamente (20 min a 16000 x g, 4°C). Los sobrenadantes (extracto libre de células) se emplearon para las medidas de actividad enzimática posteriores. La concentración de proteína en estos extractos libres de células se cuantificó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), usando un kit específico comercial (BCA Protein Assay kit, Pierce).

Los protocolos para la determinación de la actividad 6-fosfofructoquinasa (Pfk) (Peng y Shimizu, 2003), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf) (Peng y Shimizu, 2003), citrato sintasa (Cs) (Peng y Shimizu, 2003), isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> (Icdh) (Aoshima *et al.*, 2003), piruvato carboxilasa (Pc) (Buch *et al.*, 2008), fosfoenolpiruvato

carboxilasa (Ppc) (Buch *et al.*, 2008), isocitrato liasa (Icl) (Aoshima *et al.*, 2003), enzima málico (Mae) (van der Werf *et al.*, 1997), aspartato aminotransferasa (AspAT) (Yagi *et al.*, 1976) y glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH y de NADH (Gdh) (Tesch *et al.*, 1999) se optimizaron específicamente para *C. salexigens* (ver sección *Ensayos de actividad enzimática* en Anexo III).

### **Análisis *in silico* de homología de proteínas**

El genoma completo de *C. salexigens* se haya completamente secuenciado y anotado y está disponible en la red. Sin embargo, la anotación de este genoma se ha hecho de forma automatizada a partir de estudios de homología de los marcos abiertos de lectura (ORFs) de genes de otros muchos microorganismos, y por tanto es muy probable que haya algunas asignaciones incorrectas o falte información relevante. Con el objetivo de analizar con mayor detalle las asignaciones de los ORFs a las rutas metabólicas más relevantes para este estudio, se comparó la reconstrucción metabólica realizada por Ates *et al.* (Ates *et al.*, 2011) con la información disponible en las bases de datos de genomas secuenciados, tales como la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa y Goto, 2000), y MetaCyc (Caspi *et al.*, 2012), las cuales están respaldadas por datos experimentales. Las secuencias tanto de proteínas como de genes se compararon usando BLAST (Ye *et al.*, 2006). Asimismo, se llevaron a cabo análisis de dominios proteicos (Conserved Domain Database, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)), localización y topología de proteínas (Signal P 4.0 server) y del contexto genómico.

### **Predicción de distribución del marcaje isotópico**

Se seleccionaron tres variantes posicionales de glucosa marcada isotópicamente: [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa, escogidos específicamente para evaluar la importancia relativa de diferentes rutas del metabolismo central, siguiendo criterios ya descritos (Klapa *et al.*, 1999; Metallo *et al.*, 2009). Se predijeron los patrones de incorporación del marcaje isotópico procedente de la glucosa en piruvato y acetil-coenzima A, vía glucólisis o ruta de Entner-Doudoroff.

## RESULTADOS

### La alta salinidad favorece la síntesis de biomasa y producción de ectoínas por *C. salexigens*

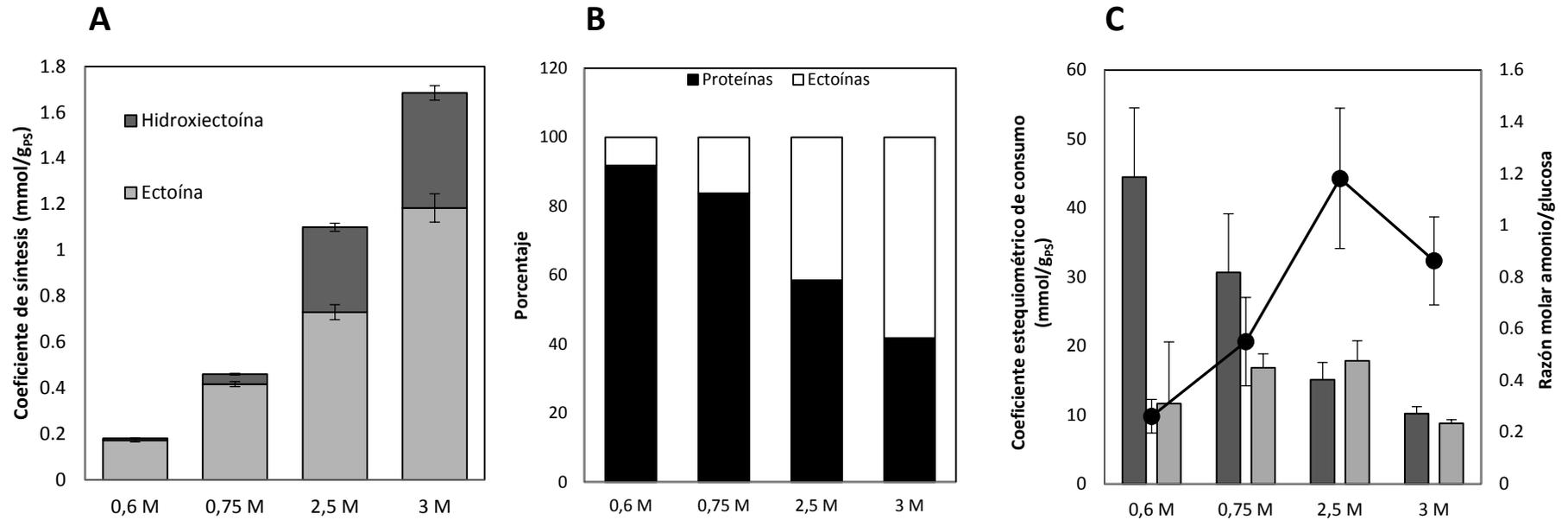
Con el fin de estudiar el efecto de la salinidad del medio en el metabolismo de *C. salexigens*, se cuantificó la producción de biomasa y de ectoínas en cultivos crecidos con glucosa como única fuente de carbono en distintas concentraciones de sal (0,6, 0,75, 2,5 y 3 M). La producción máxima de biomasa aumentó con la salinidad hasta 2,5 M de NaCl (Tabla I.1), mientras que la velocidad de crecimiento resultó óptima en medio mínimo M63 con 0,75 M de NaCl (Figura I.1) (García-Esteba *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2008).

En trabajos anteriores se demostró que el contenido intracelular de ectoínas aumenta con la salinidad (García-Esteba *et al.*, 2006), hecho que está de acuerdo con el papel de las ectoínas en la osmoprotección. Los coeficientes estequiométricos de síntesis de ectoínas a partir de biomasa ( $Y_{Ect/X}$ ) indicaron que el contenido total de ectoínas es directamente proporcional a la salinidad (Tabla I.1 y Figura I.2A). No obstante, la velocidad de producción de ectoínas resultó máxima a 2,5 M de NaCl (Tabla I.1). La proporción entre hidroxiectoína y ectoína aumentó junto con la salinidad hasta 2,5 M (Tabla I.1 y Figura I.2.A), y se observó una correlación negativa entre el contenido relativo en ectoínas y proteínas y la salinidad (Figura I.2B).

**Tabla I.1.** Crecimiento y producción de ectoínas por *C. salexigens* a diferentes concentraciones de NaCl. Los cultivos crecieron a 37°C en medio mínimo M63 con glucosa 20 mM y amonio 30 mM como únicas fuentes de carbono y amonio, respectivamente (ver Materiales y Métodos para mayor detalle).

Concentración de NaCl	Biomasa máxima	$Y_{Ect/X}^a$	Velocidad de síntesis de ectoínas	Ratio hidroxiectoína/ectoína
M	g <sub>PS</sub> /L	mmol/g <sub>PS</sub>	mmol/g <sub>PS</sub> ·h	
0,6	1,40 ± 0,07	0,18 ± 0,01	0,049 ± 0,003	0,048 ± 0,097
0,75	1,76 ± 0,03	0,45 ± 0,01	0,127 ± 0,004	0,106 ± 0,030
2,5	2,48 ± 0,02	1,10 ± 0,05	0,174 ± 0,008	0,507 ± 0,037
3	2,03 ± 0,26	1,68 ± 0,09	0,159 ± 0,009	0,423 ± 0,036

<sup>a</sup>Coefficiente estequiométrico de producción de ectoínas. Tanto  $Y_{Ect/X}$  como la velocidad de producción de ectoínas se determinaron en la fase exponencial del crecimiento, mientras que la biomasa máxima y la ratio hidroxiectoína/ectoína se obtuvieron en la fase estacionaria.



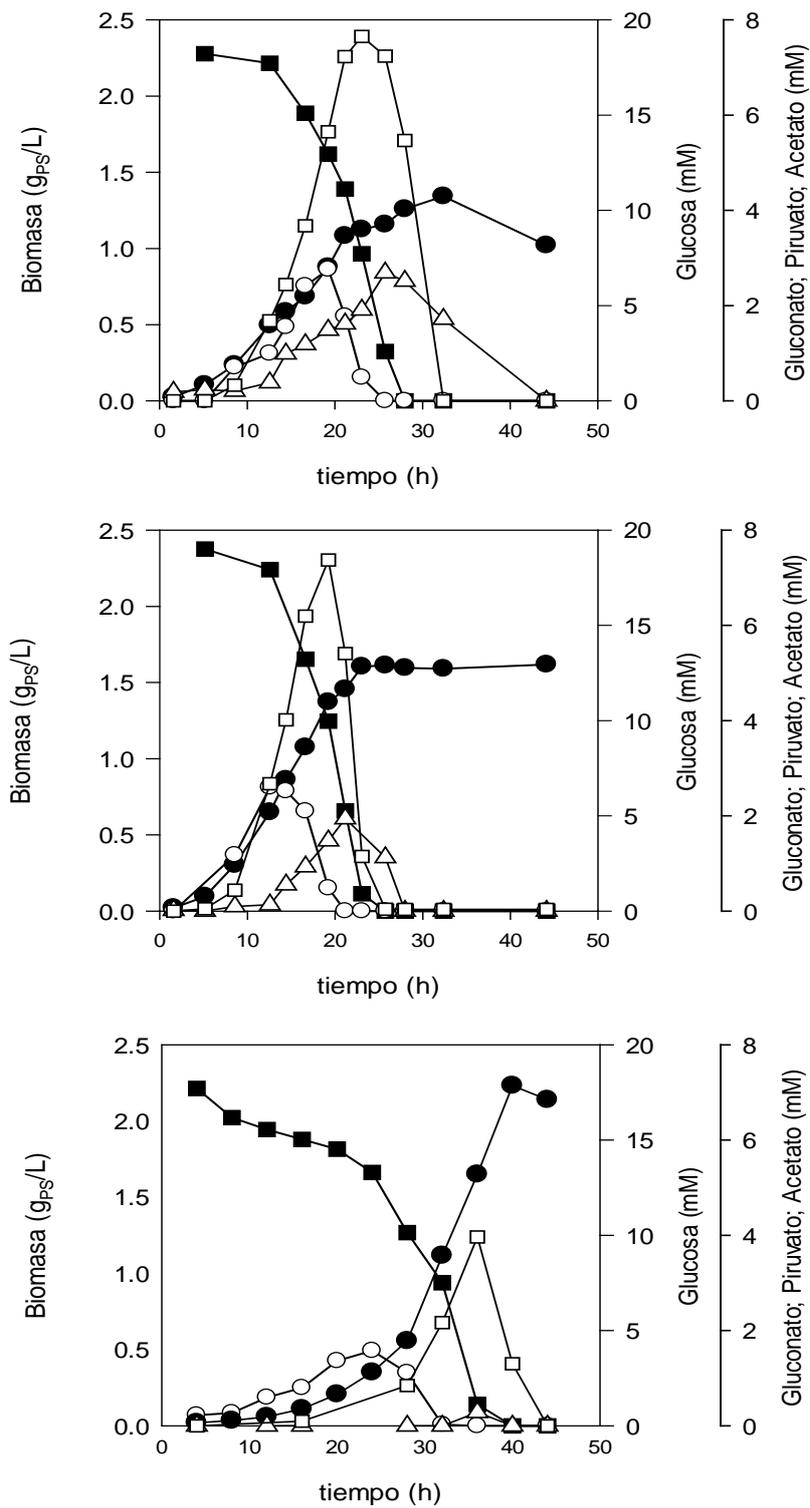
**Figura I.1. Efecto de la concentración de NaCl sobre la producción de ectoínas y el consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno en *C. salexigens*. (A) Contenidos celulares de ectoína e hidroxiectoína. (B) Contenido relativo en proteínas y ectoínas, expresado como porcentaje del total de proteínas más ectoínas. La suma de ambos contenidos resultó aproximadamente constante en todas las condiciones probadas ( $0,423 \pm 0,055$  g/g<sub>ps</sub>). (C) Coeficientes estequiométricos de consumo de glucosa (barras oscuras) y de amonio (barras claras). La relación molar entre ambos coeficientes (amonio/glucosa) aparece indicada con círculos. Los cultivos se hicieron crecer a 37°C en medio mínimo M63 con glucosa 20 mM y amonio 30 mM como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.**

### Consumo de fuentes de carbono y nitrógeno

Dado que la biosíntesis de ectoínas tiene lugar a expensas de intermediarios del metabolismo central, es de esperar que dicho proceso suponga una carga para el metabolismo. Con objeto de determinar los cambios metabólicos dependientes de la salinidad, se hizo un seguimiento de los nutrientes y los productos secundarios excretados a diferentes salinidades.

La glucosa es la fuente de carbono preferida por *C. salexigens* (Canovas *et al.*, 1996). El coeficiente estequiométrico de consumo de glucosa resultó muy afectado por la salinidad extracelular, siendo máximo a 0,6 M de NaCl, y decreciendo hasta en un 75% a 3 M de NaCl (Figura I.2C). El consumo de amonio tuvo un comportamiento muy distinto, ya que el coeficiente estequiométrico de la incorporación de amonio permaneció prácticamente constante e independiente de la salinidad (Figura I.2C). Este es un hecho destacable, dado que, en principio, cabe esperar que la alta producción de ectoínas que exigen las salinidades más elevadas implique una mayor demanda de fuente de nitrógeno. Para alcanzar una mejor comprensión de las alteraciones globales del metabolismo a distintas salinidades, se calculó la relación molar entre el consumo de amonio y el de glucosa. Dicho parámetro aumentó con la salinidad hasta 2,5 M NaCl (Figura I.2C), y además se observó una correlación positiva entre la relación molar amonio/glucosa y la velocidad específica de producción de ectoínas (Figura I.2, A y B).

Globalmente, estos hallazgos indican que el enlentecimiento del crecimiento y el metabolismo a altas concentraciones de sal favorecen la producción de biomasa, hecho que concuerda con el efecto ya observado previamente a concentraciones de sal superiores a 1,5 M (Canovas *et al.*, 1996). Esto subraya el hecho de que la mayor eficacia de los metabolismos de carbono y nitrógeno a altas salinidades es consecuencia de una especialización para poder enfrentar un entorno muy exigente.



**Figura I.2.** Evolución de la composición del medio extracelular de cultivos discontinuos crecidos en glucosa 20 mM y NaCl (A) 0,6 M, (B) 0,75 M y (C) 2,5 M. Símbolos utilizados: círculos negros, formación de biomasa; cuadrados negros, concentración de glucosa; círculos blancos, gluconato; cuadrados blancos, piruvato; triángulos blancos, acetato.

**Cuantificación de ácidos orgánicos excretados por *C. salexigens*, y metabolismo *overflow***

La presencia de gluconato, acetato, piruvato y cantidades menores de lactato en los sobrenadantes de los cultivos crecidos en NaCl 0,6 y 0,75 M apuntaban a la presencia de un posible metabolismo *overflow* o rebosadero. Se cuantificaron los consumos de glucosa y amonio y la producción y reutilización de ácidos orgánicos a tres salinidades diferentes. En cualquiera de las tres, la glucosa resultó el nutriente limitante, ya que su agotamiento marcó la entrada en fase estacionara. En cambio, una concentración cercana a 15 mM de amonio estaba aún presente en el medio al final del crecimiento de cada cultivo (datos no mostrados). En NaCl 0,6 y 0,75 M se produjo acetato durante la fase exponencial de crecimiento (Figura I.1, A y B), aunque a alta salinidad (NaCl 2,5 M) el acetato extracelular resultó prácticamente indetectable (Figura I.1C). La velocidad específica de producción de piruvato durante la fase exponencial disminuyó conforme aumentó la concentración de sal (Tabla I.2). El acetato y el piruvato se reasimilaron una vez la glucosa extracelular se había agotado, en contraste con el gluconato, que se acumuló en el medio de cultivo durante la primera parte de la fase exponencial del crecimiento y se consumió junto con la glucosa durante la segunda mitad de la fase exponencial, aproximadamente (Figura I.1). Como se muestra en la Tabla I.2, gluconato, piruvato y acetato fueron los principales productos excretados. Las velocidades de producción de los dos últimos presentaron una correlación inversa con la concentración de sal y el rendimiento en biomasa. En conjunto, estos datos apuntan hacia un incremento de la eficacia metabólica a altas salinidades.

**Tabla I.2.** Velocidades específicas de producción/consumo de los principales solutos extracelulares. Los cultivos crecieron en medio mínimo M63 con glucosa. Ver Anexo III para mayor detalle.

[NaCl] (M)	Glucosa	Amonio	Gluconato	Piruvato	Lactato*	Acetato
0,6	14,28 ± 1,28	3,73 ± 2,87	0,87 ± 0,31	2,25 ± 1,20	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,17
0,75	11,73 ± 3,24	6,46 ± 0,75	1,14 ± 0,38	1,66 ± 0,51	13,20 ± 9,50	0,53 ± 0,20
2,5	2,10 ± 0,18	2,48 ± 0,40	0,97 ± 0,47	0,30 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,01

Todas las velocidades, salvo en el caso del lactato, se calcularon en la fase exponencial temprana del crecimiento y están expresadas en mmol/g<sub>PS</sub>·h.

\*La velocidad de producción de lactato viene dada en μmol/g<sub>PS</sub>·h.

La presencia de estos compuestos en los cultivos indicaba un posible metabolismo *overflow* a bajas salinidades. Esto podría ser el resultado de la limitación del catabolismo de glucosa por alguna razón que junto con una demanda reducida de producción de ectoínas, llevara a una mayor excreción de productos secundarios.

### **Análisis *in silico* e *in vitro* de las rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de precursores de ectoínas**

#### **Análisis *in silico***

La acumulación de solutos compatibles a altas salinidades impone una carga metabólica a la célula. Los resultados descritos en los apartados anteriores son un reflejo de que la osmoadaptación en *C. salexigens* tiene implicaciones en el desempeño del metabolismo. El genoma de *C. salexigens* ha sido anotado de forma automatizada, y se han publicado análisis preliminares de dicha anotación (Csonka *et al.*, 2005; Copeland *et al.*, 2011) y la primera reconstrucción metabólica basada en el genoma completo (Ates *et al.*, 2011). Para comprender mejor la interacción entre osmoadaptación y metabolismo, se evaluaron de forma crítica varias de las rutas de la reconstrucción relacionadas con el metabolismo central, con especial énfasis en aquellas implicadas en la síntesis de precursores de ectoínas así como de los metabolitos encontrados en los sobrenadantes. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes pasos: (i) estudios de homología utilizando la información de microorganismos relacionados, como los pertenecientes a las familias de Pseudomonas y Enterobacterias, y bacterias halotolerantes disponibles en bases de datos como MetaCyc y KEGG (Kanehisa y Goto, 2000; Caspi *et al.*, 2012); (ii) análisis de los dominios conservados de proteínas, sublocalización celular proteica y contexto genómico; (iii) experimentos de crecimiento con D-glucono-1,5-lactona, D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato como fuentes de carbono y (iv) revisión de datos de la bibliografía.

El análisis del genoma reveló características metabólicas interesantes. La ruta de Entner-Doudoroff cuyo fin es la catabolización de glucosa hasta piruvato (Entner y Doudoroff, 1952), podría ser operativa en *C. salexigens* (ver Figura I.S1 en Anexo III). Típicamente, los microorganismos que hacen uso de la ruta de ED carecen de algún enzima glucolítico, como la enzima fosfofructoquinasa (Seo *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009). De hecho, ha sido difícil una anotación inequívoca del gen codificante de Pfk en *C. salexigens* (Csonka *et al.*, 2005). Existen cinco ORFs anotados en el sitio *web* del JGI (genome.ornl.doe.gov) como fosfofructoquinasas potenciales, aunque presentan una baja homología con Pfk *bona fide* (Figura I.S2 y Tabla I.S1

en Anexo III). Existe además una supuesta fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (Csal1534). La reacción catalizada por esta enzima es perfectamente reversible (Reshetnikov *et al.*, 2008). Sin embargo, el gen codificante para la misma de *Propionibacterium freundenreichii* puede complementar únicamente mutaciones de fructosa-1,6-bisfosfatasa (*fbp*) pero no mutaciones de fosfofructoquinasa (*pfkA/pfkB*) en *Escherichia coli* (Kemp y Tripathi, 1993), indicando que funciona en la dirección gluconeogénica pero no en la dirección glucolítica. De forma significativa, a partir del análisis del genoma de *C. salexigens* tampoco se pudo identificar un representante claro e inequívoco de una fructosa bisfosfatasa (Csonka *et al.*, 2005), surgiendo la posibilidad de que Csal1534, habiendo sido anotado como Ppi-Pfk, pudiera ser en realidad una fructosa bisfosfatasa.

Nuestro análisis *in silico* sugiere que la oxidación de la D-glucosa a D-gluconato a través de D-glucono-1,5-lactona podría ocurrir tanto en el periplasma como en el citoplasma. Este hecho concuerda con la acumulación temprana del gluconato observada en el medio de cultivo. *C. salexigens* fue capaz de crecer con D-glucono-1,5-lactona, D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato como única fuente de carbono (Figura I.S4 en Anexo III), y además el análisis de homología predijo la presencia funcional en *C. salexigens* de una variación del “loop” del 2-ceto-gluconato descrito en *Pseudomonas* (del Castillo *et al.*, 2007) (Figura I.3 y Figura I.S1 en Anexo III).

*C. salexigens* posee genes específicos de supuestas piruvato carboxilasa (Pc), fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) y oxaloacetato descarboxilasas (Oad) (Tabla I.S1 en Anexo III). Estas enzimas interconvierten piruvato, fosfoenolpiruvato y oxalacetato (oxalacetato), y podrían tener un papel importante en favorecer altos niveles de flujo metabólico hacia la biosíntesis de ectoínas, reponiendo el oxalacetato requerido por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura I.3).

La producción de acetato observada es difícil de explicar basándose en la anotación genómica actual y en el conocimiento de las rutas metabólicas supuestamente presentes. El metabolismo del acetato en *C. salexigens* es bastante diferente del de *Pseudomonas* y *E. coli*. La principal ruta de producción de acetato en *P. aeruginosa*, *E. coli* y especies relacionadas es la ruta de la fosfotransacetilasa y acetato quinasa (Castaño-Cerezo *et al.*, 2009), que no está presente en *C. salexigens*. La producción de acetato en esta última podría implicar la formación del intermediario de alta energía acetil fosfato, mediante una ruta alternativa. Csal1010 está anotado como una piruvato oxidasa. Esta enzima dependiente de FAD descarboxila piruvato, produciendo acetato (Caspi *et al.*, 2012). Así mismo, el catabolismo de

ectoínas produce acetato (Schwibbert *et al.*, 2011); de hecho, una síntesis y una degradación continuas de ectoínas a baja salinidad podrían explicar el mayor flujo *overflow* de acetato.

Con respecto al problema del metabolismo del nitrógeno, en el genoma de *C. salexigens* hay copias de genes codificantes para L-alanina aminotransferasa, glutamato sintasa y glutamato deshidrogenasa. Las enzimas especificadas por estos genes son las responsables de la transferencia reductiva de amonio a 2-cetoglutarato para generar glutamato (Sakamoto *et al.*, 1975; Goss *et al.*, 2001), el cual actúa como el principal donador de amonio en la célula. Existen dos supuestas aspartato aminotransferasas que catalizan la transferencia reversible del grupo amino desde glutamato a oxalacetato, rindiendo aspartato y 2-cetoglutarato. Esta es una enzima clave, dado que conecta el ciclo de los ácidos tricarbónicos con la primera enzima de la ruta de síntesis de ectoínas (aspartoquinasa). *C. salexigens* tiene únicamente una aspartoquinasa para catalizar la reacción de formación del aspartil fosfato, que es un intermedio metabólico común tanto de la síntesis de ectoínas como de la síntesis de aminoácidos de la familia del aspartato (Csonka *et al.*, 2005; Pastor *et al.*, 2010). Una descripción completa de los análisis *in silico* realizados se halla en la Tabla I.S1 y Figuras I.S1-S4 del Anexo III.



### **Análisis *in vitro***

Las actividades de ciertas enzimas seleccionadas se cuantificaron *in vitro*. Las enzimas ensayadas pertenecen a cuatro grupos principales, a saber: (i) metabolismo de glucosa y gluconato; (ii) ciclo del ácido cítrico; (iii) reacciones anapleróticas y gluconeogénicas y (iv) metabolismo del nitrógeno. Las actividades enzimáticas se determinaron a mitad de la fase exponencial de cultivos crecidos a diferentes salinidades (Tabla I.3).

*Enzimas del metabolismo de la glucosa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y Pfk.* La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa interconecta las rutas de EM, ED y de las pentosas fosfato (Nicolas *et al.*, 2007) y está considerada como una de las principales rutas de producción de NADPH para usos biosintéticos y de homeostasis redox (Tabla I.3).

De forma significativa, no se pudo detectar un nivel de Pfk suficientemente alto para sobrepasar el ruido en los extractos libres de células (Tabla I.3 y Tablas I.S1 y III.S2 y Figuras I.S1-S3 en Anexo III). Este hecho, junto con la falta de una asignación inequívoca a una Pfk apunta a que, como en el caso de *Pseudomonas* y algunos otros géneros aeróbicos (Lessie y Phibbs, 1984), *C. salexigens* usa la ruta de ED para el catabolismo de la glucosa, mientras que la existencia de una glucólisis operativa continúa siendo incierta (Figura I.3)

*Enzimas del CAT, Cs e Icdh.* Además de su importante papel en el aporte de energía metabólica, los intermediarios del ciclo del ácido cítrico son elementos básicos fundamentales en la síntesis de biomasa y de ectoínas (Figura I.3). Se determinaron dos actividades del CAT, Cs e Icdh. Existen dos genes anotados como Icdh (Csal0525 y Csal1434), diferentes en su especificidad de cofactor; sin embargo, sólo se logró detectar actividad Icdh dependiente de NADP<sup>+</sup>. Con independencia de la salinidad, la actividad Icdh fue entre 8 y 15 veces mayor que la de Cs (Tabla I.3).

*Enzimas de rutas anabólicas y anapleróticas, Ppc, Pc, isocitrato liasa y enzima málico.* Las rutas anapleróticas son esenciales en la reposición del oxalacetato del CAT que es sustraído de éste para la producción de ectoínas (Figura I.3). Se detectaron tanto actividad Ppc como Pc, siendo esta última entre 8 y 10 veces mayor que la primera. Hay que destacar que las actividades Pc y Ppc medidas en células crecidas NaCl 2,5 M fueron 2 veces mayores que las observadas en bajas salinidades (Tabla I.3).

La actividad de las enzimas anapleróticas isocitrato liasa (ciclo del glioxilato) y enzima málico (gluconeogénesis) (Netzer *et al.*, 2004) resultó baja comparada con otras actividades

analizadas. Este hecho concuerda con lo descrito en *E. coli* y *P. aeruginosa* crecidas en glucosa (Kretzschmar *et al.*, 2008; Renilla *et al.*, 2012).

*Enzimas del metabolismo del nitrógeno, aspartato aminotransferasa, y glutamato deshidrogenasa.* Glutamato deshidrogenasa (Gdh), junto con glutamina sintetasa y glutamato sintasa constituyen las rutas de asimilación de amonio en bacterias. En los extractos de *C. salexigens* se detectó actividad Gdh dependiente tanto de NADH como de NADPH. Únicamente la actividad Gdh dependiente de NADH se podía predecir a partir de la secuencia anotada de *C. salexigens* (en concreto el ORF Csa1340), lo que sugiere que es posible que esta enzima no discrimine ambos nucleótidos. Las transaminasas, que catalizan la transferencia de grupos amino entre aminoácidos, están implicadas en la síntesis de los mismos. La actividad aspartato aminotransferasa resultó alta, hecho que no debería sorprender considerando que dicha actividad debe responder tanto por la síntesis de ectoínas como por la de todos los aminoácidos de la familia del aspartato (Figura I.3).

**Tabla I.3.** Actividades enzimáticas medidas en extractos crudos de cultivos crecidos en medio mínimo M63 con glucosa y 0,6, 0,75 y 2,5 M de NaCl. Los extractos se obtuvieron de la fase exponencial del crecimiento. Los valores dados vienen expresados en mU/mg proteína. Los datos son el promedio de ocho determinaciones (cuatro cultivos independientes, ensayados por duplicado). N.M., no medido.

Actividad enzimática	[NaCl]		
	0,6 M	0,75 M	2,5 M
<b>Metabolismo del gluconato</b>			
Zwf	39,1 ± 15,5	55,7 ± 27,4	48,8 ± 16,5
<b>Glucolisis y CAT</b>			
Pfk	N.M.	<0,05	<0,05
Cs	32,5 ± 22,3	71,7 ± 38,7	66,5 ± 40,9
Icdh	462 ± 189	645 ± 295	554 ± 183
<b>Rutas anapleróticas</b>			
Icl	1,27 ± 0,69	2,30 ± 1,24	1,93 ± 0,70
Mae	5,69 ± 2,86	7,99 ± 6,83	5,87 ± 2,18
Pc	92,2 ± 19,1	70,6 ± 8,2	167,0 ± 28,0
Ppc	N.M.	9,02 ± 3,67	15,82 ± 4,42
<b>Metabolismo del nitrógeno</b>			
NADPH-Gdh	22,3 ± 7,60	73,7 ± 31,4	16,4 ± 9,0
NADH-Gdh	52,5 ± 36,0	71,1 ± 46,4	74,1 ± 51,3
AspAT	95,2 ± 18,0	174 ± 93	78,5 ± 16,5

*Actividades enzimáticas y flujos in vivo.* Las actividades enzimáticas detectadas *in vitro* pueden verse como estimaciones del flujo metabólico a través de una ruta dada. Los flujos de carbono intracelulares pueden estimarse de forma bastante aproximada a partir de las velocidades de consumo de glucosa. Cuando se comparan los niveles medidos de actividades

Cs y Pc, resulta evidente que: (i) la actividad Cs resultó similar en las tres concentraciones de sal, mientras que la actividad Pc fue mayor a NaCl 2,5 M (Tabla I.3) y (ii) la velocidad de consumo de glucosa fue entre 5 y 30 veces superior que las actividades Cs y Pc (siendo la diferencia mayor a baja salinidad, Tabla I.S3 en Anexo III). Aunque esta es una aproximación algo burda, estos hechos están de acuerdo con los datos de acumulación de metabolitos extracelulares (Tabla I.2), explicando por qué las células derivan una parte significativa de la glucosa metabolizada hacia la producción de piruvato y acetato e indicando la posibilidad de que el CAT esté limitado por una baja actividad de Cs. Además, la alta actividad Pc señala una síntesis activa de oxalacetato a partir de piruvato.

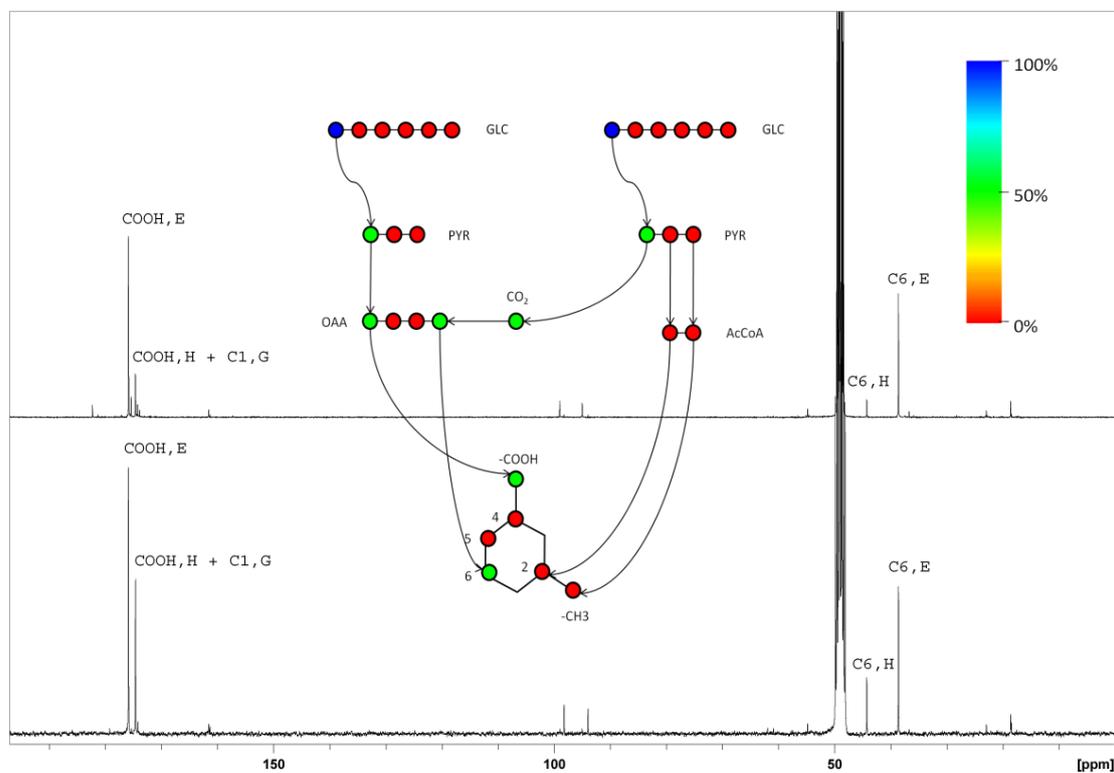
### Seguimiento del marcaje isotópico desde glucosa hasta ectoínas

Por último, con el fin de evaluar la distribución de flujos en el metabolismo central, se realizó un seguimiento mediante marcaje isotópico de la síntesis de ectoínas, proveyendo [1-<sup>13</sup>C]-, [6-<sup>13</sup>C]- y [2-<sup>13</sup>C]glucosa como fuente de carbono en cultivos tanto a baja como a alta salinidad. Se predijeron todos los isotopómeros posibles de piruvato, PEP, oxalacetato, acetil-coenzima A y ectoínas, derivados de los precursores marcados a través las rutas de EM, ED, anaplerosis y CAT, basándose en la información extraída de la anotación del genoma (Anexo III, Figura I.S5 y Tablas I.S3 y S4).

#### Marcaje de ectoínas en cultivos crecidos en [1-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa

El análisis del marcaje de ectoínas con [1-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa proporciona un modo de estimación de la razón de flujos entre EM y ED. En las células crecidas en [1-<sup>13</sup>C]glucosa las dos posiciones de las moléculas de ectoínas con mayor proporción de marcaje fueron el carbono carboxílico (en adelante COOH) y el carbono 6 (C6), con independencia de la concentración de sal, y el marcaje en el resto de posiciones resultó muy próximo a la abundancia natural del isótopo <sup>13</sup>C (Figura I.4). El marcaje en COOH puede explicarse considerando el uso de la ruta ED. Resulta sorprendente que el C6 de las ectoínas contuviera una cantidad de <sup>13</sup>C sustancialmente superior a la esperable por abundancia natural. Una forma de explicar este exceso de marcaje en C6 es postular que el <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> generado por la descarboxilación de [1-<sup>13</sup>C]piruvato se reincorpora de forma eficiente mediante la reacción de carboxilación catalizada por las enzimas Ppc o, más probablemente, Pc. El enriquecimiento en <sup>13</sup>C en la posición COOH de las ectoínas permitió estimar que más de un 95% de la glucosa empleada para la síntesis de ectoínas se metabolizó a través de la ruta ED y Pc. La dispersión de la marca debido a la presencia de otras rutas tales como la de las pentosas fosfato podría

explicar los enriquecimientos en marca bastante menores del resto de posiciones. Además, la existencia de una glucólisis funcional, aunque bastante secundaria, no se puede descartar con seguridad.



**Figura I.4.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de extractos intracelulares procedentes de cultivos crecidos en  $[1-^{13}\text{C}]$ glucosa. Se empleó medio mínimo M63 con NaCl 0,75 M (espectro superior) y NaCl 2,5 M (espectro inferior). Se muestran las señales correspondientes al carbono carboxílico (177 ppm para ectoína, 174-175 para hidroxiectoína) y C6 (38-39 ppm para ectoína, and 44 para hidroxiectoína). En el esquema se representa el destino esperado del carbono marcado cuando  $[1-^{13}\text{C}]$ glucosa se metaboliza mediante la ruta de Entner-Doudoroff. Si partimos de la asunción de que el C1 marcado del piruvato se pierde en forma de  $^{13}\text{CO}_2$  por descarboxilación mediante la actividad Pdh y se reincorpora al OAA mediante la actividad Pc, el patrón de marcaje predicho para las ectoínas estaría de acuerdo con el de los espectros obtenidos. El nivel relativo de marcaje (porcentaje) sigue el código de color indicado por la escala mostrada a la derecha de la figura. Abreviaturas: GLC, glucosa; PYR, piruvato; OAA, oxalacetato; AcCoA, acetil coenzima A. Compuestos marcados detectados: G, glutamato; E, ectoína; H, hidroxiectoína.

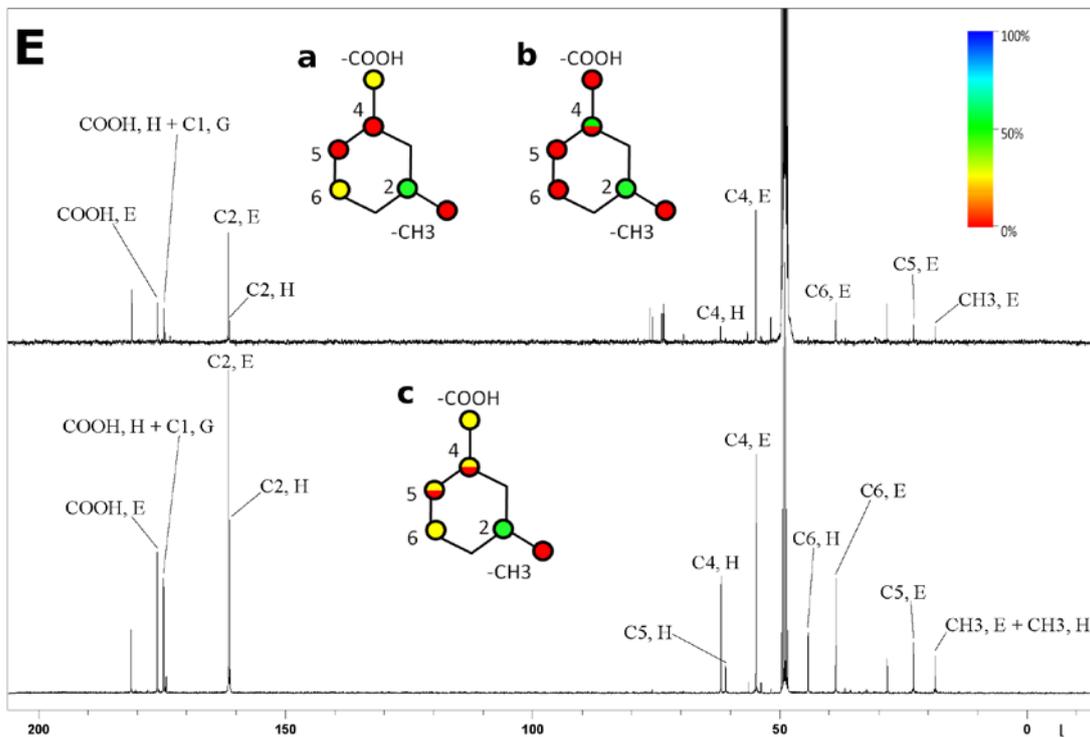
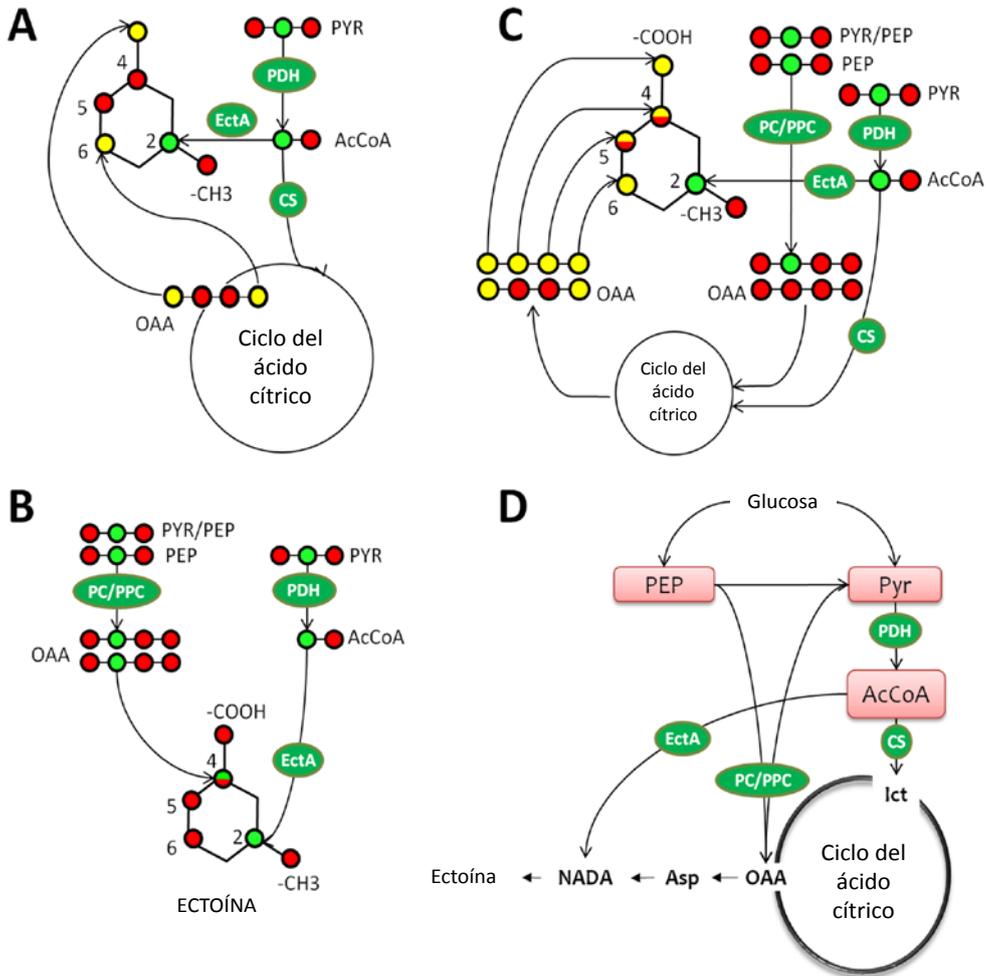
Los resultados obtenidos con [6-<sup>13</sup>C]glucosa, complementarios a los obtenidos con [1-<sup>13</sup>C]glucosa, demostraron que la incorporación de marca en las ectoínas desde C1 y C6 de la glucosa no es equivalente (Anexo III, Figura I.S6). Dicho resultado demuestra que el catabolismo de la glucosa ocurre a través de intermediarios de 3 átomos de carbono marcados asimétricamente, al contrario de lo que se esperaría para la ruta de EM. Además, una incorporación más eficaz del <sup>13</sup>C de [6-<sup>13</sup>C]glucosa que de [1-<sup>13</sup>C]glucosa en la fracción de glicerol de los fosfolípidos de membrana (Anexo III, Figuras I.S7 y S8) concuerda con el marcaje de las ectoínas. Por tanto, estos datos demuestran que *C. salexigens* metaboliza la glucosa a través de la ruta de ED, y este hecho junto con la probable carencia de Pfk, sugieren que la ruta de EM no es funcional.

#### Marcaje de ectoínas en cultivos crecidos en [2-<sup>13</sup>C]glucosa

Partiendo de [2-<sup>13</sup>C]glucosa como fuente de carbono, se espera que la ruta de EM genere PEP y piruvato ambos enriquecidos un 50% en <sup>13</sup>C en el C2. El metabolismo a través de ED generaría también un 50% de [2-<sup>13</sup>C]piruvato, pero el PEP no presentaría un enriquecimiento mayor a la abundancia natural en ninguno de sus carbonos (Anexo III, Figura I.S5). Por tanto, el destino metabólico del [2-<sup>13</sup>C]piruvato puede ser analizado sin ninguna asunción adicional (Figura I.5). El oxalacetato podría ser sintetizado a partir de piruvato y/o PEP en *C. salexigens* a través de las siguientes rutas: (i) los átomos de carbono del piruvato pueden ingresar en el CAT como acetil-coenzima A producido por Pdh, rindiendo oxalacetato tras una vuelta completa al ciclo (Figura I.5A); (ii) piruvato y PEP pueden ser descarboxilados para dar oxalacetato mediante la acción de Pc o Ppc, respectivamente (Figura I.5B), o (iii) mediante una combinación de las dos rutas anteriores (Figura I.5C). A partir de los espectros de <sup>13</sup>C-RMN de las ectoínas se puede concluir que la contribución de la actividad Ppc a la actividad anaplerótica total en la célula es despreciable (Figura I.5). Los niveles de actividad enzimática de Pc y Ppc detectados en los extractos apoyan esta última asunción (Tabla I.3).

El nivel de marcaje en las posiciones C6 y COOH de las ectoínas aumenta en función del flujo a través de Pdh, mientras que el enriquecimiento en C4 depende del flujo de Pc. El marcaje en C2 es el resultado de la incorporación mediante la actividad EctA del acetil-coenzima A producido por Pdh. Ninguna de las combinaciones de rutas consideradas podría producir enriquecimiento en el carbono del grupo metilo de las ectoínas. Estas predicciones cuadran bastante bien con los espectros de <sup>13</sup>C-RMN correspondientes, donde la señal de dicho carbono es la menos intensa, y las dos señales más intensas fueron las de C2 y C4 (Figura I.5E).

**Figura I.5.** (Página siguiente). Incorporación de la marca isotópica de  $[2-^{13}\text{C}]$ glucosa en las ectoínas. El  $^{13}\text{C}$  de  $[2-^{13}\text{C}]$ piruvato (producido a través de la ruta de ED o de la ruta de EMP), de  $[2-^{13}\text{C}]$ fosfoenolpiruvato (producido vía ruta de EMP), o de fosfoenolpiruvato no marcado (producido vía ruta de ED) puede incorporarse a las ectoínas de las siguientes formas: (A) vía oxalacetato procedente de una única vuelta del CAT; (B) vía oxalacetato sintetizado por piruvato carboxilasa o fosfoenolpiruvato carboxilasa (Pc/Ppc), o (C) oxalacetato sintetizado vía Pc/Ppc seguido de una vuelta el CAT, lo que altera el patrón de marcaje. (D) Esquema que muestra la relación de los nodos del piruvato y del acetil coenzima A con la ruta de síntesis de ectoínas en *C. salexigens*. (E) Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de extractos intracelulares de cultivos crecidos en  $[2-^{13}\text{C}]$ glucosa. Se empleó medio mínimo M63 con NaCl 0,75 M (espectro superior) y 2,5 M (espectro inferior). En ellos se indican las señales de  $^{13}\text{C}$  correspondientes al carbono carboxílico, grupo metilo, C2, C4 y C6 de ectoína (E) e hidroxiectoína (H). La señal correspondiente al carbono carboxílico de hidroxiectoína se solapa con la de C1 de glutamato (indicado como C1, G). Puede apreciarse que para cada pareja de picos para cada carbono, la razón entre las señales de ectoína/hidroxiectoína es aproximadamente constante. Las tres moléculas de ectoína insertadas sobre los espectros representan las distribuciones de isotopómeros correspondientes a A, B y C. El marcaje relativo (en porcentaje) para cada átomo de carbono se representa siguiendo el código de la escala cromática a la derecha de (E). En los casos en los que haya diferencia, la mitad superior de la bolita que representa el átomo de carbono hace referencia al marcaje esperado procedente de  $[2-^{13}\text{C}]$ piruvato/ $[2-^{13}\text{C}]$ fosfoenolpiruvato, y la mitad inferior al procedente de fosfoenolpiruvato no marcado. Para un mayor detalle, consúltese la sección *Determinación de razones de flujos metabólicos* y la Tabla I.S4 y Figura I.S5 del Anexo III.



**Efecto de la salinidad en los flujos metabólicos, las razones de flujos Pc/Pdh, Cs/EctA y Pc/Cs**

El reparto de piruvato y acetil-coenzima A entre las distintas rutas del metabolismo central de *C. salexigens* que consumen estos dos sustratos puede describirse mediante las razones de flujos (o flujos relativos) Pc/Pdh, Pc/Cs y Cs/EctA, ayudando a comprender la distribución de flujos en esta parte del metabolismo. La razón Cs/EctA cuantifica la fracción de acetil-coenzima A que ingresa en el CAT frente a la que es destinada a la síntesis de ectoínas. La razón de flujo Pc/Pdh indica la fracción de piruvato que se transforma en oxalacetato frente a la que se oxida a acetil-coenzima A. Por último, la razón Pc/Cs permite establecer una comparación de la importancia de la actividad anaplerótica en relación a la del CAT, y puede verse como una lectura del balance de las necesidades biosintéticas respecto a las energéticas de las células (Figura I.3).

El patrón de enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  de las ectoínas sintetizadas a partir de [2- $^{13}\text{C}$ ]glucosa puede emplearse en la cuantificación de las razones de flujos de estos tres nodos (Tabla I.4). Con tal objetivo, se consideró aplicable la hipótesis del estado estacionario a los cultivos en fase exponencial de crecimiento (y por tanto, el marcaje en posiciones específicas del esqueleto carbonado de las ectoínas puede considerarse proporcional a los flujos metabólicos). Las áreas de los picos en los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN se utilizaron para la estimación de las razones de flujo, empleando ecuaciones algebraicas simples (Ver sección *Determinación de razones de flujos metabólicos* en Anexo III). Los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de ectoínas apuntan a una distribución de flujos en la que tanto anaplerosis como el CAT contribuyen de forma notable al flujo de carbono desde piruvato a ectoínas. De hecho, el flujo a través de Pdh es casi dos veces mayor que el de Pc, y el flujo debido a Cs es menor que el debido a EctA (Tabla I.4). Atendiendo a la razón de flujos Pc/Cs, se puede deducir que la proporción de anaplerosis frente a catabolismo es muy similar en las tres salinidades probadas. Este hecho resulta sorprendente, ya que se esperaba una carga biosintética menor a baja salinidad, dado que la síntesis de ectoínas es más baja en dichas condiciones (Figura I.2A). Esta observación podría estar relacionada con el metabolismo *overflow* y los bajos niveles de Cs (Tabla I.3) descritos en los apartados anteriores. Los resultados obtenidos a partir de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de hidroxiectoínas y de ectoínas fueron muy similares entre sí (Tabla I.4). Además, la señal correspondiente al grupo COOH, marcado a partir de la metabolización de [1- $^{13}\text{C}$ ]glucosa resultó casi dos veces mayor que la señal de C6 (Figura I.4), acorde con la razón Pc/Pdh calculada. En conjunto, estos datos indican que la cantidad de acetil-coenzima dirigida a la síntesis de ectoínas es mayor que la consumida por el CAT, incluso en condiciones

de baja producción de ectoínas, explicando además el crecimiento poco eficiente de *C. salexigens* a baja salinidad.

**Tabla I.4.** Razones de flujos metabólicos estimadas a partir de los patrones de marcaje de ectoína y de hidroxietoína observados en espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de cultivos en medio mínimo M63 con  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ glucosa con NaCl 0,75 y 2,5 M. Abreviaturas: Pdh, piruvato deshidrogenasa; Pc, piruvato carboxilasa; EctA, diaminobutirato acetil transferasa; Cs, citrato sintasa.

Razón de flujos	Ectoína (NaCl 0,75 M)	Ectoína (NaCl 2,5 M)	Hidroxietoína <sup>a</sup> (NaCl 2,5 M)
Pc/Pdh	0,67 ± 0,10	0,61 ± 0,13	0,55 ± 0,07
Cs/EctA	0,70 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,68 ± 0,04
Pc/Cs	1,64 ± 0,07	1,49 ± 0,33	1,37 ± 0,22

<sup>a</sup>La señal del grupo carboxilo de la hidroxietoína aparecía solapada con la señal del C1 del glutamato. Las áreas de integración de estas señales se obtuvieron por estimación.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se ha logrado profundizar en el funcionamiento del metabolismo central de *C. salexigens*. Para poder prosperar en ambientes altamente salinos, este halófilo sintetiza ectoínas como sus principales solutos compatibles. La síntesis sostenida de ectoínas requiere un aporte constante de acetil-coenzima A y oxalacetato, ambos intermediarios del metabolismo central. Por tanto, las adaptaciones desarrolladas por *C. salexigens* pueden comprometer su fisiología como contrapartida, especialmente en condiciones de baja salinidad.

En concordancia con esto, un menor rendimiento en biomasa y la presencia de metabolismo *overflow* caracterizan el crecimiento a baja salinidad, coincidiendo con una menor tasa de producción de ectoínas. El seguimiento del marcaje isotópico de ectoínas desde [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa permitió sondear las rutas empleadas por *C. salexigens* para el catabolismo de la glucosa y la producción de ectoínas. Una de las principales conclusiones de estos estudios de marcaje es que *C. salexigens* emplea la ruta de ED para catabolizar la glucosa en lugar de la ruta de EM. Esta conclusión se apoya en la ausencia de una actividad fosfofructoquinasa detectable y en los patrones de incorporación en ectoínas y glicerol-3-fosfato de la marca isotópica de [1-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa. En este aspecto, *C. salexigens* es similar a algunas especies de *Pseudomonas* (del Castillo *et al.*, 2007; Buch *et al.*, 2008; Buch *et al.*, 2010) y otros microorganismos (Tiwari y Campbell, 1969; Sawyer *et al.*, 1977; Seo *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009) que usan la ruta de ED para el catabolismo de hexosas. El hallazgo de la carencia de una ruta glucolítica completa en *C. salexigens* refuerza la necesidad de una comprensión más detallada y profunda de las rutas usadas realmente por los organismos antes de poder construir modelos metabólicos teóricos útiles, así como para el uso de las técnicas de análisis del balance de flujos (en inglés, *Flux Balance Analysis*).

Tras una acumulación extracelular inicial, el gluconato empezó a consumirse junto a la glucosa durante la fase exponencial de crecimiento (Figura I.1). Este comportamiento sugiere, al igual que en *Pseudomonas putida* y *Klebsiella pneumoniae*, que el gluconato se produce de forma temprana y rápida, probablemente por la oxidación periplásmica de la glucosa, y que su asimilación se encuentra limitada por unas reacciones posteriores más lentas (Hommes *et al.*, 1989; del Castillo *et al.*, 2007). Esta podría no ser la única vía de incorporación de la glucosa a la ruta de ED, ya que tanto glucoquinasa como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa están anotadas en el genoma de *C. salexigens* (Anexo III, Tabla I.S1). La detección de actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Tabla I.3) sugiere que la glucosa podría ingresar en la ruta

de ED mediante la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfoglucono-1,5-lactona y gluconato-6-fosfato (Figura I.3). Además, *C. salexigens* es capaz de crecer en D-glucono-1,5-lactona, D-gluconato y 2-cetogluconato como únicas fuentes de carbono (Anexo III, Figura I.S4). Por tanto, son varias las fuentes de carbono que pueden alimentar la ruta de ED, a semejanza de lo que ocurre en *P. putida* (Anexo III, Figura I.S1) (del Castillo *et al.*, 2007).

La ruta de ED es utilizada por numerosas bacterias y arqueas mesófilas y halófilas (Conway, 1992; Oren y Mana, 2003; Falb *et al.*, 2008). En las arqueas hipertermófilas se ha propuesto que la presencia de variantes no fosforilativas y semifosforilativas de la ruta de ED podrían jugar un papel importante en la termoadaptación, permitiendo a las células evitar la producción de intermediarios termolábiles (Ahmed *et al.*, 2004). Aunque no está claro si esta ruta supone alguna ventaja en la adaptación a altas salinidades, considerar el balance global de la ruta puede ayudar a esclarecer las razones de su utilización preferente. La ruta de EM produce 2 moléculas de ATP y 2 de NADH por molécula de glucosa, mientras que la ruta de ED se caracteriza por un menor rendimiento energético, rindiendo sólo un ATP por glucosa. Adicionalmente, el balance redox de la ruta de ED puede ser diferente, dependiendo de si la glucosa es oxidada en el citoplasma por la ruta fosforilativa o en el periplasma por la ruta no fosforilativa (Figura I.3). En el primer caso, se produce un NADPH y un NADH, y en el segundo, se forma únicamente un NADH y una quinona reducida. El menor rendimiento en síntesis de biomasa en los cultivos que utilizaron una fuente de carbono más oxidada, como el 2-cetogluconato (Anexo III, Figura I.S4), podría interpretarse como reflejo de la importancia de NADPH para una producción de ectoínas y crecimiento eficientes. La síntesis de ectoínas consume 3 equivalentes de NADPH, y las rutas catabolizadoras de la glucosa deben proveer no sólo el esqueleto carbonado sino además los equivalentes de reducción necesarios. La existencia de varias vías alternativas para la metabolización de la glucosa con diferentes balances redox, podría permitir al microorganismo un control de la velocidad de producción de equivalentes de reducción y un ajuste fino de su estado redox para maximizar el crecimiento y la biosíntesis de ectoínas.

El análisis del marcaje isotópico de las ectoínas permitió además estimar el reparto del flujo metabólico entre el CAT y las rutas anapleróticas (Figura I.5). La principal reacción anaplerótica resultó ser Pc. La razón de flujos Pc/Pdh estimada a partir del patrón de marcaje de las ectoínas quedó dentro del rango de 0,55 a 0,67 (Tabla I.4), mientras que en el caso de otras bacterias mesófilas crecidas en glucosa como *E. coli*, *Bacillus subtilis* o *Corynebacterium glutamicum*, esta proporción de flujos no excede 0,4 (Wendisch *et al.*, 2000; Dauner *et al.*, 2001; Renilla *et al.*, 2012). Aunque esta pueda no parecer una diferencia muy grande,

debemos tener en cuenta que más de la mitad del acetil-coenzima A producido por Pdh es consumido por EctA lo que, en condiciones de alta salinidad es una cantidad apreciable. De hecho, el alto nivel de actividad Pc combinado con una razón Pc/Cs alta refleja mejor un flujo anaplerótico alto (Tabla I.4) e indica que la anaplerosis juega un papel importante en la reposición del oxalacetato retirado para síntesis de ectoínas.

Las actividades enzimáticas obtenidas en este trabajo están de acuerdo con las reportadas en otras bacterias como *P. aeruginosa* (Buch *et al.*, 2010) o *E. coli* (Peng y Shimizu, 2003; Castaño-Cerezo *et al.*, 2009). En consistencia con la alta necesidad de anaplerosis, la actividad Pc resultó mayor que la observada en bacterias mesófilas (Buch *et al.*, 2010). Asimismo, las razones de flujo estimadas, la mayor parte de las actividades enzimáticas medidas y los coeficientes de consumo de amonio se mantuvieron prácticamente constantes con independencia de los diferentes requerimientos de síntesis de ectoínas. Es destacable el hecho de que la producción de ectoínas potenciada a altas salinidades tiene lugar a expensas de la producción de proteínas (Figura I.2B), equilibrando el consumo de amonio total (Argandoña *et al.*, 2010). Globalmente, estos datos dan una idea de cierta rigidez metabólica que, junto con la alta velocidad de consumo de glucosa y la alta razón Pc/Cs, constituyen la base de la menor eficiencia metabólica y del intenso metabolismo overflow observado a bajas concentraciones de sal. La alta velocidad de consumo de glucosa a baja salinidad concuerda con lo descrito en el caso del metabolismo *overflow* del acetato en *E. coli* (Vemuri *et al.*, 2006). Dado que la razón Cs/EctA varía escasamente con la salinidad, esto indica que la incorporación de acetil-coenzima A al CAT es la limitante a baja salinidad.

El resultado global obtenido de que la eficacia metabólica de *C. salexigens* sea mayor a alta salinidad resulta sorprendente y parece anti intuitivo, puesto que, según lo discutido por Oren (Oren, 1999), podría esperarse que la síntesis de las altas concentraciones de solutos compatibles orgánicos que se requieren para satisfacer el equilibrio osmótico, impondría una gran carga para las reservas de carbono y energía de las células. No debe olvidarse que el metabolismo *overflow* se observó en condiciones típicas de laboratorio, empleando una concentración de glucosa relativamente alta (20 mM) como única fuente de carbono, y por tanto podría no ser representativo del metabolismo de *C. salexigens* en su medio natural. Es interesante señalar que los metabolitos excretados por *C. salexigens* durante la fase exponencial de crecimiento fueron recuperados para ser usados como fuentes de carbono secundarias en fases posteriores del crecimiento de los cultivos. Aunque glucosa y gluconato se consumieron antes y de forma simultánea, el consumo de otros ácidos orgánicos no comenzó hasta haberse agotado la glucosa, indicando la probable actividad de mecanismos de

represión por catabolito. Esto resulta importante, ya que en *Pseudomonas* se prefiere el consumo de ácidos orgánicos sobre la utilización de azúcares (Rojo, 2010), sugiriendo que la jerarquía de preferencias de los metabolitos es diferente en *C. salexigens*.

Los resultados muestran que el metabolismo central de *C. salexigens* se encuentra optimizado para el crecimiento en ambientes de alta salinidad, siendo menos eficiente a bajas concentraciones de sal. A pesar de esto, *C. salexigens* puede crecer en un amplio rango de concentraciones de sal comparado con otros halófilos, abarcando desde 0,5 hasta 3 M de NaCl en medio mínimo (Vargas *et al.*, 2008). A bajas salinidades, el exceso de glucosa no puede ser utilizado por el metabolismo central, quizá en parte debido a algunas enzimas del metabolismo central, como Cs o Gdh, cuyos niveles de actividad son menores que el propio flujo de consumo de glucosa, y actuarían como un cuello de botella bajo estas condiciones de crecimiento. Por tanto, el exceso de glucosa es desviado hacia el metabolismo *overflow*. La alta razón entre flujos anapleróticos con respecto a los catabólicos resulta un hecho sorprendente, especialmente si consideramos que prosperar en condiciones de estrés osmótico normalmente es energéticamente costoso, particularmente en microorganismos que emplean la estrategia “*organic solutes-in*” (Varela *et al.*, 2004; Oren, 2011).

## CONCLUSIONES

Este trabajo presenta la primera descripción experimental del metabolismo de la bacteria altamente halotolerante *C. salexigens*. Este microorganismo usa la ruta de ED para la oxidación de la glucosa. Los datos presentados muestran que la eficacia metabólica de esta bacteria es altamente dependiente de la salinidad del medio de cultivo. El metabolismo de *C. salexigens* está bien adaptado para mantener altos flujos biosintéticos hacia la síntesis de ectoínas. Además, la existencia de múltiples rutas para los primeros pasos de catabolización de la glucosa podría permitirle alcanzar un crecimiento con un balance redox equilibrado más fácilmente, lo que resulta de especial relevancia cuando la carga biosintética es alta. Aunque estas características permiten al microorganismo crecer bajo estrés osmótico, al mismo tiempo le hacen menos eficiente para el crecimiento a baja salinidad. En conjunto, este trabajo representa la primera incursión en las características metabólicas específicas desarrolladas por la evolución de los microorganismos halófilos para enfrentarse a la alta salinidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, H., Tjaden, B., Hensel, R., y Siebers, B. (2004) Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff pathways in *Thermoproteus tenax*: metabolic parallelism or specific adaptation? *Biochem Soc Trans* **32**: 303-4.
- Aoshima, M., Ishii, M., Yamagishi, A., Oshima, T., y Igarashi, Y. (2003) Metabolic characteristics of an isocitrate dehydrogenase defective derivative of *Escherichia coli* BL21(DE3). *Biotechnol Bioeng* **84**: 732-737.
- Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J., y Ventosa, A. (2001) *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.
- Argandoña, M., Nieto, J.J., Iglesias-Guerra, F., Calderón, M.I., García-Esteba, R., y Vargas, C. (2010) Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3575-89.
- Ates, O., Oner, E.T., y Arga, K.Y. (2011) Genome-scale reconstruction of metabolic network for a halophilic extremophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. *BMC Syst Biol* **5**: 12.
- Buch, A., Archana, G., y Naresh Kumar, G. (2008) Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Res Microbiol* **159**: 635-42.
- Buch, A., Archana, G., y Naresh Kumar, G. (2010) Heterologous expression of phosphoenolpyruvate carboxylase enhances the phosphate solubilizing ability of fluorescent pseudomonads by altering the glucose catabolism to improve biomass yield. *Bioresour Technol* **101**: 679-87.
- Cánovas, D., Borges, N., Vargas, C., Ventosa, A., Nieto, J.J., y Santos, H. (1999) Role of N $\gamma$ -acetyldiaminobutyrate as an enzyme stabilizer and an intermediate in the biosynthesis of hydroxyectoine. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3774-3779.
- Canovas, D., Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Rhodes, D., *et al.* (1997) Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**: 25794-801.
- Canovas, D., Vargas, C., Csonka, L., Ventosa, A., y Nieto, J. (1996) Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol* **178**: 7221-7226.
- Caspi, R., Altman, T., Dreher, K., Fulcher, C.A., Subhraveti, P., Keseler, I.M., *et al.* (2012) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* **40**: D742-53.
- Castaño-Cerezo, S., Pastor, J.M., Renilla, S., Bernal, V., Iborra, J.L., y Cánovas, M. (2009) An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **8**: 54.

- Castillo, T. del, Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J., Fuhrer, T., Sauer, U., y Duque, E. (2007) Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *J Bacteriol* **189**: 5142-52.
- Cayol, J.L., Ducerf, S., Patel, B., Garcia, J.L., Thomas, P., y Ollivier, B. (2000) *Thermohalobacter berrensensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly halophilic bacterium from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 559-564.
- Conway, T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev* **9**: 1-27.
- Copeland, A., O'Connor, K., Lucas, S., Lapidus, A., Berry, K.W., Detter, J.C., et al. (2011) Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11(T)). *Stand Genomic Sci* **5**: 379-88.
- Csonka, L.N., O'Connor, K., Larimer, F., Richardson, P., Lapidus, A., Ewing, A.D., et al. (2005) What we can deduce about metabolism in the moderate halophile *Chromohalobacter salexigens* from its genomic sequence. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Gunde-Cimerman, N., Oren, A., y Plemenitas, A. (eds). pp. 267-285.
- Dauner, M., Storni, T., y Sauer, U. (2001) *Bacillus subtilis* metabolism and energetics in carbon-limited and excess-carbon chemostat culture. *J Bacteriol* **183**: 7308-7317.
- Eisenberg, C. (1991) Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* **173**: 4700-4706.
- Entner, N., y Doudoroff, M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem* **196**: 853-862.
- Falb, M., Müller, K., Königsmäier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., Gronau, S. von, et al. (2008) Metabolism of halophilic archaea. *Extrem Life under Extrem Cond* **12**: 177-96.
- García-Esteba, R., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Capote, N., Iglesias-Guerra, F., Nieto, J.J., y Vargas, C. (2006) The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol* **188**: 3774-84.
- Goss, T.J., Perez-Matos, A., y Bender, R.A. (2001) Roles of glutamate synthase, gltBD, and gltF in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **183**: 6607-19.
- Hommes, R.W.J., Postma, P.W., Tempest, D.W., y Neijssel, O.M. (1989) The influence of the culture pH value on the direct glucose oxidative pathway in *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418. *Arch Microbiol* **151**: 261-267.
- Kanehisa, M., y Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**: 27-30.
- Kemp, R.G., y Tripathi, R.L. (1993) Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase complements fructose 1,6-bisphosphatase but not phosphofructokinase deficiency in

*Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 5723-5724.

Klapa, M.I., Park, S.M., Sinskey, A.J., y Stephanopoulos, G. (1999) Metabolite and isotopomer balancing in the analysis of metabolic cycles: I. Theory. *Biotechnol Bioeng* **62**: 375-391.

Kretzschmar, U., Khodaverdi, V., Jeoung, J.-H., y Görisch, H. (2008) Function and transcriptional regulation of the isocitrate lyase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* **190**: 151-8.

Lessie, T.G., y Phibbs, P. V (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* **38**: 359-88.

Metallo, C.M., Walther, J.L., y Stephanopoulos, G. (2009) Evaluation of <sup>13</sup>C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. *J Biotechnol* **144**: 167-74.

Netzer, R., Krause, M., Rittmann, D., Peters-Wendisch, P.G., Eggeling, L., Wendisch, V.F., y Sahm, H. (2004) Roles of pyruvate kinase and malic enzyme in *Corynebacterium glutamicum* for growth on carbon sources requiring gluconeogenesis. *Arch Microbiol* **182**: 354-63.

Nicolas, C., Kiefer, P., Letisse, F., Krömer, J., Massou, S., Soucaille, P., *et al.* (2007) Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett* **581**: 3771-6.

Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334-348.

Oren, A. (2011) Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* **13**: 1908-23.

Oren, A., Heldal, M., Norland, S., y Galinski, E.A. (2002) Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extrem Life under Extrem Cond* **6**: 491-8.

Oren, A., y Mana, L. (2003) Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 83-87.

Pastor, J.M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L.N., *et al.* (2010) Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv* **28**: 782-801.

Peng, L., y Shimizu, K. (2003) Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 163-178.

Peters, P., y Galinski, E.A. (1990) The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 157-162.

Prabhu, J., Schauwecker, F., Grammel, N., Keller, U., y Bernhard, M. (2004) Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3130-3132.

Renilla, S., Bernal, V., Fuhrer, T., Castaño-Cerezo, S., Pastor, J.M., Iborra, J.L., *et al.* (2012) Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 2109-24.

- Reshetnikov, A.S., Rozova, O.N., Khmelenina, V.N., Mustakhimov, I.I., Beschastny, A.P., Murrell, J.C., y Trotsenko, Y.A. (2008) Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *FEMS Microbiol Lett* **288**: 202-10.
- Roberts, M.F. (2004) Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: update 2004. *Front Biosci* **9**: 1999-2019.
- Rojo, F. (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 658-84.
- Sakamoto, N., Kotre, A.M., y Savageau, M.A. (1975) Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J Bacteriol* **124**: 775-83.
- Sawyer, M.H., Baumann, P., y Baumann, L. (1977) Pathways of d-fructose and d-glucose catabolism in marine species of *Alcaligenes*, *Pseudomonas marina*, and *Alteromonas communis*. *Arch Microbiol* **112**: 169-172.
- Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., et al. (2011) A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environ Microbiol* **13**: 1973-94.
- Seo, J.-S., Chong, H., Park, H.S., Yoon, K.-O., Jung, C., Kim, J.J., et al. (2005) The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol* **23**: 63-8.
- Severin, J., Wohlfarth, A., y Galinski, E.A. (1992) The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629-1638.
- Tang, K.-H., Feng, X., Tang, Y.J., y Blankenship, R.E. (2009) Carbohydrate metabolism and carbon fixation in *Roseobacter denitrificans* OCh114. *PLoS One* **4**: e7233.
- Tesch, M., Graaf, A.A. de, y Sahm, H. (1999) *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1099-1109.
- Tiwari, N., y Campbell, J. (1969) Enzymatic control of the metabolic activity of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose or succinate media. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **192**: 395-401.
- Trotsenko, I.A., y Khmelenina, V.N. (2002) The biology and osmoadaptation of haloalkaliphilic methanotrophs. *Microbiology* **71**: 123-132.
- Varela, C.A., Baez, M.E., y Agosin, E. (2004) Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4222-4229.
- Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., y Nieto, J.J. (2008) Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* **4**: 14.
- Vargas, C., Coronado, M.J., Ventosa, A., y Nieto, J.J. (1997) Host range, stability and

compatibility of broad host-range-plasmids and a shuttle vector in moderately halophilic bacteria. Evidence of intrageneric and intergeneric conjugation in moderate halophiles. *Syst Appl Microbiol* **20**: 173-181.

Vemuri, G.N., Altman, E., Sangurdekar, D.P., Khodursky, A.B., y Eiteman, M.A. (2006) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3653-3661.

Ventosa, A., Nieto, J.J., y Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504-44.

Wendisch, V.F., Graaf, A.A. de, Sahm, H., y Eikmanns, B.J. (2000) Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol* **182**: 3088-96.

Werf, M.J. van der, Guettler, M. V., Jain, M.K., y Zeikus, J.G. (1997) Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch Microbiol* **167**: 332-342.

Werner, S., Diekert, G., y Schuster, S. (2010) Revisiting the thermodynamic theory of optimal ATP stoichiometries by analysis of various ATP-producing metabolic pathways. *J Mol Evol* **71**: 346-55.

Yagi, T., Toyosato, M., y Soda, K. (1976) Crystalline aspartate aminotransferase from *Pseudomonas striata*. *FEBS Lett* **61**: 34-7.

Ye, J., McGinnis, S., y Madden, T.L. (2006) BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **34**: W6-9.

## CAPÍTULO IV

# **La influencia de la composición del medio sobre la producción de ectoínas y el metabolismo *overflow* en *Chromohalobacter salexigens*: hacia el cultivo de alta densidad**

*Este capítulo es una adaptación del siguiente trabajo (en preparación):*

*“Towards density cultivation of Chromohalobacter salexigens: understanding the interplay of carbon and nitrogen supply for ectoines production and metabolic overflow”*



**RESUMEN**

El metabolismo *overflow* es uno de los mayores impedimentos para una conversión eficiente de materias primas en productos químicos específicos. *Chromohalobacter salexigens* es una bacteria halotolerante y halófila que acumula ectoínas en el citosol como solutos compatibles. La producción de ectoínas y el metabolismo *overflow* están condicionados por la concentración de sal en el medio de cultivo, de forma que la eficiencia metabólica de *C. salexigens* depende de manera acusada de la composición de este medio. Se observaron cambios en el metabolismo *overflow* cuando se cambió la razón C/N en el medio de cultivo. Los análisis mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN del marcaje isotópico de las ectoínas revelaron una gran rigidez metabólica, con razones de flujos casi constantes en todas las condiciones ensayadas. Una proporción desequilibrada de C/N en el medio de cultivo dio como resultado la aparición del metabolismo *overflow*, acumulando piruvato, y en menor medida, acetato. El metabolismo *overflow* resultó de especial relevancia en condiciones de limitación de N. Los análisis de un mutante en *ect* demostraron la conexión entre el metabolismo *overflow* y la síntesis de ectoínas. La suplementación de los cultivos con alanina o glutamato como fuentes de nitrógeno demostró que: i) la asimilación del nitrógeno limita el crecimiento de *C. salexigens* y ii) la acumulación de piruvato inhibe el crecimiento. Por último, en cultivos en “fed-batch”, el rendimiento en biomasa se vio afectado por el esquema de alimentación escogido. En los cultivos “fed-batch” de alta densidad celular de *C. salexigens* con limitación de nitrógeno, fue posible obtener un rendimiento alto en biomasa y en producción de ectoínas, al minimizar el metabolismo *overflow* y la acumulación de nutrientes.

## INTRODUCCIÓN

*Chromohalobacter salexigens* (anteriormente conocida como *Halomonas elongata*) (Arahal *et al.*, 2001) es una bacteria halófila modelo que sintetiza ectoína e hidroxiectoína como solutos compatibles principales, acumulándolos en el citoplasma a niveles proporcionales a la osmolaridad exterior (Poolman y Glaasker, 1998). La síntesis de estos solutos se regula con el fin de poder hacer frente a altas concentraciones salinas ambientales, y en respuesta a otros factores de estrés abiótico como las altas temperaturas (Csonka y Epstein, 1996; Canovas *et al.*, 1996; Salvador *et al.*, 2015).

Los solutos compatibles son moléculas orgánicas muy solubles, de bajo peso molecular, o bien con carga, o zwitteriónicas, que se acumulan en el citoplasma de los microorganismos que se hayan expuestos a estrés osmótico, con el fin de facilitar el equilibrio osmótico (Brown, 1990; Oren, 1999). Las ectoínas encuentran aplicaciones cosméticas, biomédicas y biotecnológicas, como protectores celulares en productos de parafarmacia y cosméticos (en la protección de la piel) y como estabilizadores de enzimas y anticuerpos en la formulación de bioproductos complejos (Pastor *et al.*, 2013). Actualmente se están desarrollando nuevas aplicaciones en crio- y neuroprotección. La síntesis química de las ectoínas no es asequible desde el punto de vista industrial, lo que convierte a los métodos microbiológicos la alternativa más viable (Kunte *et al.*, 2014).

*Chromohalobacter salexigens* es un buen candidato para la producción industrial de ectoínas. Todo proceso industrial aceptable ha de obtener altos rendimientos y productividades. Las ectoínas, en este aspecto, constituyen un objetivo ambicioso para la ingeniería metabólica, ya que una producción óptima de este compuesto depende del metabolismo tanto del carbono como del nitrógeno. Recientemente se han descrito las adaptaciones metabólicas específicas que ha desarrollado el metabolismo del carbono de *C. salexigens* para mantener el nivel necesario de síntesis de ectoínas a altas salinidades. La síntesis de ectoínas es muy exigente en términos de esqueletos carbonados y equivalentes de reducción. Además, el metabolismo de la glucosa es relativamente ineficiente, presentando metabolismo *overflow*, particularmente a baja salinidad. Aunque a altas concentraciones de sal la velocidad de crecimiento se ralentiza a causa de la demanda biosintética impuesta por la síntesis de ectoínas, como bacteria halófila, el rendimiento en biomasa no se ve perjudicado por la sal, y en estas condiciones el metabolismo sufre un reajuste que lo hace más eficiente (Pastor *et al.*, 2013; Salvador *et al.*, 2015). Otras contribuciones recientes al metabolismo de organismos halófilos han aprovechado las ventajas del modelado metabólico. Recientemente se ha publicado una reconstrucción detallada del

metabolismo de ectoínas en *Halomonas elongata* (Schwibbert *et al.*, 2011). La reconstrucción a escala genómica del metabolismo de *C. salexigens* (Ates *et al.*, 2011) no está completa, ya que algunas rutas metabólicas relevantes no están incluidas (como la ruta de síntesis de ectoínas). Se han podido identificar varias discrepancias con datos experimentales (C. Vargas, M. Argandoña, J. J. Nieto, F. Piubeli y M. Salvador, resultados no publicados). Aún no se conocen las características específicas de la interacción entre el metabolismo del nitrógeno en *C. salexigens* y la producción de ectoínas.

Los solutos compatibles también pueden servir como fuente de carbono, de nitrógeno o de energía, ya sea a partir de reservas intracelulares, o como fuentes externas que tras la muerte celular o la liberación de los solutos, quedan disponibles para otros organismos. En *C. salexigens*, el catabolismo de las ectoínas tiene lugar únicamente en condiciones de osmolaridad óptima (Vargas *et al.*, 2006). El catabolismo de las ectoínas en *C. salexigens* y *Sinorhizobium meliloti* se produce a través de al menos dos sistemas muy similares entre sí. Jebbar y colaboradores identificaron un operón implicado en la asimilación y catabolismo de las ectoína en *S. meliloti* (*ehuABCD-eutABCD*) (Jebbar *et al.*, 2005). En *C. salexigens* se han encontrado ortólogos de algunos de estos genes, aunque su organización en el genoma es diferente (C. Vargas, resultados no publicados) (Pastor *et al.*, 2010).

Actualmente, la producción de ectoína se lleva a cabo mediante un proceso denominado “ordeñado bacteriano”, que implica una serie de ciclos repetitivos de una fermentación en reactor tanque alimentado (“fed-batch”) de *Halomonas elongata* en un 15% (p/v) de NaCl. Estas condiciones permiten la acumulación intracelular de ectoína, seguida de un choque hipoosmótico al 3% (p/v) de NaCl para liberar estos osmolitos de las células (Sauer y Galinski, 1998; Kunte *et al.*, 2014). Los procesos alternativos que se han descrito para la producción de osmolitos se basan en la fermentación “fed-batch” de *Brevibacterium epidermis* (Onraedt *et al.*, 2005), y la síntesis y excreción continuas de osmolitos por bacterias mesófilas recombinantes como *Escherichia coli* (Schubert *et al.*, 2007; Bestvater *et al.*, 2008) y *Corynebacterium glutamicum* (Becker *et al.*, 2013) o la cepa silvestre *Halomonas salina* (Zhang *et al.*, 2009). Este último sistema ha dado lugar a la mayor productividad volumétrica de ectoína (7,9 g/L·d). Por otro lado, *Marinococcus* M5, crecida en una fermentación tipo “fed-batch” con un sistema de microfiltración produjo altas concentraciones de hidroxiectoína a partir de ectoína durante la fase estacionaria de crecimiento (Schiraldi *et al.*, 2006).

El desarrollo de procesos biológicos eficaces y económicos con extremófilos supone un reto, debido por un lado a las dificultades asociadas a la operación del birreactor (Deive *et al.*,

2012), y por otro a una comprensión aún incompleta de la fisiología de *C. salexigens* (Pastor *et al.*, 2010). Esto puede llevar a una transformación poco eficiente de las materias primas, debido a la formación de productos secundarios y/o bajos rendimiento en biomasa por inhibición (Deive *et al.*, 2012). De hecho, con frecuencia se considera el metabolismo *overflow* como una de las mayores limitaciones en la biotecnología microbiana. En los cultivos en “fed-bath”, la alimentación de nutrientes al fermentador se realiza siguiendo una estrategia de volumen fijo, o de volumen variable. Este modo de operación presenta ciertas ventajas frente a los fermentadores por lotes o a los fermentadores continuos, ya que permite alcanzar grandes densidades celulares (debido a la prolongación de la fase exponencial decrecimiento), muy importante en la producción de productos asociados al crecimiento, y también permite controlar mejor la formación de productos secundarios (Tsuneo y Shoichi, 1984).

El propósito de este trabajo es la determinación de la importancia de la interacción entre los metabolismos de carbono y de nitrógeno en la producción de ectoínas. Se probaron diferentes relaciones carbono/nitrógeno en el medio de crecimiento de cultivos discontinuos de *C. salexigens*. Se analizaron los cambios en el crecimiento, en el rendimiento en producción de ectoínas y en la eficiencia metabólica observados en estos cultivos con el objetivo de diseñar un programa de alimentación eficiente para los cultivos en “fed-batch”.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las dos cepas usadas a lo largo de este estudio fueron *Chromohalobacter salexigens* CHR61, una cepa mutante espontánea de *C. salexigens* DSM 3043<sup>T</sup> resistente a rifampicina, y *C. salexigens* CHR62, una cepa deficiente en la síntesis de ectoínas (referida en el texto como la cepa  $\Delta$ ect o ect<sup>-</sup>).

El medio mínimo M63 estándar (pH 7,2) contuvo: 16,3 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,2 g/L KOH, 2 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 39,5 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,5 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , suplementado con NaCl 43,8, 146,0 g/L, según la salinidad requerida (correspondiente a 0,75 o 2,5 M). Se usó glucosa 20 mM como fuente de carbono. Se hicieron crecer cultivos discontinuos de 100 mL en matraces de 0,5 L a 37 y 45°C en un agitador rotatorio a 210 rpm.

Los cultivos se iniciaron a partir de cultivos en stock congelados en glicerol al 20%. Los precultivos se crecieron en medio SW-2, que contuvo: 15,6 g/L NaCl, 4,07 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,6 g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/L KCl, 67 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 47 mg/L NaBr y 13 mg/L  $\text{NaHCO}_3$  (con un contenido total de sales de 2% (p/v) o 0,3 M) (Vargas et al. 1997). Los cultivos en M63 se inocularon con precultivos en SW-2 crecidos durante una noche en fase exponencial de crecimiento, hasta una densidad óptica inicial ( $A_{600}$ ) de 0,025. Los stocks en glicerol, medios sólidos y precultivos se suplementaron con rifampicina (Rf) esterilizada por filtración hasta una concentración de  $\mu\text{g/mL}$ .

### Análisis del efecto de la composición del medio de cultivo en cultivos discontinuos

Con el fin de analizar el efecto de diferentes proporciones glucosa/amonio en el crecimiento de *C. salexigens* y en la producción de ectoínas, se realizaron dos series de cultivos discontinuos. Para ello se usó medio M63 con i) glucosa entre 10 y 100 mM y ii) amonio entre 5 y 200 mM. En los experimentos con fuentes de nitrógeno orgánicas (ectoínas, alanina, glutamato), se sustituyó el amonio por cualquiera de estas fuentes (20 mM).

### Cultivos en biorreactor

Los cultivos de alta densidad celular se llevaron a cabo en fermentadores Biostat (Braun, Melsungen, Alemania). Los fermentadores estaban provistos de un vaso de 2 L. Se monitoreó la concentración de oxígeno y el pH con electrodos específicos (Mettler-Toledo, Greifensee,

Suiza). El flujo de aire y la agitación se mantuvieron de forma automatizada en 1-4 vvm y 40-1200 rpm, respectivamente, con el fin de asegurar que el oxígeno disuelto se mantuviera por encima del 30% de saturación. Se mantuvo el pH del medio en 7,2 mediante la adición automatizada de disoluciones concentradas de HCl/KOH.

*Cultivos en fed-batch.* La alimentación de las células se hizo siguiendo un régimen exponencial. Se controló la velocidad de alimentación para mantener la velocidad de crecimiento en un valor determinado. Para ello, se diseñó un medio concentrado con NaCl 2,5 M y concentraciones del resto de los componentes de 10 a 50 veces mayores que la concentración en el biorreactor. El esquema de alimentación se dividió en dos fases, consistentes 500 mL de medio 10 y 50 veces concentrado, respectivamente.

### **Procedimientos analíticos**

#### *Crecimiento celular.*

Para estimar la concentración de células, se resuspendieron en una disolución de NaCl (de 0,6 a 3 M<sub>9</sub>, y se determinó la absorbancia a 600 nm (Espectrofotómetro de luz visible Amersham Biosciences Novaspec Plus, Uppsala, Suecia). Se aplicó una correlación entre los valores de  $A_{600}$  y el peso seco para la cepa empleada.

#### *HPLC de intercambio iónico acoplado a RI/UV.*

Se analizaron los metabolitos extracelulares (glucosa, gluconato, piruvato, acetato y lactato) mediante un equipo de HPLC (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, EE.UU.) provisto con detectores de índice refracción diferencial y de diodo de UV (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, EE.UU.), empleando una columna de intercambio iónico (HPX-87H, BioRad Labs, Hércules, EE.UU.). Se usó como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un caudal de 0,5 mL/minuto y 45°C.

#### *Determinación de glucosa y amonio con métodos espectrofotométricos.*

La glucosa extracelular se determinó con un kit específico para glucosa (basado en la actividad hexoquinasa) (GAHK20, Sigma). El amonio extracelular se determinó con otro kit enzimático (11112732035, de R-Biopharm, Darmstadt, Alemania). Ambos kits se utilizaron de acuerdo con las indicaciones de los fabricantes. Las medidas se llevaron a cabo en un lector de microplacas de 96 pocillos Synergy HT (Bio-Tek, Winooski, E.E.U.U).

*Estudios de marcaje isotópico mediante  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.*

Para los experimentos de marcaje, se crecieron las células en 100 mL de medio M63 en presencia de glucosa o fructosa marcadas isotópicamente (CortecNet, Voisins-Le Bretonneux, Francia). Los sustratos marcados isotópicamente empleados fueron  $[1-^{13}\text{C}]$ glucosa y  $[1-^{13}\text{C}]$ fructosa. Los cultivos se detuvieron en fase exponencial media-tardía ( $A_{600}$  entre 1,5 y 2), y las células se separaron del sobrenadante por centrifugación (15 min a 16000g y 4°C). Los solutos compatibles (ectoínas y glutamato) se extrajeron a partir de los sedimentos celulares aplicando una variación del protocolo descrito por García-Esteba y colaboradores., (García-Esteba et al., 2006). La fase acuosa se liofilizó y resuspendió en metanol deuterado. Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se registraron a 25°C usando espectrómetros Bruker AV400 y Bruker AV500 a 400 y 500 MHz, respectivamente, con un tiempo de relajación de 1 s en el caso de  $^1\text{H}$ -RMN y de 60 s en el caso de  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Las áreas de los picos se integraron para su cuantificación. Para la cuantificación de los picos de  $^1\text{H}$ -RMN se añadió ácido fórmico a cada muestra como estándar externo hasta una concentración final de 5 mM. Para la cuantificación de picos de  $^{13}\text{C}$ -RMN, se introdujo un capilar conteniendo  $[\text{U-}^{13}\text{C}_4]$ -1,1',3,3'-tetrametilurea en el tubo de RMN como estándar externo de tal forma que la concentración de  $^{13}\text{C}$  en el tubo de RMN fuera equivalente a 18,1 mM. La concentración de solutos compatibles se determinó comparando las áreas de los picos de  $^1\text{H}$  de ectoínas y glutamato con el área del átomo de hidrógeno unido a carbono del ácido fórmico. El porcentaje de marcaje en cada posición de carbono de ectoínas y glutamato se determinó de dos maneras. En  $^1\text{H}$ -RMN, se usaron las áreas de los picos centrales y picos satélites para determinar el nivel de marcaje de cada posición de carbono. Estos porcentajes se confirmaron en  $^{13}\text{C}$ -RMN comparando las áreas de los picos de cada carbono con el área del pico de  $[\text{U-}^{13}\text{C}_4]$ -1,1',3,3'-tetrametilurea. En ambos casos, se sustrajo la contribución prevista de la abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  de la abundancia  $^{13}\text{C}$  de cada posición. Los ratios de flujo se estimaron como se había descrito previamente (Pastor *et al.*, 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*C. salexigens* se cultivó en medios con diferente contenido en glucosa y amonio con el fin de determinar cómo responde a los cambios en los aportes externos de fuentes de carbono y nitrógeno. Inicialmente se observaron los efectos de una alimentación no balanceada de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de ectoínas en *C. salexigens* en cultivos en matraces agitados.

### Efecto de la glucosa en el crecimiento y la producción de ectoínas

Los experimentos de crecimiento discontinuo se realizaron en una concentración fija de amonio (30 mM), y con concentraciones variables de glucosa (de 10 a 100 mM). La concentración de glucosa no afectó a la velocidad de crecimiento en las condiciones probadas, mientras que el rendimiento en biomasa aumentó con la concentración de glucosa hasta 40 mM, cuando la fuente de nitrógeno empezó a ser la limitante (**Figura IV.1A**). El rendimiento específico de producción de ectoínas disminuyó en un 40% a concentraciones altas de glucosa (**Figura 1B**), y también resultó menor el coeficiente de síntesis de biomasa. El título volumétrico de ectoínas presentó un máximo a 40 mM.

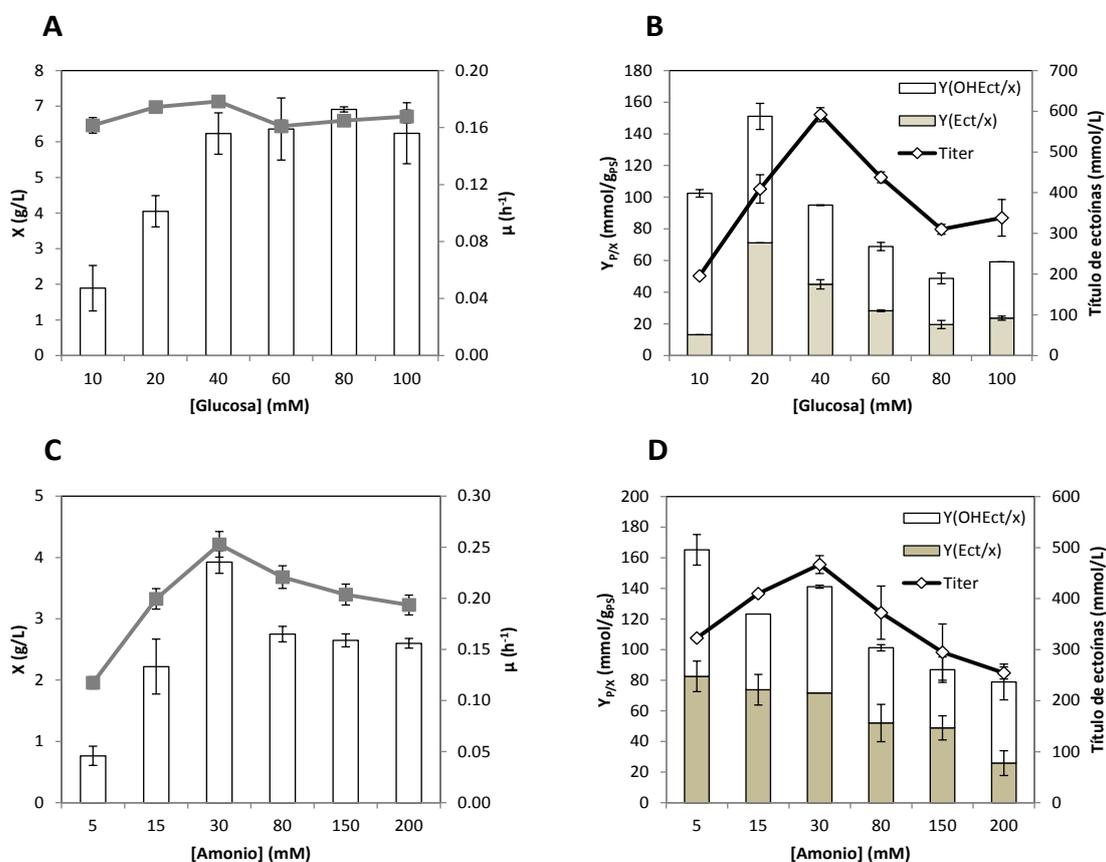
### Efecto de la concentración de amonio en el crecimiento y la producción de ectoínas

Los cultivos discontinuos se hicieron crecer en una concentración de amonio entre 5 y 200 mM, con una concentración fija de glucosa (20 mM). La concentración de amonio afectó tanto al rendimiento en biomasa como a la velocidad de crecimiento de *C. salexigens*. A bajas concentraciones, ambos parámetros se incrementaron en proporción al aporte de amonio. Los bajos rendimientos en biomasa se deben a una síntesis de ectoínas y componentes celulares limitada por la escasez del nitrógeno. Además, el efecto sobre la velocidad de crecimiento sugiere que la actividad de los sistemas de captación de amonio se vea afectada por la concentración del mismo en el medio.

Se observó un descenso ligero en la velocidad de crecimiento con el aumento de la concentración de amonio (**Figura IV.1C**). La tasa de mortalidad celular en la fase estacionaria aumentó de forma llamativa a altas concentraciones de amonio, lo que indica que un exceso de esta fuente de nitrógeno podría tener efectos tóxicos en las células, aún más importantes tras el agotamiento de la fuente de carbono (**Figura IV.1C**). El contenido en ectoínas de las células fue menor a concentraciones mayores de amonio, mientras que su título volumétrico alcanzó un máximo a 30 mM (**Figura IV.1D**).

**Efectos de la limitación y exceso de nitrógeno sobre el metabolismo de *C. salexigens*: overflow de carbono y flujos metabólicos relativos**

La baja eficiencia del crecimiento de *C. salexigens* en presencia de un aporte de glucosa y amonio desequilibrado podría estar relacionada con: i) cambios metabólicos que producen un *overflow* de productos secundarios (como piruvato y acetato) (Pastor *et al.*, 2013) y ii) una producción de ectoínas menor debida a una disponibilidad reducida de amonio para síntesis de biomasa.



**Figura IV.1.** Efecto de la concentración de glucosa y de amonio en el crecimiento de *C. salexigens* growth. El efecto de la glucosa se analizó en medio mínimo M63 con amonio 30 mM y glucosa 10-100 mM. El efecto del amonio se analizó en el mismo medio con glucosa 20 mM y amonio 5-200 mM. (A, C) Velocidad de crecimiento (puntos) y biomasa máxima (barras). (B, D) Rendimientos específicos de ectoína (barras grises) e hidroxiectoína (barras blancas); los puntos indican el título volumétrico de las ectoínas. En todos los cultivos la concentración de NaCl fue 2,5 M. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos tres replicados biológicos.

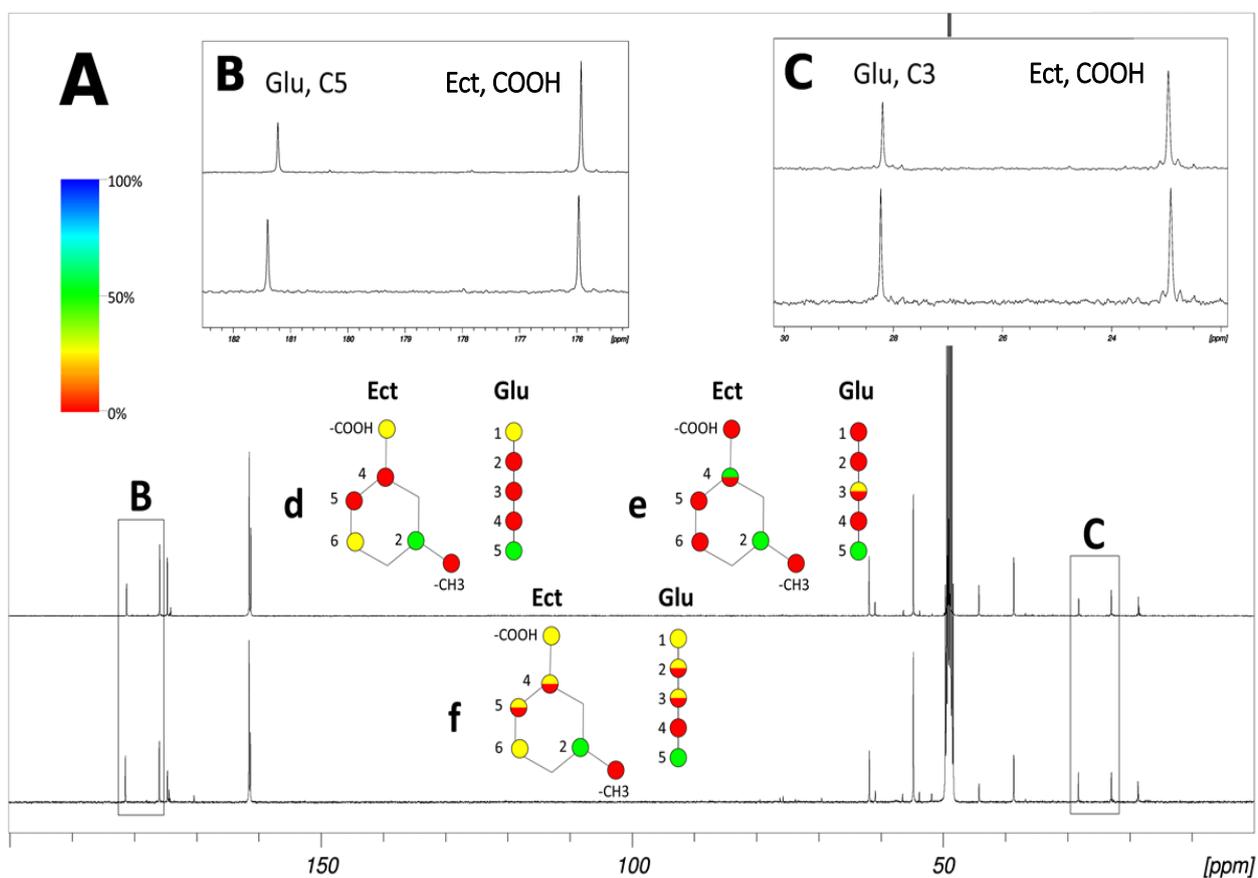
**Tabla IV.1.** Efecto de la ratio C/N en la alimentación sobre el metabolismo *overflow* de *C. salexigens*. Las células crecieron en medio mínimo M63 suplementado con glucosa y amonio en las concentraciones indicadas en la tabla.

	[Glucosa] (mM)	[Amonio] (mM)	qGluconato*	qPiruvato*	qAcetato*
<b>Glucosa variable</b>	10	30	4,74 ± 0,03	1,49 ± 0,13	N.D.
	20	30	2,44 ± 0,36	6,51 ± 0,18	N.D.
	40	30	5,14 ± 1,23	4,97 ± 0,23	N.D.
	60	30	10,72 ± 2,51	5,73 ± 2,30	N.D.
	80	30	2,83 ± 0,50	7,13 ± 0,76	N.D.
	100	30	5,37 ± 0,61	6,63 ± 0,25	N.D.
<b>Amonio variable</b>	20	5	40,74 ± 5,08	43,33 ± 9,83	N.D.
	20	15	1,61 ± 0,01	15,77 ± 1,42	2,13 ± 0,21
	20	30	2,44 ± 0,36	6,51 ± 0,18	N.D.
	20	80	5,66 ± 2,35	2,38 ± 0,23	N.D.
	20	150	3,66 ± 1,44	1,39 ± 0,71	N.D.
	20	200	8,26 ± 1,62	1,60 ± 0,18	N.D.

\*Velocidades expresadas en mmol/g<sub>PS</sub>·h.

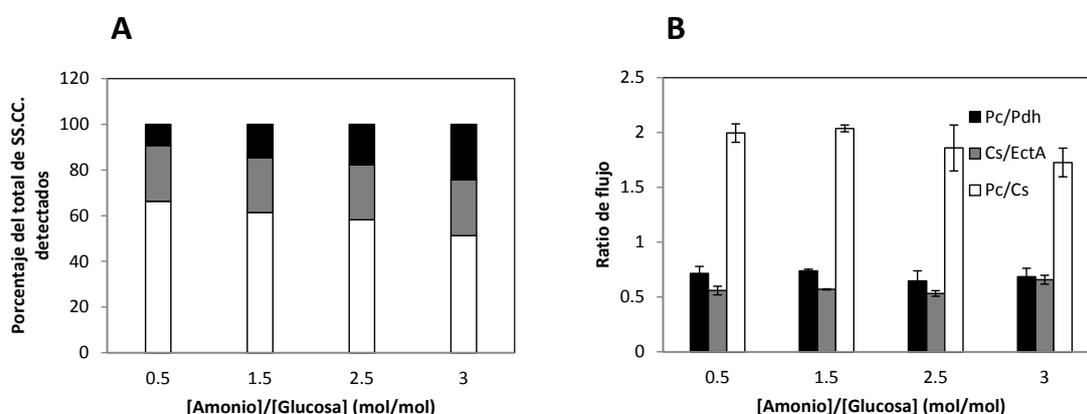
N.D. No detectado.

El crecimiento ineficiente de *C. salexigens* presenta una correlación con la acumulación en el medio de cultivo de gluconato, piruvato, y en menor medida acetato. Los perfiles metabólicos observados se vieron muy afectados por la naturaleza del nutriente limitante. La acumulación de piruvato y gluconato observada resultó especialmente alta en cultivos limitados por nitrógeno, y continuó después de que el crecimiento ya se hubiera detenido. El *overflow* metabólico observado en cultivos limitados por carbono fue mucho menor (Tabla IV.1). El piruvato y el acetato son metabolitos del *overflow*, y por tanto pueden servir como indicadores de un metabolismo ineficiente. Resulta interesante que, a una concentración de glucosa inicial dada, la velocidad de excreción de piruvato aumentó en proporción con la ratio C/N en el medio de cultivo. Por tanto, en *C. salexigens* el *overflow* depende de forma acusada de la disponibilidad de amonio en el medio. Recientemente, se ha propuesto que el piruvato podría tener un papel relevante en ambientes hipersalinos (Oren, 2015). Por otro lado, el gluconato no puede considerarse metabolito del *overflow*. Se cree que la oxidación rápida de la glucosa a gluconato se debe a una adaptación de algunos microorganismos que ofrece ventaja al competir por las fuentes de carbono, donde algunos microorganismos no son capaces de usar el gluconato como fuente de carbono. Además, el gluconato se consumió más adelante, en la segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento (Pastor *et al.*, 2013).



**Figura IV.2.** (A) Espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR de ectoínas producidas por *C. salexigens* en presencia de diferentes concentraciones de amonio en el medio. Las células crecieron en medio mínimo M63 con NaCl 2,5 M. La concentración de amonio fue 30 mM (espectro superior) o 50 mM (espectro inferior). Ver *Materiales y métodos* para mayor detalle. Las ampliaciones de (B) (C) muestran algunas señales significativas de ectoína y glutamato. Los tres esquemas superpuestos en los espectros representan el marcaje esperado en ectoína (Ect) y glutamato (Glu), para las tres rutas extremas posibles para la síntesis de ectoínas a partir de piruvato: (d) piruvato deshidrogenasa (Pdh) más una vuelta al ciclo del ácido cítrico (CAT), (e) piruvato carboxilasa y (f) piruvato carboxilasa (Pc) más una vuelta al CAT. El código de color indica el porcentaje de marcaje en cada posición, según la escala de color de la parte izquierda.

Es posible determinar ciertos flujos metabólicos relativos en nodos importantes del metabolismo rastreando la incorporación de  $^{13}\text{C}$  procedente de fuentes de carbono marcadas en posiciones específicas de las moléculas de ectoínas (Pastor *et al.*, 2013). Aprovechando este hecho, se cultivó a *C. salexigens* en  $[2-^{13}\text{C}]$ -glucosa en diferentes proporciones amonio/glucosa. Se observó un perfil alterado de solutos compatibles: en una ratio amonio/glucosa alta (es decir, en cultivos limitados por glucosa), *C. salexigens* acumuló glutamato hasta un nivel comparable al de las ectoínas (**Figura IV.2**). Se hizo una estimación de ciertas ratios de flujos relevantes a partir de los patrones de marcaje observados, como se ha descrito previamente (Pastor *et al.*, 2013). Concretamente, se estimaron las ratios entre piruvato carboxilasa y piruvato deshidrogenasa (Pc/Pdh), piruvato carboxilasa y citrato sintasa (Pc/Cs) y citrato sintasa y ectoína sintasa (Cs/EctA), pero sólo se detectaron pequeñas variaciones entre los cultivos con ratio amonio/glucosa entre 0,5 y 3 (**Figura IV.3B**). Este hecho es un reflejo de la rigidez metabólica de *C. salexigens* al enfrentarse a cambios ambientales. Previamente hemos descrito un patrón de rigidez similar en respuesta a la concentración de sal (Pastor *et al.*, 2013) que vuelve a ponerse de manifiesto en respuesta a cambios en los aportes de carbono y nitrógeno.



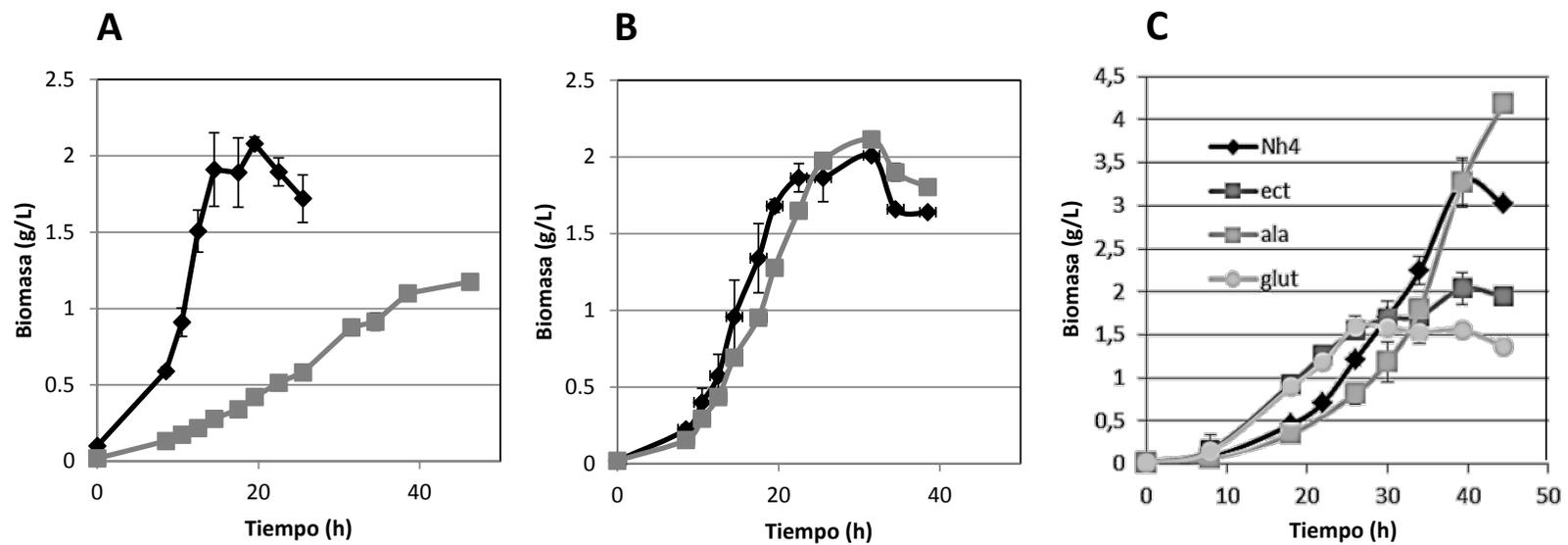
**Figura IV.3.** Efecto de la limitación de glucosa y de amonio sobre el metabolismo de *C. salexigens*. Las células crecieron en medio mínimo M63 con NaCl 2,5 M en diferentes ratios amonio/glucosa. (A) Contenido relativo en los solutos compatibles (SSC) ectoína (barras blancas), hidroxiectoína (barras grises) y glutamato (barras negras) al final de la fase exponencial de crecimiento. (B) Ratios de flujos metabólicos relevantes en el funcionamiento del nodo del piruvato entre los siguientes pasos enzimáticos: piruvato carboxilasa (Pc), piruvato deshidrogenasa (Pdh), citrato sintasa (Cs), y ectoína sintasa (EctA).

### Conexión entre el metabolismo *overflow* y el metabolismo de ectoínas: caracterización metabólica de un mutante *ect*-

En vista de la conexión existente entre la asimilación de glucosa y amonio y la síntesis de ectoínas y el metabolismo *overflow*, se cuestionó qué ocurriría con el *overflow* de *C. salexigens* en el caso de que no fuera capaz de sintetizar ectoínas. La síntesis de solutos compatibles supone una gran carga metabólica para las células, y está en función de la concentración de sal; a 2,5-3 M de NaCl, las ectoínas suponen hasta el 16-24% del peso seco celular (Pastor *et al.*, 2013). Para evaluar el metabolismo *overflow* en relación con la síntesis de ectoínas, se compararon los perfiles metabólicos de *C. salexigens* CHR61 y la cepa mutante *C. salexigens* CHR62, deficiente en la ruta de síntesis de ectoínas (por este motivo en adelante será referida como mutante  $\Delta ect$ ).

El crecimiento del mutante  $\Delta ect$  está muy mermado, y puede crecer únicamente en concentraciones de sal moderadas (p. ej. 0,75 M de NaCl), y a una velocidad mucho menor (**Figura IV.4A**). En cambio, en un medio suplementado con ectoína 20 mM como única fuente de nitrógeno, el crecimiento del mutante es similar al de la cepa silvestre (**Figura IV.3B**). Este hecho demuestra que: i) el crecimiento deficiente del mutante  $\Delta ect$  es consecuencia de su incapacidad de sintetizar ectoínas y ii) *C. salexigens* puede usar las ectoínas como la única fuente de carbono y de nitrógeno.

También se determinó el *overflow* del mutante  $\Delta ect$ . Al crecer en amonio como única fuente de nitrógeno, el mutante  $\Delta ect$  mostró un metabolismo ineficiente, con bajo coeficiente de síntesis de biomasa a partir de glucosa ( $Y_{X/Glc}$ ) y una acumulación alta de gluconato en el medio de cultivo (**Tabla IV.2**). La producción de los metabolitos del *overflow* (piruvato y acetato) fue similar para ambas cepas, representando aproximadamente el 20% de la glucosa consumida. Dado que el mutante  $\Delta ect$  no sintetiza ectoínas, el alivio de esta carga metabólica llevó a una disminución del 30% en la velocidad de consumo de glucosa. A pesar de esto, la acumulación de gluconato resultó 12 veces más rápida, lo que implica que la oxidación rápida de glucosa a gluconato no está sometida a una regulación que asegure las necesidades del crecimiento.



**Figura IV.4.** Conexión entre el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de ectoínas. Efecto de la mutación *ect<sup>-</sup>* en el crecimiento de *C. salexigens*. (A) Se cultivaron las cepas CHR61 (tipo silvestre) y CHR62 (mutante *ect<sup>-</sup>*, símbolos grises) en medio mínimo M63 con NaCl 0,75 M. (B) Se revirtió el fenotipo deficiente en el crecimiento tras la suplementación del medio de cultivo con ectoína 20 mM. (C) Efecto de la fuente de nitrógeno escogida en el crecimiento de *C. salexigens* CHR61 en medio M63 con NaCl 2,5 M y suplementado con 30 mM de amonio, 20 mM de alanina, 20 mM de glutamato o 20 mM de ectoína como única fuente de carbono.

El consumo de glucosa fue similar para las dos cepas al crecer en 20 mM de ectoína como única fuente de nitrógeno, y menor que en ausencia de ectoínas. Las velocidades específicas de consumo de glucosa y de producción de gluconato y piruvato fueron menores que en el medio control con amonio como fuente de nitrógeno. En conjunto, esto indica que: i) cuando *C. salexigens* usa ectoína como fuente de carbono y nitrógeno, el consumo de glucosa es menor, y ii) la producción de gluconato y piruvato está relacionada con la carga metabólica impuesta por la producción de ectoínas, siendo mucho menor cuando la ectoína está presente en el medio de crecimiento. Por otro lado, la producción de acetato aumentó en ambas cepas, con una concentración que llega a superar 5 mM, que podría ser consecuencia de un *overflow* específico causado por la degradación de las ectoínas (Schwibbert *et al.*, 2011). La ruta de degradación de las ectoínas se ha descrito en *Sinorhizobium meliloti* y *H. elongata* (Schwibbert *et al.*, 2011). Previamente se había determinado que el *overflow* del acetato en *C. salexigens* está en función de la concentración de sal en el medio (Pastor *et al.*, 2013). De hecho, estos resultados podrían indicar que la síntesis de ectoínas en esta bacteria es alta de forma constitutiva (lo que concuerda con las ratios de flujos casi constantes que se observaron en las distintas salinidades) mientras que la degradación de ectoínas podría ser un proceso regulado.

**Tabla IV.2.** Crecimiento de *C. salexigens* CHR61 (tipo silvestre) y CHR62 (mutante  $\Delta ect$ ) en medio mínimo M63 con NaCl 0,75 M.

Medio	Cepa	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	qGlucosa	qGluconato	qPiruvato	qAcetato
M63 + NaCl 0,75 M	CHR61	0,20±0,01	3,52	0,26	1,14	0,31
	CHR62	0,10±0,01	2,52	2,35	0,70	0,31
M63 + NaCl 0,75 M + Ectoína 20 mM	CHR61	0,18±0,01	2,59	0,01	0,12	0,69
	CHR62	0,19±0,01	2,82	0,12	0,96	0,92

### **Comprendiendo los cambios metabólicos en *C. salexigens*: síntesis y degradación de ectoínas y su conexión con el metabolismo central**

Para comprender mejor estos datos, hemos de tener en cuenta que la ruta de producción y degradación de ectoína y su integración en el metabolismo central. La síntesis de ectoína y hidroxiectoína consume aspartato y acetil coenzima A, ATP y NAD(P)H como cofactores y glutamato como fuente de nitrógeno. A su vez, la activación de los grupos amonio en forma de glutamato, que actúa como donador de grupos amino para la síntesis de aspartato (a través de la aspartato aminotransferasa) y de L-2,4-aminobutirato (a través de EctB), requiere el consumo de aún más cofactores. Para bacterias que crecen en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno, todos los compuestos nitrogenados derivan de los productos primarios de la asimilación del amonio: glutamato y glutamina (Neidhardt, 1996). El glutamato es el donador de grupos amino para la síntesis de ectoínas (Vargas *et al.*, 2008).

Se han descrito dos sistemas principales de captación de amonio en esta bacteria, que difieren en su afinidad por el sustrato. El sistema glutamina sintetasa/glutamato sintetasa (GS/GOGAT) es el sistema principal de captación de amonio en concentraciones bajas del mismo (<1 mM), mientras que glutamato deshidrogenasa (Gdh) es el sistema principal a concentraciones altas. Existen cinco genes anotados como supuestas glutaminas sintetasas en el genoma de *C. salexigens* (Copeland *et al.*, 2011): *csal0777*, *csal1181*, *csal1192*, *csal0243*, *csal0679*. La enzima glutamato sintasa es una proteína homodimérica compuesta por dos subunidades diferentes codificadas por *gltB* (*csal0615*) y *gltD* (*csal0616*). Tanto el sistema GS/GOGAT como Gdh incorporan amonio al esqueleto carbonado de 2-cetoglutarato. El glutamato formado es reconocido generalmente como la principal reserva de nitrógeno celular, transfiriéndolo a otros compuestos en reacciones catalizadas por aminotransferasas. Sin embargo, ambos sistemas difieren en sus requerimientos energéticos (Neidhardt, 1996). Recientemente, Schwibbert y colaboradores aplicaron un análisis in silico de la red metabólica de *H. elongata* que puso de manifiesto que el uso de uno u otro sistema de captación de amonio altera el rendimiento global de la ruta de síntesis de ectoínas (Schwibbert *et al.*, 2011). *C. salexigens* metaboliza la glucosa por medio de la ruta de Entner-Doudoroff, cuyo rendimiento en ATP es bajo. Por tanto, el uso del sistema GS/GOGAT o Gdh para la incorporación de amonio en esta bacteria podría tener un impacto mayor que en el caso de *H. elongata*, y explicaría la menor eficiencia del crecimiento en bajas concentraciones de amonio.

Por tanto, la estequiometría global de la ruta de síntesis de ectoínas depende del sistema escogido para la síntesis de glutamato, que implica un menor número de equivalentes de ATP en el caso de Gdh. Esto subraya la magnitud de la carga energética y redox impuesta por la

síntesis de ectoínas, ya que se requieren (2 o 4) equivalentes de ATP y 3 equivalentes de NADPH por mol de ectoína, según la ruta considerada para la síntesis de glutamato. Se requiere un equivalente adicional para la síntesis de hidroxiectoína.

La diferencia de afinidad por su sustrato de los dos sistemas de incorporación de amonio permite explicar el efecto observado de la concentración de amonio sobre la velocidad de crecimiento. En concentraciones bajas, la célula emplea la ruta GS/GOGAT, gastando más energía con el fin de aprovechar al máximo el poco amonio disponible. A concentraciones mayores de amonio, éste se asimila a través de la ruta de Gdh, menos costosa en energía (**Figura IV.1C**).

### **Conexión entre el metabolismo *overflow* y el metabolismo del amonio: evaluación del crecimiento en varias fuentes de nitrógeno**

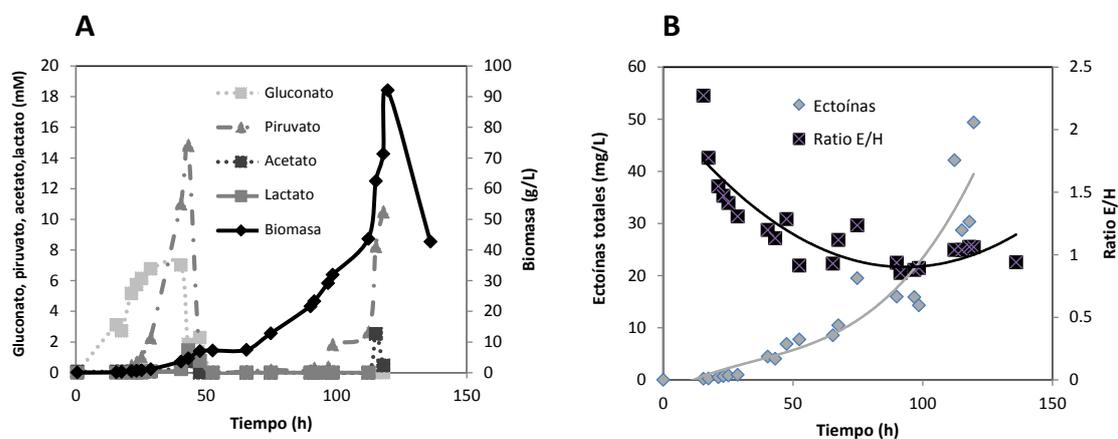
Con el fin de confirmar la relación entre las rutas de asimilación de amonio y el *overflow*, se llevaron a cabo cultivos en cuatro diferentes fuentes de nitrógeno: amonio, ectoína, alanina, y glutamato. Los experimentos se realizaron en medio mínimo con NaCl 2,5 M. La cinética de crecimiento y el metabolismo *overflow* demostraron que la asimilación de nitrógeno es una carga metabólica importante para *C. salexigens*. La velocidad de crecimiento fue mayor en presencia de ectoína o glutamato como fuentes de nitrógeno. La acumulación de gluconato y de piruvato siguió una tendencia inversa a la de la velocidad de crecimiento. Se observó un retraso prolongado (fase *lag*) al crecer en alanina, debido probablemente a la acumulación de un exceso de piruvato, formado por transaminación de la alanina (**Figura IV.4C**). En todos los casos, se detectó poco o ningún acetato en el medio de cultivo.

### **Cultivo en fed-batch de *C. salexigens***

El conocimiento obtenido de todos estos resultados se empleó en el desarrollo de una estrategia de alimentación que permitiera un cultivo de alta densidad de *C. salexigens*. Como se ha descrito en las secciones previas, los cultivos alimentados con bajos niveles de glucosa y de amonio mostraron los mayores contenidos de ectoína por unidad de biomasa. Esto indica que *C. salexigens* no está bien adaptada a concentraciones altas de nutrientes, lo que se puede explicar por su adaptación a crecer en ambientes pobres en nutrientes (Zahran, 1997; Oren, 2002). Este fenómeno es común en otros muchos microorganismos, y normalmente aparece acoplado a un metabolismo *overflow* alto durante el crecimiento en medios ricos en nutrientes. Además, un flujo bajo de nutrientes limita la cantidad de células producidas, lo que afecta a la productividad de los procesos. Este efecto resultó particularmente evidente cuando los niveles de nitrógeno eran bajos, lo que afectó a la velocidad de crecimiento. Por último, la acumulación

de gluconato y el *overflow* de piruvato podrían evitarse. Para poder conseguir un nivel alto de producción de ectoínas, debe alcanzarse un rendimiento específico de ectoínas y de biomasa altos. Por todo esto, se decidió crecer *C. salexigens* en cultivos fed-batch limitados por glucosa, buscando optimizar las condiciones para mantener un cultivo de alta densidad.

Se diseñaron los perfiles de alimentación fed-batch usando glucosa como nutriente limitante. Tras una fase inicial de cultivo discontinuo, se alimentaron los cultivos con una disolución concentrada de nutrientes, fijando la velocidad de crecimiento mediante el control de la velocidad de alimentación del nutriente limitante (Nielsen, 2006). Durante todo el experimento se monitorearon el crecimiento, la producción de ectoínas y metabolitos y el consumo de nutrientes.



**Figura IV.5.** Cultivo de alta densidad de *C. salexigens* en sistema fed-batch. (A) Perfil de un cultivo en fed-batch de *C. salexigens* alimentado de forma exponencial a una velocidad fija de  $0,05 \text{ h}^{-1}$ . Se muestra la evolución de la biomasa y los productos secundarios principales (gluconato, piruvato, acetato y lactato). Las fermentaciones se llevaron a cabo en un sistema Biostat B system, como se describe en la sección *Materiales y métodos*.

Cuando la velocidad de crecimiento se ajustó a un nivel relativamente alto ( $0,1 \text{ h}^{-1}$ ), se acumularon glucosa y amonio en el medio de crecimiento y el crecimiento se detuvo en una densidad celular baja ( $12,6 \text{ g/L}$ ) como consecuencia de la inhibición por el amonio (Tabla IV.3). En una velocidad de crecimiento menor ( $0,05 \text{ h}^{-1}$ ) se alcanzó una densidad mucho mayor ( $28,1 \text{ g/L}$ ). En este caso, el nutriente limitante fue la glucosa, que se agotó completamente en el medio de cultivo. Sin embargo, la alimentación de amonio no estaba equilibrada y continuó acumulándose en el reactor, llevando al final a una inhibición del crecimiento. Para minimizar este efecto, se diseñó un esquema de alimentación con dos disoluciones de alimentación distintas. La segunda fase de alimentación se inició con una disolución de nutrientes menos concentrada en amonio. De esta forma se llegó a una densidad de  $42,4 \text{ g/L}$ . El título de ectoínas

fue de 4,2 g/L. Este último esquema de alimentación, con una disolución con contenido bajo en nitrógeno y glucosa como nutriente limitante, permitió no sólo controlar la velocidad de crecimiento, sino también limitar el metabolismo *overflow*. Se observó acumulación de gluconato y piruvato durante las fases iniciales de los cultivos, alcanzándose concentraciones de hasta 7 mM de gluconato y 15 mM de piruvato. La cantidad de lactato y acetato observada fue mucho menor. Desde las 50 h de cultivo en adelante, no se detectó ninguno de estos metabolitos en los sobrenadantes de los cultivos, demostrando la limitación por carbono del crecimiento, de manera que las células recuperaban los productos excretados con el fin de maximizar el rendimiento metabólico.

**Tabla IV.3. Comparación de cultivos discontinuos y en fed-batch de *C. salexigens* DSM 3043.**

	Discontinuo	Fed-batch A	Fed-batch B	Fed-batch C
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.18	0,1	0,05	0,05
[Glucosa] inicial (mM)	20	20	20	20
[Amonio] inicial (mM)	30	30	30	15
Glucosa alimentada total (g)	3.6.	75,64	111,7	111,7
Glucosa consumida total (g)	3.6	65,25	111,7	111,7
<b>Perfil de alimentación (g/L·h)</b>				
24-48h	N.A.	0,26-17,9	0,14-0,6	0,10-0,4
48- hasta el final	N.A.	-	0,6-3,6	0,4-2,26
<b>Biomasa máxima (g/L)</b>	2.12	12,6	28,1	42,36
<b>Producción de ectoína (g/L)</b>	0.16	0,27	1,62	1,96
<b>Producción de hidroxietoína (g/L)</b>	0.18	0,18	1,51	2,25
<b>Rendimiento en biomasa (g<sub>CDW</sub>·g<sub>glucose</sub><sup>-1</sup>)</b>	0.6	0,25	0,5	0,75
<b>Tiempo (h)</b>	60	72	168	90
<b>Agitación (rpm)</b>	41-554	41-860	41-1138	41-1149
<b>pO<sub>2</sub> (%O<sub>2</sub>)</b>	30	30	30	30
<b>Aireación (L/minuto)</b>	1-6	1-4	1-2	1-3,5

Por tanto, estos resultados demuestran que el *overflow* que se observa en *C. salexigens* en los cultivos discontinuos se puede minimizar en cultivos fed-batch limitados por la fuente de carbono, lo que indica que la eficiencia metabólica de esta especie es mucho mayor en entornos pobres en nutrientes.

## CONCLUSIONES

En este trabajo, se muestra por primera vez la importancia de unos flujos de carbono y nitrógeno equilibrados para la producción óptima de ectoínas. El metabolismo de *C. salexigens* está optimizado para maximizar la supervivencia en ambientes pobres en nutrientes. En un entorno rico en nutrientes su metabolismo resulta ineficiente, y un alto nivel de metabolismo overflow limita el crecimiento. Hay que señalar que los cambios en el overflow observados en *C. salexigens* al variar la ratio C/N no se reflejó en los flujos metabólicos relativos. La rigidez metabólica de *C. salexigens* se demostró mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN. Por último, fue posible cultivar *C. salexigens* en alta densidad en condiciones de limitación de carbono.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J., y Ventosa, A. (2001) *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.
- Ates, O., Oner, E.T., y Arga, K.Y. (2011) Genome-scale reconstruction of metabolic network for a halophilic extremophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. *BMC Syst Biol* **5**: 12.
- Becker, J., Schäfer, R., Kohlstedt, M., Harder, B.J., Borchert, N.S., Stöveken, N., et al. (2013) Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microb Cell Fact* **12**: 110.
- Bestvater, T., Louis, P., y Galinski, E.A. (2008) Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems* **4**: 12.
- Brown, A.D. (1990) *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, .
- Canovas, D., Vargas, C., Csonka, L., Ventosa, A., y Nieto, J. (1996) Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol* **178**: 7221-7226.
- Copeland, A., O'Connor, K., Lucas, S., Lapidus, A., Berry, K.W., Detter, J.C., et al. (2011) Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11(T)). *Stand Genomic Sci* **5**: 379-88.
- Csonka, L.N., y Epstein, W. (1996) Osmoregulation. In *Escherichia coli and Salmonella*. Neidhart, F.C. (ed.). American Society for Microbiology, Washington D.C. pp. 1210-1223.
- Deive, F.J., López, E., Rodríguez, A., Longo, M.A., y Sanromán, M.Á. (2012) Targeting the production of biomolecules by extremophiles at bioreactor scale. *Chem Eng Technol* **35**: 1565-1575.
- Jebbar, M., Sohn-Bösser, L., Bremer, E., Bernard, T., y Blanco, C. (2005) Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol* **187**: 1293-304.
- Kunte, H.J., Lentzen, G., y Galinski, E.A. (2014) Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products. *Curr Biotechnol* **3**: 10-25.
- Neidhardt, F.C. (ed.) (1996) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Nielsen, J. (2006) Microbial process kinetics. In *Basic Biotechnology*. Ratledge, C., y Kristiansen, B. (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 155-180.
- Onraedt, A.E., Walcarius, B.A., Soetaert, W.K., y Vandamme, E.J. (2005) Optimization of ectoine synthesis through fed-batch fermentation of *Brevibacterium epidermis*. *Biotechnol Prog* **21**: 1206-12.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334-348.

- Oren, A. (2002) *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Oren, A. (2015) Pyruvate: A key nutrient in hypersaline environments? *Microorganisms* **3**: 407-416.
- Pastor, J.M., Bernal, V., Salvador, M., Argandona, M., Vargas, C., Csonka, L.N., *et al.* (2013) Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Biol Chem* **288**: 17769-81.
- Pastor, J.M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L.N., *et al.* (2010) Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv* **28**: 782-801.
- Poolman, B., y Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29**: 397-407.
- Salvador, M., Argandoña, M., Pastor, J.M., Bernal, V., Cánovas, M., Csonka, L.N., *et al.* (2015) Contribution of RpoS to metabolic efficiency and ectoines synthesis during the osmo- and heat-stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *Environ Microbiol Rep* **7**: 301-311.
- Sauer, T., y Galinski, E. (1998) Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* **59**: 128.
- Schiraldi, C., Maresca, C., Catapano, A., Galinski, E.A., y Rosa, M. De (2006) High-yield cultivation of *Marinococcus* M52 for production and recovery of hydroxyectoine. *Res Microbiol* **157**: 693-9.
- Schubert, T., Maskow, T., Benndorf, D., Harms, H., y Breuer, U. (2007) Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3343-7.
- Schwibbert, K., Marin-Sanguino, A., Bagyan, I., Heidrich, G., Lentzen, G., Seitz, H., *et al.* (2011) A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environ Microbiol* **13**: 1973-94.
- Tsuneo, Y., y Shoichi, S. (1984) Fed-batch techniques in microbial processes. In *Bioprocess Parameter Control*. Fiechter, A. (ed.). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. pp. 147-194.
- Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., y Nieto, J.J. (2008) Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* **4**: 14.
- Vargas, C., Jebbar, M., Carrasco, R., Blanco, C., Calderón, M.I., Iglesias-Guerra, F., y Nieto, J.J. (2006) Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Appl Microbiol* **100**: 98-107.
- Zahran, H.H. (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol Fertil Soils* **25**: 211-223.
- Zhang, L.-H., Lang, Y.-J., y Nagata, S. (2009) Efficient production of ectoine using ectoine-excreting strain. *Extrem Life under Extrem Cond* **13**: 717-24.

## CAPÍTULO V

# **Metabolismo de fructosa en *Chromohalobacter salexigens*: interacción entre las rutas de Embden-Meyerhof- Parnas y Entner-Doudoroff**

*Este capítulo es una adaptación del siguiente trabajo (en preparación):*

*“Fructose metabolism in Chromohalobacter salexigens: interplay between the Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff pathways”*



## RESUMEN

La bacteria halotolerante y halófila *C. salexigens* emplea la ruta de Entner-Doudoroff para metabolizar la glucosa, estando condicionada su eficiencia metabólica por la alta demanda biosintética impuesta por sus solutos compatibles, las ectoínas. La rigidez metabólica que parece haber desarrollado *C. salexigens* para soportar esta sobrecarga metabólica resulta en un metabolismo menos eficiente a bajas concentraciones de sal, lo que deriva en la formación de subproductos metabólicos. Al crecer en fructosa como única fuente de carbono no se observa este metabolismo *overflow*, y se alcanza un rendimiento en biomasa mayor. En este trabajo se analizan los pasos iniciales de dos rutas metabólicas alternativas de incorporación de fructosa al metabolismo central. Por un lado, la fructosa se puede fosforilar en C6 y, a causa de la carencia de 6-fosfofructoquinasa, canalizarse de forma cuantitativa hacia la ruta de ED. Por otro lado, un sistema fosfotransferasa específico para fructosa (PTS) puede importar y fosforilar en C1 la fructosa, que seguidamente ingresa en una ruta similar a EMP. La presencia de enzimas de ambas rutas se demostró mediante ensayos basados en  $^{31}\text{P}$ -RMN, concretamente fosfoglucoisomerasa, 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato, fructoquinasa, y 1-fosfofructoquinasa. Se logró asignar las dos últimas actividades a dos marcos abiertos de lectura (ORFs) de *C. salexigens* (Csal0931 y Csal2647, respectivamente), mediante su clonaje en *E. coli* y la confirmación de sus actividades en ensayos espectrofotométricos. El seguimiento del marcaje isotópico de  $[1-^{13}\text{C}]$ fructosa, reveló que la fructosa se metabolizaba en un 85 y un 15% mediante las rutas de ED y de EMP, respectivamente. De esta forma, las rutas existentes para el metabolismo de fructosa otorgan a *C. salexigens* una mayor flexibilidad metabólica para la catabolización de la fuente de carbono que en el caso de glucosa, lo que permite equilibrar de forma más eficiente y controlada las demandas de biosíntesis con las de energía.

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos halófilos son capaces de prosperar en ambientes con alta osmolaridad, en concentraciones de sal que en ocasiones, pueden llegar a alcanzar las condiciones de saturación. Hoy en día, se sabe que estos microorganismos son metabólicamente muy diversos y están presentes en todos los dominios de la vida. Centrándonos en los dominios procariotas, se han desarrollado dos estrategias principales para hacer frente a altas concentraciones de sal. La primera de ellas, conocida como la estrategia “*salt-in*”, es casi exclusiva de la familia de arqueas Halobacteriaceae, algunas bacterias anaerobias y la bacteria aerobia *Salinibacter ruber* (Oren, 2002; Roberts, 2004). En pocas palabras, esta estrategia consiste en la acumulación intracelular de iones inorgánicos que compensan la salinidad exterior. La segunda estrategia, denominada “*organic solutes-in*”, es una estrategia más evolucionada y muy extendida entre las bacterias, especialmente entre bacterias fotótrofas y quimioorganótrofas (Galinski, 1993). Esta estrategia se basa en la acumulación intracelular de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, conocidos como solutos compatibles, que compensan los iones salinos del medio extracelular (Severin *et al.*, 1992; Ventosa *et al.*, 1998). Para poder acumular tales compuestos, en caso de no estar disponibles en el entorno, deben ser sintetizados *de novo*. A diferencia de la estrategia “*salt-in*”, este requerimiento impone una carga metabólica sobre el metabolismo de los microorganismos que la empleen (Oren, 1999). Los altos requerimientos de energía para la síntesis de solutos compatibles explican por qué esta estrategia no se ha hallado en bacterias anaerobias.

Los microorganismos que usan una u otra estrategia son metabólicamente diversos y utilizan diferentes fuentes de energía y de carbono. Ambos tipos de halófilos han desarrollado a lo largo de su evolución adaptaciones metabólicas específicas que resultan de gran interés, tanto para la ciencia básica como para la ciencia aplicada (Oren, 2002; Schiraldi y de Rosa, 2002; Morozkina *et al.*, 2010).

*C. salexigens* es una bacteria halófila aerobia que acumula ectoínas en respuesta a altas concentraciones de sal ambientales (Arahal *et al.*, 2001). En un artículo reciente, se ha descrito el metabolismo de glucosa en *C. salexigens*. Esta bacteria ha desarrollado características metabólicas específicas que incrementan sus posibilidades de sobrevivir en entornos muy demandantes. Por ejemplo, se requiere un flujo anaplerótico elevado para sostener la síntesis de ectoínas a expensas de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT), y *C. salexigens* resuelve este problema con una alta actividad piruvato carboxilasa, reponiendo así

el pool intracelular de oxaloacetato (OAA) (Pastor *et al.*, 2013). Además, el alto grado de adaptación metabólica al crecimiento en alta salinidad ha derivado en una rigidez de los nodos metabólicos que da como resultado un metabolismo poco eficiente de la glucosa a baja concentración de sal y una sobreproducción de piruvato y acetato (metabolismo *overflow* o rebosadero).

Una de las principales características de *C. salexigens* es la ausencia de glucolisis para el metabolismo de la glucosa (Pastor *et al.*, 2013). La glucolisis, también conocida como ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, es la ruta para el catabolismo inicial de la glucosa en muchos microorganismos (Romano y Conway, 1996). Consiste en diez pasos enzimáticos y produce dos moles de piruvato, NADH y ATP por mol de glucosa. La ruta de Entner-Doudoroff es una ruta alternativa para la oxidación de la glucosa que esté presente en muchos microbios (Werner *et al.*, 2010). Comparte varias de sus enzimas con la glucolisis. Las diferencias principales entre ambas rutas son: i) el mecanismo de fosforilación (activación) de la glucosa, ii) el conjunto de enzimas usado y iii) el rendimiento energético global (Entner y Doudoroff, 1952; Conway, 1992). En *E. coli* y muchas bacterias coexisten ambas rutas, y la contribución de cada una a la oxidación global de la glucosa puede distinguirse empleando sustratos marcados (Führer *et al.*, 2005). Sin embargo, muchas bacterias poseen exclusivamente una de las dos rutas, debido frecuentemente a la carencia de 6-fosfofructoquinasa, una de las enzimas reguladoras de la glucolisis. Este es el caso de *C. salexigens* y *Pseudomonas putida* (Sawyer *et al.*, 1977; Pastor *et al.*, 2013).

La preferencia de *C. salexigens* por la ruta de Entner-Doudoroff podría estar relacionada con la producción de NADPH, requerido para la síntesis de ectoínas, siendo clave, por tanto, para explicar su adaptación satisfactoria al crecimiento en alta salinidad (Stöveken *et al.*, 2011; Pastor *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015).

Un análisis preliminar del genoma de *C. salexigens* indicó que podría ser capaz de asimilar fructosa por medio de la glucolisis (Csonka *et al.*, 2005). De hecho, se identificaron los genes que codifican para el sistema fosfotransferasa transportador de fructosa (PTS<sup>Fru</sup>) y su parálogo PTS<sup>Ntr</sup>. Mientras que PTS<sup>Fru</sup> codifica para un transportador específico de fructosa (de Crécy-Lagard *et al.*, 1991), el papel de PTS<sup>Ntr</sup> es menos conocido (Chavarría *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo fue describir el metabolismo de *C. salexigens* en fructosa, la identificación de las rutas implicadas, y comprender su relevancia. Se ha caracterizado fisiológicamente en detalle el metabolismo de fructosa en *C. salexigens*, incluyendo: la confirmación de la presencia de enzimas del metabolismo de fructosa mediante <sup>31</sup>P-RMN y

ensayos espectrofotométricos con extractos celulares y enzimas purificadas, la identificación funcional de las rutas por  $^{13}\text{C}$ -RMN y el análisis de la organización en el genoma de *C. salexigens* de los genes implicados en el metabolismo de fructosa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas y cultivos

A lo largo de este estudio se empleó *C. salexigens* CHR61, un mutante espontáneo de *C. salexigens* DSM 3043<sup>T</sup> resistente a rifampicina (Tabla II.1). Los *stocks* en glicerol, cultivos sólidos y precultivos se suplementaron con rifampicina hasta una concentración final de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los precultivos se iniciaron a partir de *stocks* en glicerol al 20%, y se hicieron crecer en medio SW-2 (con un contenido total de sales de 2% (p/v) o 0,3 M), compuesto por 15,6 g/L de NaCl, 4,07 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,6 g/L de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/L de KCl, 67 mg/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 47 mg/L de NaBr y 13 mg/L de  $\text{NaHCO}_3$  (Vargas *et al.*, 1997).

Para la producción de ectoína y la caracterización de las rutas metabólicas, se hizo crecer la cepa en medio mínimo M63 (pH 7,2) conteniendo 16,3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,2 g/L de KOH, 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 39,5 mg/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,5 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . El medio M63 se suplementó con 43,8, 87,6 ó 146,0 g/L de NaCl (correspondientes a 0,75, 1,5 ó 2,5 M). Como fuente de carbono, se empleó 20 mM de fructosa o glucosa. Los cultivos en M63 se inocularon a una absorbancia inicial ( $A_{600}$ ) de 0,025 con un precultivo en fase exponencial crecido durante una noche en medio SW-2. Se crecieron cultivos de 100 mL en matraces de 0,5 L a 37°C en un agitador rotatorio a 210 rpm.

### Procedimientos analíticos

*Crecimiento celular.* Para medir la concentración de células, se resuspendieron las células en una disolución de NaCl (de 0,75 a 2,5 M), y se midió la absorbancia a 600 nm (Novaspec Plus Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences, Piscataway, EE.UU.). Se estableció una correlación entre la  $A_{600}$  y los gramos de peso seco (PS) para la cepa utilizada, según la siguiente ecuación:  $\text{g}_{\text{PS}}/\text{L} = 0,545 \cdot A_{600}$ .

*Determinación de fructosa extracelular y ácidos orgánicos.* Se determinaron los ácidos orgánicos extracelulares (gluconato, piruvato y acetato) y la fructosa mediante cromatografía de intercambio iónico en un equipo de HPLC Shimadzu LC-10 (Shimadzu Scientific Instruments,

Columbia, EE.UU.), equipado con detectores de índice de refracción diferencial y de *array* de diodos (UV) (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, EE.UU.). Para la separación de los ácidos orgánicos se usó una columna de intercambio iónico ICE-COREGEL 87H3 (Transgenomic, Omaha, EE.UU.). La fase móvil fue 15 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a un caudal de 0,5 mL/min y 45°C.

*Determinación del consumo de glucosa.* Se determinó la glucosa en los sobrenadantes empleando un kit específico basado en hexoquinasa (GAHK20, Sigma, Saint Louis, EE.UU.). El kit se manipuló de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Las medidas se realizaron en un lector de microplacas de 96 pocillos Synergy (Bio-Tek, Winooski, EE.UU.).

### **Espectroscopía de RMN y estudios de marcaje isotópico**

Para los experimentos de marcaje, se crecieron las células en 100 mL de medio M63 en presencia de glucosa o fructosa marcadas isotópicamente (CortecNet, Voisins-Le Bretonneux, Francia). Los sustratos marcados isotópicamente empleados fueron [1-<sup>13</sup>C]glucosa y [1-<sup>13</sup>C]fructosa. Los cultivos se detuvieron en fase exponencial media-tardía ( $A_{600}$  entre 1,5 y 2), y las células se separaron del sobrenadante por centrifugación (15 min a 16000g y 4°C). Los solutos compatibles (ectoínas y glutamato) se extrajeron a partir de los sedimentos celulares aplicando una variación del protocolo descrito por García-Esteba y colaboradores., (García-Esteba et al., 2006). La fase acuosa se liofilizó y resuspendió en metanol deuterado. Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN se registraron a 25°C usando espectrómetros Bruker AV400 y Bruker AV500 a 400 y 500 MHz, respectivamente, con un tiempo de relajación de 1 s en el caso de <sup>1</sup>H-RMN y de 60 s en el caso de <sup>13</sup>C-RMN. Las áreas de los picos se integraron para su cuantificación. Para la cuantificación de los picos de <sup>1</sup>H-RMN se añadió ácido fórmico a cada muestra como estándar externo hasta una concentración final de 5 mM. Para la cuantificación de picos de <sup>13</sup>C-RMN, se introdujo un capilar conteniendo [U-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>]-1,1',3,3'-tetrametilurea en el tubo de RMN como estándar externo de tal forma que la concentración de <sup>13</sup>C en el tubo de RMN fuera equivalente a 18,1 mM.

### **Predicción del destino del marcaje isotópico**

Se seleccionaron [1-<sup>13</sup>C]fructosa y glucosa para determinar la importancia relativa de las distintas rutas posibles del metabolismo central, de acuerdo a lo descrito anteriormente (Klapa et al., 1999; Metallo, Walther y Stephanopoulos, 2009). Se predijeron los patrones de

incorporación de la marca isotópica de glucosa y fructosa en piruvato y acetil-CoA via glucolisis o ruta de Entner-Doudoroff, y posteriormente en las ectoínas.

### **Extracción de ARN y RT-PCR**

Para cada muestra, se aisló el contenido total de ARN de  $3 \cdot 10^8$  células. Se empleó el kit de extracción de ARN Qiagen RNeasy Mini de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los extractos de ARN se trataron con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen, Venlo, Países Bajos) para evitar interferencias debidas al ADN durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se determinó la pureza y concentración del ARN así obtenido con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, EE.UU.), y se evaluó su calidad en un analizador microfluídico Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.), usando el kit Agilent RNA 6000 Pico kit. El ARN aislado se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante un período máximo de 3 días. Se retrotranscribió un microgramo de ARN de alta calidad (relación de ARNr [23S/16S]  $\approx 1,6$ , número de integridad de ARN [RIN]  $> 9,0$ , y relación  $A^{260}/A^{280} > 2,0$ ) con reactivos de reversotranscripción de TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, EE.UU.), y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El proceso de RT-PCR consistió en la incubación de 50  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción en un termociclador PCR-Thermal Cycler 200 (MJ Research Inc., Boston, EE.UU.) durante 10 min a  $25^{\circ}\text{C}$ , 30 min a  $48^{\circ}\text{C}$  y 5 min a  $95^{\circ}\text{C}$ .

Los cebadores usados en este trabajo (enumerados en el Anexo V, Tabla II.S1) se diseñaron con la aplicación informática Primer Express® Software v3.0 (Applied Biosystems), y se adquirieron de Applied Biosystems (Cheshire, Reino Unido). Se emplearon como control de cuantificación interno los genes *polA* y *dnaA* de *C. salexigens*, que codifican para la ADN polimerasa I y el regulador transcripcional dual de unión a ADN, respectivamente. La PCR cuantitativa se llevó a cabo en un aparato 7300 real-time PCR System (Applied Biosystems), usando el reactivo de PCR Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cada mezcla de reacción de 50  $\mu\text{L}$  conteniendo 10 ng de ADNc molde y 15 picomoles de cada cebador se incubó 2 min a  $50^{\circ}\text{C}$ , 10 min a  $95^{\circ}\text{C}$  tras lo que se las sometió a 40 ciclos de dos fases (15 s a  $95^{\circ}\text{C}$  y 1 min a  $60^{\circ}\text{C}$ ). Se revisó el rango dinámico lineal y la eficacia de la amplificación de cada gen según el protocolo del fabricante. Los datos brutos se transformaron en valores de ciclo umbral (Ct) usando la aplicación 7300 System SDS v1.3.1 (Applied Biosystems). La expresión relativa de los genes de interés se comparó con la condición de cultivo de referencia (en este caso los crecidos en glucosa) aplicándose el método de la comparación de Ct, expresándose los resultados en forma de  $\Delta\Delta\text{Ct}$ .

## Ensayos enzimáticos

*Detección de actividad enzimática mediante  $^{31}\text{P}$ -RMN.* Se obtuvieron extractos celulares a partir de 800 mL de cultivo de *C. salexigens* crecida en medio M63, suplementado con NaCl 0,75 M y fructosa 20 mM como única fuente de carbono. Se tomaron muestras para centrifugación en la fase exponencial tardía del crecimiento ( $A_{600}$  aproximadamente 2). Se sonicaron las células en baño de hielo con una sonda de 3 mm de diámetro usando un ultrasonicador Vibra Cell VC 375 (Sonic Materials, Danbury, EE.UU.) y se centrifugaron a 16000 g durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes (extracto libre de células) se usaron para las medidas posteriores de actividad enzimática. Los extractos celulares se limpiaron de sales y pequeños compuestos orgánicos con columnas de desalación por permeación en gel PD-10 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), para evitar la inhibición de la actividad enzimática y/o interferencias. Las reacciones se dispararon adicionando extracto proteico a la mezcla de reacción hasta un volumen final de 2 mL. En los casos en que fue necesaria la adición de ATP o pirofosfato como sustrato de reacción, se añadió además NaF para inhibir la actividad ATPasa en los extractos celulares. En todas las reacciones se mantuvo la temperatura a 30°C. Se dejó correr cada reacción durante dos horas, tomando una alícuota de 500  $\mu\text{L}$  cada 20 ó 30 minutos, según el caso. Inmediatamente, se colocó cada una de estas alícuotas en baño con hielo, se les añadió EDTA hasta una concentración final de 50 mM para quelar los iones de magnesio de la mezcla de reacción y mejorar así la resolución de los espectros y se incubaron a 85°C durante 10 min para una inactivación enzimática completa. Los espectros finales de  $^{31}\text{P}$ -RMN obtenidos son el resultado de la señal acumulada durante 30 min. Para cada alícuota de cada reacción se repitió el registro de  $^{31}\text{P}$ -RMN en las mismas condiciones de adquisición tras añadir los correspondientes compuestos fosforilados puros con objeto de confirmar la identidad de los picos de las muestras.

Las mezclas de reacción contuvieron:

*1-Fosfofructoquinasa (1Pfk).* Tampón Tris 100 mM (pH 7), fructosa-1-fosfato 5 mM, ATP 5 mM, NaF 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y KCl 50 mM.

*Fosfoglucoisomerasa (Pgi).* Tampón MOPS 100 mM (pH 6,5), fructosa-6-fosfato 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y KCl 50 mM.

*Fructoquinasa (Frk).* Tampón Tris 100 mM (pH 7,5), fructosa 5 mM, ATP 5 mM, NaF 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM y KCl 250 mM.

*6-Fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (Pfp)*. Tampón MOPS 100 mM (pH 6,5), fructosa-6-fosfato 5 mM, pirofosfato 5 mM, NaF 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y KCl 50 mM.

*Ensayos espectrofotométricos de actividad enzimática*. Los ensayos de actividad enzimática se optimizaron para las condiciones, medios y cepa usados en este estudio. Las medidas se llevaron a cabo en un lector de microplacas de 96 pocillos Synergy HT (Bio-Tek, Winooski, EE.UU.). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de catalizar el consumo de un micromol de sustrato consumido o la formación de dicha cantidad de producto por minuto. Los valores de actividad enzimática se normalizaron con respecto a los miligramos de proteína (unidades/mg). En cada caso, se tomaron muestras del cultivo que se centrifugaron a 16000g durante 15 min a 4°C, y se resuspendieron los sedimentos celulares en tampón fosfato 65 mM (pH 7,5). Se sonicaron las células en baño de hielo con una sonda de 3 mm de diámetro de un ultrasonificador Vibra Cell VC 375 (Sonic Materials, Danbury, EE.UU.) y se centrifugaron a 16000g durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes libres de células se usaron para las medidas de actividad. Se determinó la concentración de proteína en los extractos proteicos mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (BCA Protein Assay kit, Pierce). Cada mezcla de reacción contuvo un volumen final de 200 µL en cada pocillo, de los que 40 µL correspondieron a extracto proteico convenientemente diluido con el tampón adecuado en cada caso. Las composiciones de las mezclas de reacción fueron las siguientes:

*6-Fosfofructoquinasa (6Pfk)*. Se aplicó el método de Peng y Shimizu (Peng y Shimizu, 2003) con ligeras modificaciones. El tampón de medida fue imidazol-HCl 50 mM (pH 7), y la mezcla de reacción contuvo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADH 1 mM, EDTA 1 mM, ATP 5 mM, 2 U/mL de aldolasa, 8 U/mL de triosa-fosfato isomerasa, 2 U/mL de α-glicerofosfato deshidrogenasa y fructosa-6-fosfato 5 mM como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática como disminución de la absorbancia debida a NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*1-Fosfofructoquinasa (1Pfk)*. Se aplicó una modificación del método empleado para medir 6Pfk. El tampón de medida fue imidazol-HCl 50 mM (pH 7), y la mezcla de reacción contuvo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADH 1 mM, EDTA 1 mM, ATP 5 mM, 2 U/mL de aldolasa, 8 U/mL de triosa-fosfato isomerasa, 2 U/mL α-glicerofosfato deshidrogenasa y fructosa 1-fosfato 5 mM como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática como disminución de la absorbancia debida a NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*6-Fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (dirección de fosforilación), (Pfp)*. Se aplicó el método de (Bertagnolli y Cook, 1984) ligeramente modificado. El tampón de medida fue imidazol-HCl 50 mM (pH 7), y la mezcla de reacción contuvo 5 mM MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADH 0,2

mM, EDTA 1 mM, 2 U/ml DE aldolasa, 3 U/mL de triosa –fosfato isomerasa, 3 U/mL  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, fructosa-6-fosfato 2 mM y  $MgPP_i$  1 mM como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática como disminución de la absorbancia debida a NADH a 340 nm ( $\epsilon_{NADH}=6220 M^{-1}cm^{-1}$ ).

*Glucoquinasa (Gk)*. Se aplicó el método de Peng y Shimizu (Peng y Shimizu, 2003) con algunas modificaciones. El tampón de medida fue Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), y la mezcla de reacción contuvo  $MgCl_2$  10 mM, KCl 50 mM,  $NADP^+$  2 mM, ATP 5 mM, 4 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glucosa 5 mM como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática como aumento de la absorbancia debida a NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{NADH}=6220 M^{-1}cm^{-1}$ ).

*Fructoquinasa (Frk)*. Se aplicó una modificación del método empleado para medir Gk. El tampón de medida fue Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), y la mezcla de reacción contuvo  $MgCl_2$  10 mM, KCl 50 mM,  $NADP^+$  2 mM, ATP 5 mM, 4 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 4 U/mL fosfoglucoisomerasa y fructosa 5 mM como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática como aumento de la absorbancia debida a NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{NADH}=6220 M^{-1}cm^{-1}$ ).

*6-Fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (dirección de desfosforilación), (Pfp)*. Se usó Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) como tampón de medida, y la mezcla de reacción contuvo  $MgCl_2$  10 mM, KCl 50 mM,  $NADP^+$  2 mM, ATP 5 mM, 5 mM 4 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 4 U/mL de fosfoglucoisomerasa,  $K_2HPO_4$  5 mM y fructosa-1,6-bisfosfato como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática como aumento de la absorbancia debida a NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{NADH}=6220 M^{-1}cm^{-1}$ ).

### Clonaje, expresión y purificación de proteínas

A partir del ADN cromosómico de *C. salexigens* DSM 3043<sup>T</sup> se amplificaron las secuencias de los genes Csa12647, Csa10931 y Csa10639 usando los cebadores mostrados en la Tabla II.S1 (ver Anexo V). Los productos de PCR resultantes se digirieron con las enzimas de restricción *Pst*I/*Hind*III (*Kpn*I/*Hind*III en el caso de Csa10639) y se clonaron en el vector de expresión bacteriano pRSETC (pRSETB en el caso de Csa10639) (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.), que añade seis residuos de histidina (cola de poli-histidina) al extremo N-terminal de las proteínas clonadas. Los plásmidos resultantes se transformaron en la cepa hospedadora especializada *E. coli* BL21(DE3)  $\Delta patZ$  (Castaño-Cerezo *et al.*, 2015) (ver Tabla II.1). Para la expresión de las proteínas con cola de poli-histidina, se hicieron crecer las cepas transformadas a 30°C en medio LB hasta una absorbancia ( $A_{600}$ ) de 0,5, momento en que se le añadió isopropil-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración de 0,5 mM para inducir la expresión de las proteínas heterólogas, tras lo que se dejaron crecer los cultivos 3 horas más. Se recolectaron las células mediante centrifugación y se lavaron tres veces con NaCl 0,9% y

MgSO<sub>4</sub> 10 mM. Los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de unión (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,5 mM, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7,4) y se lisaron por sonicación (3 ciclos de 30 segundos por muestra) en un baño con hielo. Se retiraron los restos celulares mediante centrifugación y se cargó cada extracto proteico en columnas His GraviTrap (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Se purificaron las proteínas con cola de polihistidina de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante. Las proteínas purificadas conteniendo aún imidazol, se limpiaron con columnas desaladoras PD-10 (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), y se almacenaron en tampón fosfato 65 mM (pH 7,5) a -80°C hasta su uso.

**Tabla II.1.** Cepas y plásmidos usados en este trabajo.

Cepa	Genotipo relevante/uso	Fuente, o referencia
<i>Chromohalobacter salexigens</i> CHR61	Mutante espontáneo de la cepa DSM 3043 con resistencia a Rf	(Canovas <i>et al.</i> , 1997)
<i>Escherichia coli</i> Top10F'	Cepa hospedadora para la propagación de los plásmidos pRSETB pRSETC	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) $\Delta$ patZ	Cepa hospedadora para la expresión de proteínas heterólogas; F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-)</i> <i>gal dcm</i> $\lambda$ (DE3) <i>tonA</i> $\Delta$ patZ	(Castaño-Cerezo <i>et al.</i> , 2015)
Plásmido	Región clonada	Fuente
pRSETB	-	Life Technologies
pRSETBCsal0639p	Csal0639	Este trabajo
pRSETC	-	Life Technologies
pRSETCCsal0931p	Csal0931	Este trabajo
pRSETCCsal2647p	Csal2647	Este trabajo

## RESULTADOS

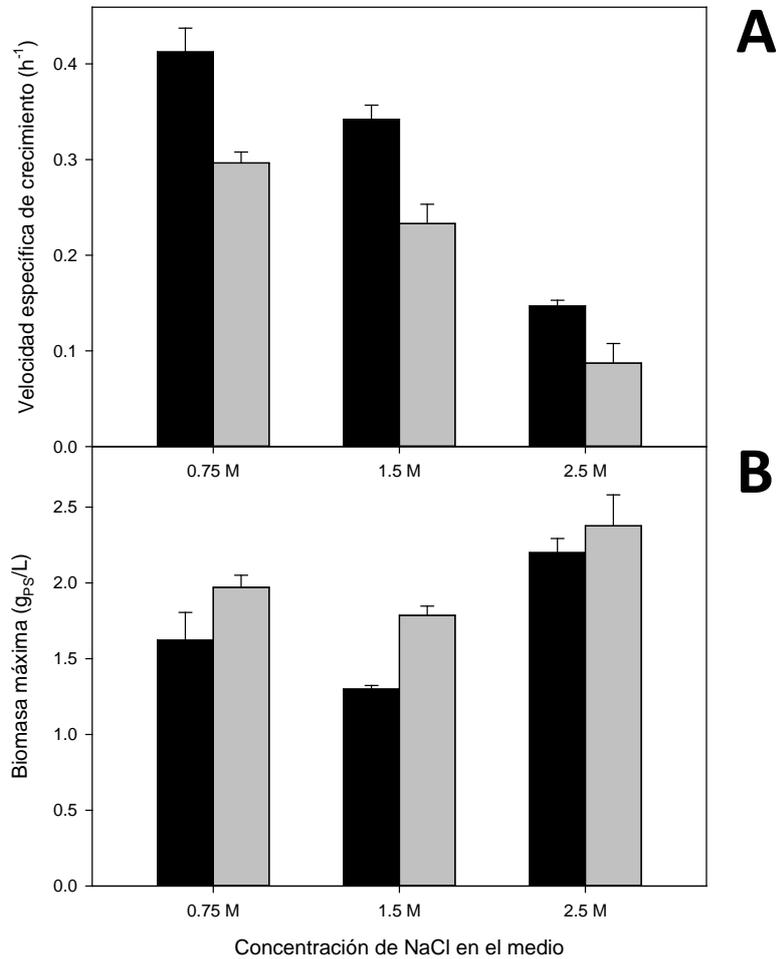
### **Crecimiento de *C. salexigens* en fructosa como fuente de carbono. Producción de ectoína y metabolismo *overflow***

Se analizó la fisiología de *C. salexigens* en medio mínimo con fructosa en función de la salinidad y se comparó su comportamiento con glucosa como fuente de carbono. *C. salexigens* se cultivó en medio mínimo M63 suplementado con fructosa o glucosa como única fuente de carbono a tres concentraciones de sal (NaCl 0,75, 1,5 y 2,5 M). Tal como se ha descrito previamente, el rendimiento máximo en biomasa aumentó con la salinidad en glucosa como fuente de carbono, mientras que la velocidad de crecimiento disminuyó un 60% desde 0,75 M (salinidad óptima para el crecimiento) hasta 2,5 M (salinidad óptima para la síntesis de biomasa). La velocidad de crecimiento en fructosa resultó un 30-40% menor en cualquiera de las salinidades probadas (Figura II.1A), mientras que el rendimiento máximo en biomasa fue mayor que en los cultivos con glucosa, excepto en NaCl 2,5 M (Figura II.1B).

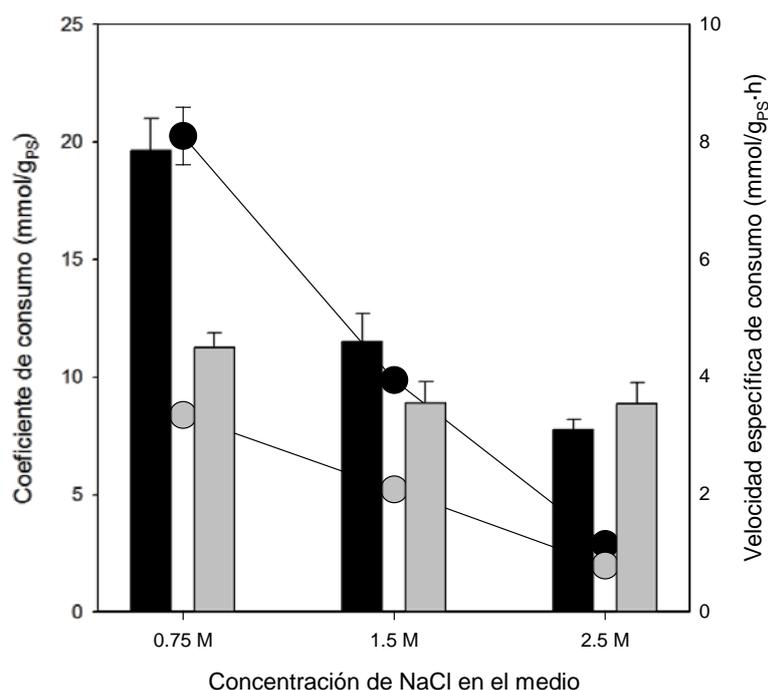
El análisis de los sobrenadantes de los cultivos en fructosa reveló la ausencia de gluconato, piruvato y acetato, al menos en niveles detectables. La ausencia de metabolismo *overflow* concuerda con el rendimiento mayor en biomasa en los cultivos de fructosa. Además, a 2,5 M de NaCl, donde los cultivos en glucosa mostraron un metabolismo *overflow* mucho menor que a baja salinidad, no se observó una diferencia significativa en el rendimiento en biomasa entre las dos fuentes de carbono.

Con el objetivo de comprender cómo la ausencia de metabolismo *overflow* afecta al metabolismo central de *C. salexigens* al crecer en fructosa, se evaluó el coeficiente estequiométrico de consumo de la fuente de carbono para la producción de biomasa en ambas series de cultivos. La eficiencia del consumo de la fuente de carbono aumentó al aumentar la salinidad, en ambos azúcares, pero esta tendencia fue mucho más acusada en el caso de la glucosa. La velocidad de consumo de fuente de carbono resultó menor en el caso de la fructosa en todas las condiciones probadas (Figura II.2).

Globalmente, el crecimiento fue más eficiente en fructosa a baja salinidad, mientras que los parámetros de crecimiento fueron similares a alta salinidad. Estas diferencias fenotípicas aparecen en correlación con la presencia de metabolismo *overflow*, y podría ser una consecuencia directa de este último.



**Figura II.1. Velocidad específica de crecimiento (A) y biomasa máxima (B) en cultivos discontinuos crecidos en glucosa y fructosa.** Se crecieron los cultivos a 37°C en medio mínimo M63 con glucosa 20 mM (barras negras) o fructosa 20 mM (barras grises) como única fuente de carbono en NaCl 0,75, 1,5 ó 2,5 M. Todos los datos representan el promedio de al menos tres series de cultivos independientes. Ver sección *Materiales y métodos* para mayor detalle.



**Figura II.2. Eficiencia de los consumos de glucosa y fructosa.** El histograma representa el rendimiento en el consumo de glucosa ( $Y_{Glc/X}$ , barras negras) y fructosa ( $Y_{Fru/X}$ , barras grises). Los círculos representan las velocidades específicas de consumo, siguiendo el mismo código de color. Se crecieron los cultivos a 37°C en medio mínimo M63 con glucosa 20 mM o fructosa 20 mM como única fuente de carbono en NaCl 0,75, 1,5 ó 2,5 M. Todos los datos representan el promedio de al menos tres series de cultivos independientes.

### Reconstrucción del metabolismo de fructosa en *C. salexigens*: pruebas genómicas y transcriptómicas

Las rutas para el metabolismo de la fructosa en *C. salexigens* no han sido descritas previamente. Los primeros pasos de las rutas para la utilización de la fructosa se recogen en la Figura II.3A. En base a la anotación genómica se predicen dos rutas para la incorporación de la fructosa al metabolismo central (Copeland *et al.*, 2011). La primera de ellas implica la entrada de fructosa a través de un sistema fosfotransferasa (PTS) específico de fructosa ( $PTS^{Fru}$ ) y fructosa-1-fosfato como intermediario. La segunda ruta implica un transportador de azúcar no PTS (o bien un transportador ABC o un facilitador para azúcares, ver Figura II.3A), y la activación de la fructosa a fructosa-6-fosfato por una quinasa soluble. Estas dos rutas podrían estar conectadas por la actividad reversible de una fructosa bisfosfatasa dependiente de pirofosfato (Fbp).

En base al genoma, la fructosa es el único azúcar para el que existe un transportador PTS específico en *C. salexigens*. Dado que el transporte de azúcares a través de PTS es incompatible su completa metabolización mediante la ruta de Entner-Doudoroff (Romano, Trifone y Brustolon, 1979), el crecimiento de *C. salexigens* en fructosa como única fuente de carbono debería tener lugar (al menos en parte) por medio de una ruta diferente. Por tanto, resulta evidente que *C. salexigens* metaboliza la fructosa a través de otra vía metabólica.

En este trabajo, se analizaron genes seleccionados relacionados con el metabolismo de fructosa para una mayor comprensión de estas rutas. Así, se seleccionó un subconjunto de marcos abiertos de lectura (ORFs) a los que, de forma automatizada, se le habían asignado funciones relacionadas con enzimas del metabolismo de fructosa, para llevar a cabo estudios de transcripción mediante PCR a tiempo real (RT-PCR). Este subgrupo incluyó todos los ORFs anotados previamente como posibles PfkB (Csal0274, Csal0639, Csal0931, Csal1534 y Csal1841). Se incluyeron asimismo genes codificantes de enzimas pertenecientes a ambas rutas de la incorporación de la fructosa, a saber, fructoquinasa (*frk*, Csal0931) por un lado, y los genes del operón *fruBKA* por el otro. Este grupo fue ampliado para incluir algunas enzimas que conectaran el metabolismo de fructosa con el metabolismo central y de glucosa: 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (*pfp*, Csal1534), fosfoglucoisomerasa (*pgi*, Csal0932), fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (*ald*, Csal0370), glucoquinasa (*glk*, Csal0935) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*zwf*, Csal2741). Se incluyeron además tres quinasas de azúcares más, 2-cetogluconato quinasa (*KguK*, Csal0274) y los dos ORFs restantes anotados previamente como 6-fosfofructoquinasas (*PfkB*, Csal0639, y Csal1841) que aún no habían recibido una asignación definitiva. Todas las enzimas asociadas con estas actividades se muestran en la Figura II.3B.

Se realizaron tres series de cultivos discontinuos de *C. salexigens* en tres fuentes de carbono distintas, glucosa, fructosa y glicerol. Cuatro de esos ORFs se sobreexpresaron en los cultivos en fructosa, en comparación con las otras dos condiciones. Dos de esos genes sobreexpresados pertenecen al grupo de cinco ORFs previamente anotados como PfkB: Csal2647 y Csal0639.

**Figura II.3.** (Página siguiente). (A) Rutas de asimilación de fructosa, glucosa y gluconato en *C. salexigens*, propuestas en base a estudios previos filogenéticos e *in silico* en los que se compara *C. salexigens* con *P. putida* y otras especies relacionadas. Las dos rutas propuestas para la asimilación de la fructosa se basan en los datos de  $^{13}\text{C}$ -,  $^{31}\text{P}$ -RMN y RT-PCR, y en los estudios de expresión heteróloga presentados en este capítulo. Los nombres de enzimas y transportadores se muestran encuadrados en rectángulos y elipses, respectivamente. Las enzimas incluidas en los estudios de RT-PCR cuya actividad se confirmó mediante  $^{31}\text{P}$ -NMR aparecen en rectángulos azules, los ORFs que se incluyeron en los estudios de RT-PCR y no se detectaron o no se ensayaron en  $^{31}\text{P}$ -RMN aparecen en rectángulos verdes. El resto de los transportadores y enzimas propuestos se muestran en rectángulos blancos. (B) Grupos de genes y operones relacionados con las rutas de asimilación de glucosa y fructosa en *C. salexigens*. El nombre de la asignación más plausible se muestra sobre cada ORF. Los ORFs que se incluyeron en el estudio de RT-PCR aparecen destacados en rectángulos blancos.

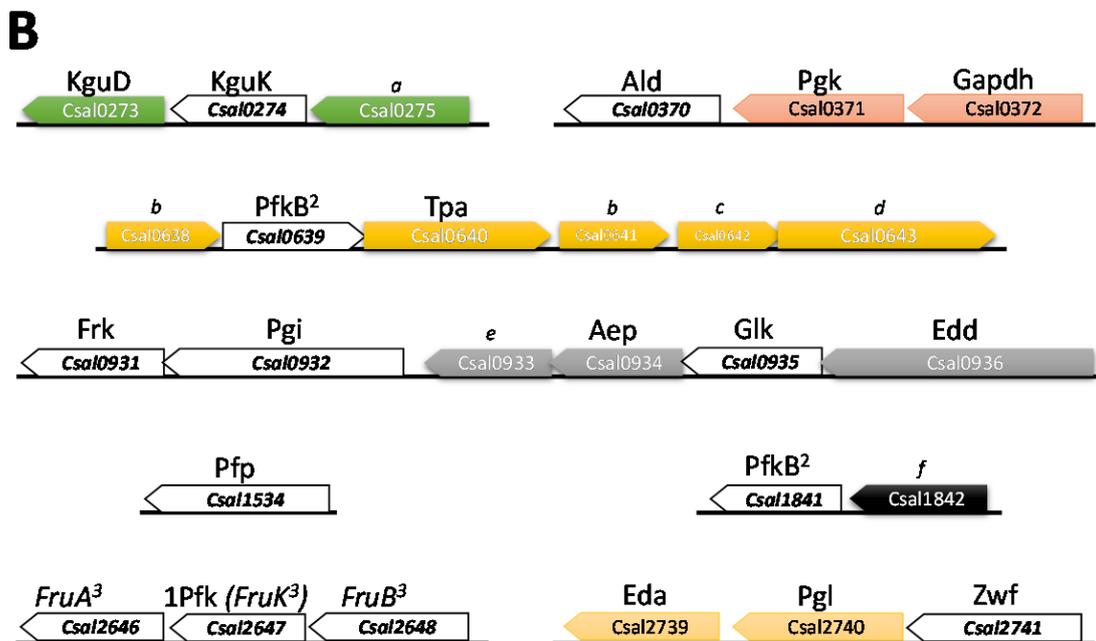
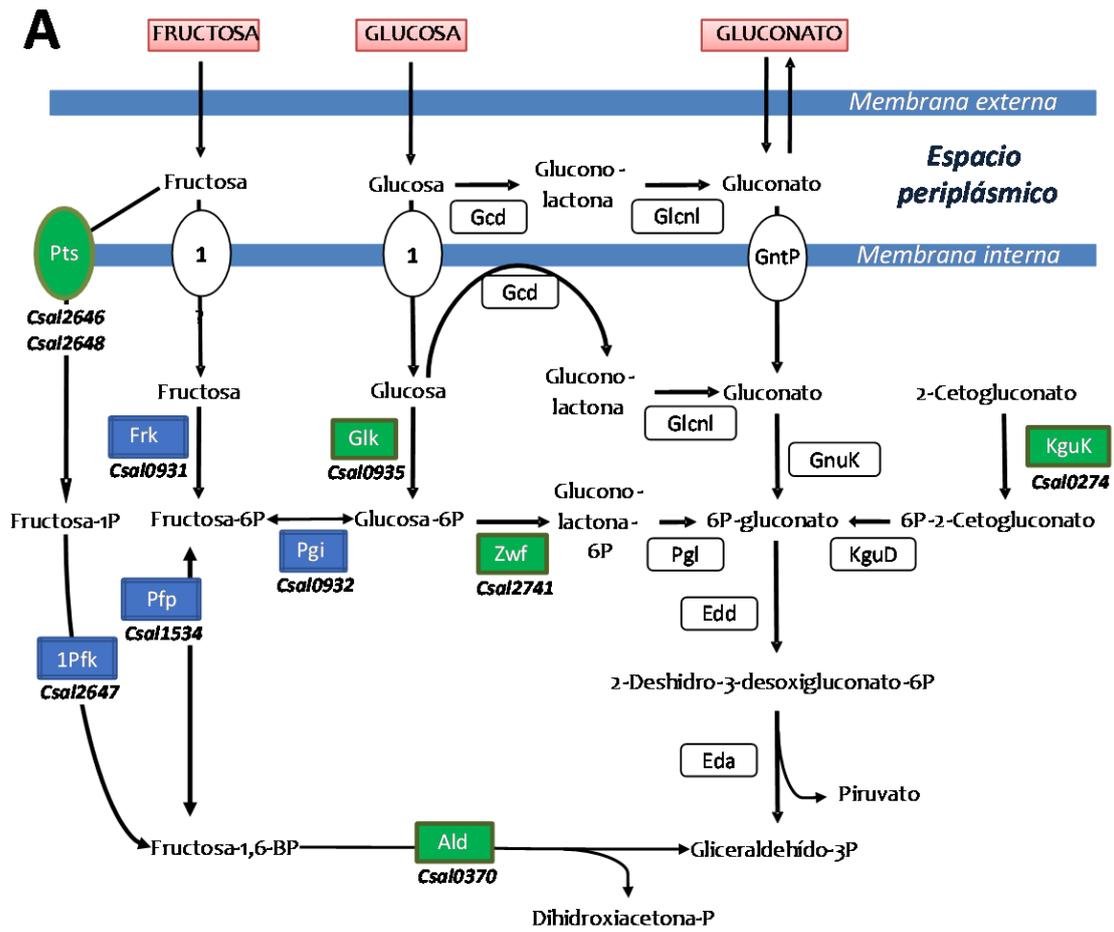
Abreviaturas: 1Pfk, 1-fosfofructoquinasa; Aep, aldosa-1-epimerasa; Ald, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; Eda, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa; Edd, 6-fosfogluconato deshidratasa; Frk, fructoquinasa; Gapdh, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; Gcd, glucosa deshidrogenasa; Glcnl, gluconolactonasa; Glk, glucoquinasa; GntP, transportador de gluconato; KguD, 2-ceto-6-fosfogluconato reductasa; KguK, 2-cetogluconato quinasa; KguT, transportador de 2-cetogluconato; Pgi, fosfoglucoisomerasa; Pgl, 6-fosfogluconolactonasa; Pgg, fosfoglicerato quinasa; Pts, sistema de transporte fosfotransferasa (específico de fructosa); Tpa, tagatosa-6-fosfato aldolasa; Zwf, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

<sup>1</sup>Facilitadores de transporte de azúcares o transportadores tipo ABC (asignación provisional/no definitiva).

<sup>2</sup> ORFs que retienen su asignación como PfkB debido a la falta de datos experimentales.

<sup>3</sup>Operón *fruBKA*.

Los ORFs siguientes retienen asignaciones poco precisas basadas en anotación automática (en JGI): *a*, “*Lacl* family transcriptional regulator”; *b*, “short chain dehydrogenase/reductase”; *c*, “putative fructose transport system kinase”; *d*, “mannitol dehydrogenase-like protein”; *e*, “aldo/keto reductase”; *f*, “NAD<sup>+</sup>-binding D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase”.



Csal2647 pertenece al grupo formado por tres ORFs con alta homología con el operón *fruBKA* de varias especies del género *Pseudomonas*. Este operón codifica un sistema PTS específico para la importación de fructosa que fosforila este azúcar formando fructosa-1-fosfato (*fruB* y *fruA*) (Reizer, Reizer y Lagrou, 1999) y Csal2647, que codifica una proteína soluble (Figura II.3B). Csal2647 presenta alta homología con el gen *fruK* de *P. putida*, que codifica 1-fosfofructoquinasa, la cual fosforila la fructosa-1-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato. Los genes del operón *fruBKA* se sobreexpresaron conjuntamente en medio mínimo con fructosa (Tabla II.2), lo que refuerza la función del producto de Csal2647 como parte del operón *fruBKA*, siendo esencial para la existencia de una ruta similar a EMP para el metabolismo de la fructosa en *C. salexigens* (Figura II.3A).

**Tabla II.2.** Análisis mediante RT-PCR de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de fructosa seleccionados. Niveles de expresión relativa en cultivos crecidos en fructosa y glicerol como fuentes de carbono con respecto a cultivos crecidos en glucosa (esta última condición se fijó como condición de referencia). Todas las muestras de ARN se extrajeron de cultivos en fase exponencial de crecimiento. Los resultados están expresados como  $\Delta\Delta Ct$ , y representan el promedio y desviación estándar de al menos dos replicados biológicos y tres replicados técnicos. Ver sección *Materiales y métodos* para mayor detalle.

Genes	Actividad enzimática	Fructosa	Glicerol
<i>Csal2648</i>	Pts <sup>1</sup>	1,64 ± 0,21	0,82 ± 0,11
<i>Csal2647</i>	1Pfk	1,57 ± 0,15	0,79 ± 0,14
<i>Csal2646</i>	Pts <sup>2</sup>	2,22 ± 0,19	0,83 ± 0,13
<i>Csal0370</i>	Ald	-0,11 ± 0,14	-0,12 ± 0,13
<i>Csal1534</i>	Pfp	-0,46 ± 0,16	-0,47 ± 0,17
<i>Csal0935</i>	Glk	0,53 ± 0,27	0,91 ± 0,18
<i>Csal0932</i>	Pgi	0,29 ± 0,31	-0,07 ± 0,29
<i>Csal0931</i>	Frk	0,33 ± 0,19	0,27 ± 0,43
<i>Csal2741</i>	Zwf	0,00 ± 0,14	0,52 ± 0,28
<i>Csal0274</i>	KguK	0,34 ± 0,22	0,24 ± 0,18
<i>Csal0639</i>	PfkB <sup>3</sup>	0,95 ± 0,17	0,81 ± 0,22
<i>Csal1841</i>	PfkB <sup>3</sup>	0,22 ± 0,15	0,32 ± 0,20

<sup>1</sup>La secuencia de aminoácidos de este gen abarca dominios ortólogos de las subunidades EI, HPr y EIIA de un sistema fosfotransferasa (Pts).

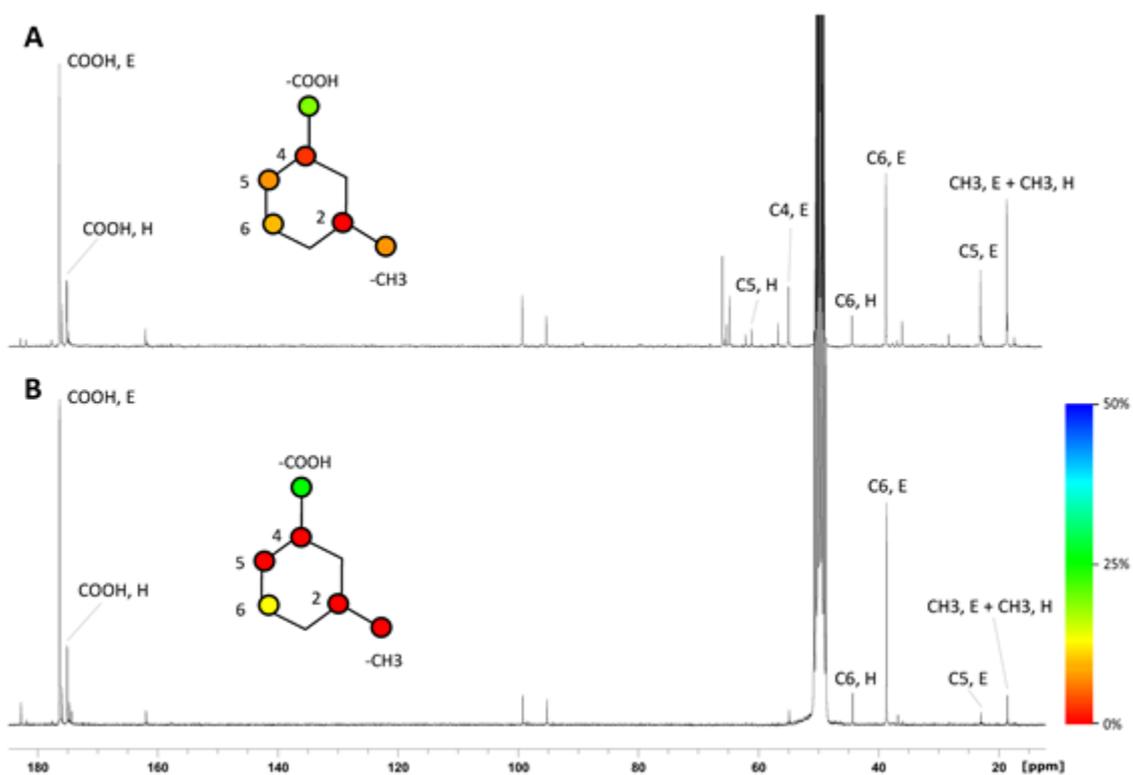
<sup>2</sup>La secuencia de aminoácidos de este gen abarca dominios ortólogos de las subunidades EIIB y EIIC de un sistema fosfotransferasa (Pts).

<sup>3</sup>Asignación automática a falta de datos experimentales.

Aún no existen datos experimentales que asocien Csal0639 con alguna función fisiológica, y retiene por tanto la asignación como PfkB. Csal0639 aparece sobreexpresado en *C. salexigens* en los cultivos con fructosa (Tabla II.2), lo que puede interpretarse como indicio de una función relacionada con el metabolismo de este azúcar. Para confirmar esto, y ayudar a la elucidación de su verdadera función, se comparó su secuencia de aminoácidos con la de otros ORFs de varias  $\gamma$ -proteobacterias, y se usaron estos datos en un estudio filogenético en el que se incluyeron los ORFs con mayor similitud con Csal0639 (ver Figura II.S1 en Anexo V). Estos ORFs codifican enzimas que catalizan reacciones relacionadas con fosforilación/desfosforilación de fructosa y derivados fosforilados de la misma, así como reacciones análogas con otras hexosas. Este análisis no aportó nuevas pistas y no se pudo concretar su función real y, por tanto, tampoco su implicación en el metabolismo de la fructosa.

## Rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de fructosa en *C. salexigens*: estudios con $^{13}\text{C}$ -RMN

Con el objetivo de comprender mejor el destino de la fructosa en el metabolismo de *C. salexigens*, se rastreó la marca isotópica ( $^{13}\text{C}$ ) de glucosa y fructosa como únicas fuente de carbono. Se escogió el marcaje en C1 para ambas hexosas, ya que la marca en esta posición da lugar a patrones de marcaje diferentes en las ectoínas, según la hexosa haya sido metabolizada mediante la ruta de ED o de EMP. Se hizo una predicción del marcaje de las ectoínas de acuerdo a lo descrito en Pastor y colaboradores., (2013). Según esta predicción, el carbono del grupo metilo de las ectoínas aparecería marcado únicamente en el caso de que la hexosa se metabolizase mediante la ruta de EMP (para más detalles, ver Anexo III).



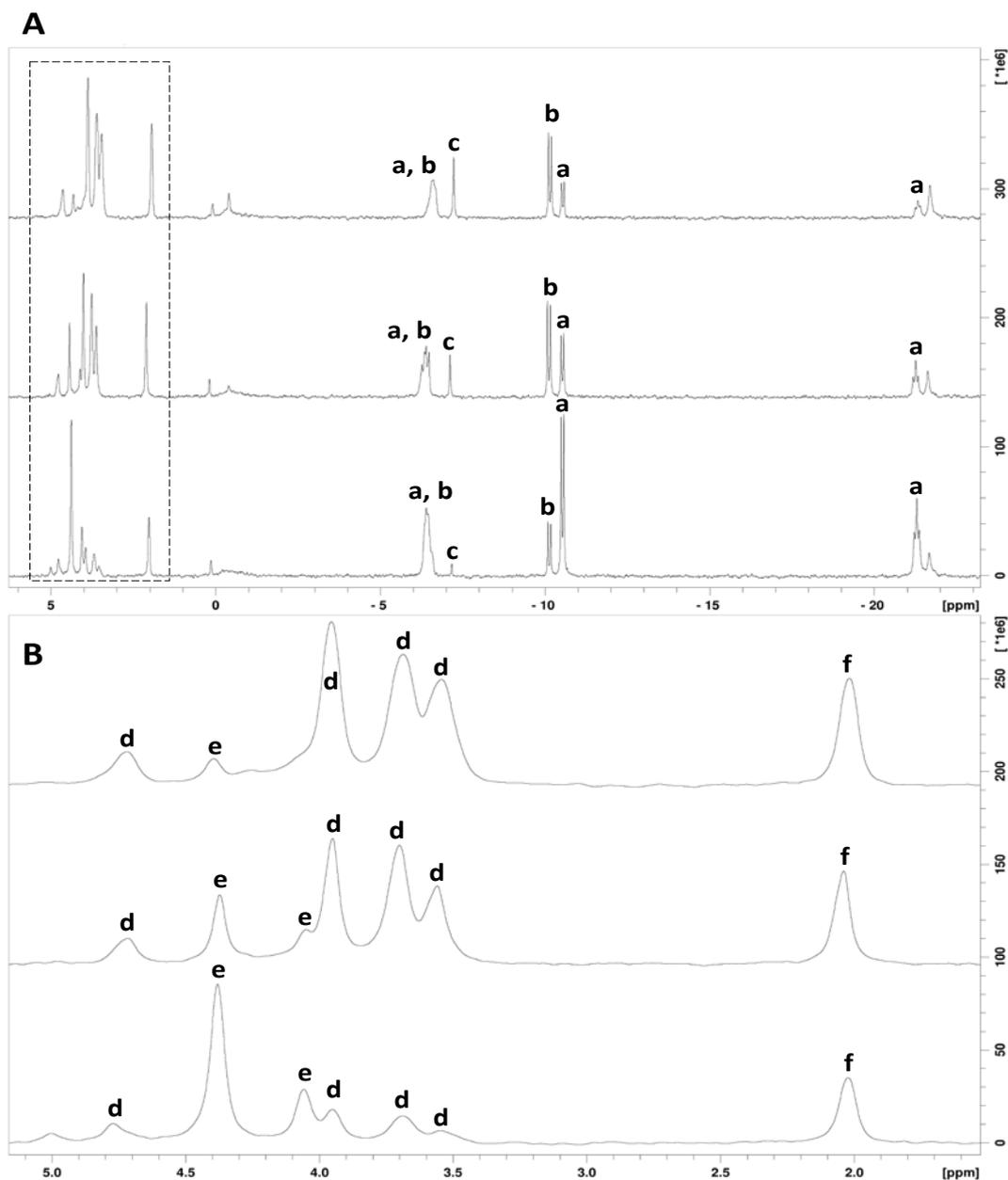
**Figura II.4.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenidos a partir de extractos intracelulares de cultivos crecidos en (A)  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -fructosa y  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa. Como medio de crecimiento se usó medio mínimo conteniendo 20 mM de la fuente de carbono marcada y 0,75 M de NaCl. En la imagen se indican las señales correspondientes al carbono carboxílico (COOH), C4, C5, C6 y al carbono metílico (CH3) de las moléculas de ectoína (E) e hidroxiectoína (H). Las representaciones de las moléculas de ectoínas aparecen coloreadas según el porcentaje de marcaje con  $^{13}\text{C}$  para cada átomo de carbono de la molécula, siguiendo el código de color indicado por la escala de la parte inferior derecha de la figura. Nótese que las mayores diferencias en el marcaje entre las dos fuentes de carbono aparecen en las posiciones C5 y CH3. La señal de CH3 se toma como indicadora de la contribución a la síntesis de ectoínas del flujo de carbono a través de la ruta de EMP.

Al crecer en fructosa, el grupo metilo de las ectoínas presenta hasta un 10% de enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$ , tanto a 0,75 como a 2,5 M NaCl. Este porcentaje implicaría una contribución de un  $18,8 \pm 3,0\%$  de la ruta de EMP en la síntesis de ectoínas a partir de fructosa (así como otras contribuciones menores que en este caso se pueden despreciar, p. ej. la ruta de las pentosas fosfato). En cambio, al crecer en glucosa, las ectoínas mostraron un enriquecimiento de sólo el  $1,2 \pm 0,1\%$  en esta posición, valor muy próximo a la abundancia natural del  $^{13}\text{C}$  (Figura II.4). El hecho de que el marcaje isotópico de las ectoínas se ajuste bien a una combinación de las rutas EMP y ED para la metabolización de la mayor parte de la fructosa concuerda con la incompatibilidad de la incorporación de la fructosa mediante un transportador PTS con una metabolización exclusiva de la misma mediante la ruta de ED, y también está de acuerdo con las dos rutas de incorporación de la fructosa descritas más arriba. Sin embargo, para poder relacionar el patrón de marcaje hallado en las ectoínas con una combinación de ED y EMP han de hacerse ciertas asunciones termodinámicas, lo que plantea la necesidad de más información para confirmar este hecho de forma inequívoca.

#### **Demostración *in vitro* de actividades enzimáticas: estudios de $^{31}\text{P}$ -RMN**

Una vez que el patrón de marcaje de las ectoínas ha permitido obtener una visión general del metabolismo de la fructosa, se hacen necesarios datos más concretos para confirmar los resultados obtenidos. Para obtenerlos, se ensayaron actividades enzimáticas específicas en extractos proteicos procedentes de cultivos crecidos en fructosa. Dado que todas las actividades que se buscaba confirmar implican cofactores e intermediarios fosforilados, se usó  $^{31}\text{P}$ -RMN para hacer un seguimiento de su aparición y/o desaparición, para obtener así pruebas de una actividad determinada.

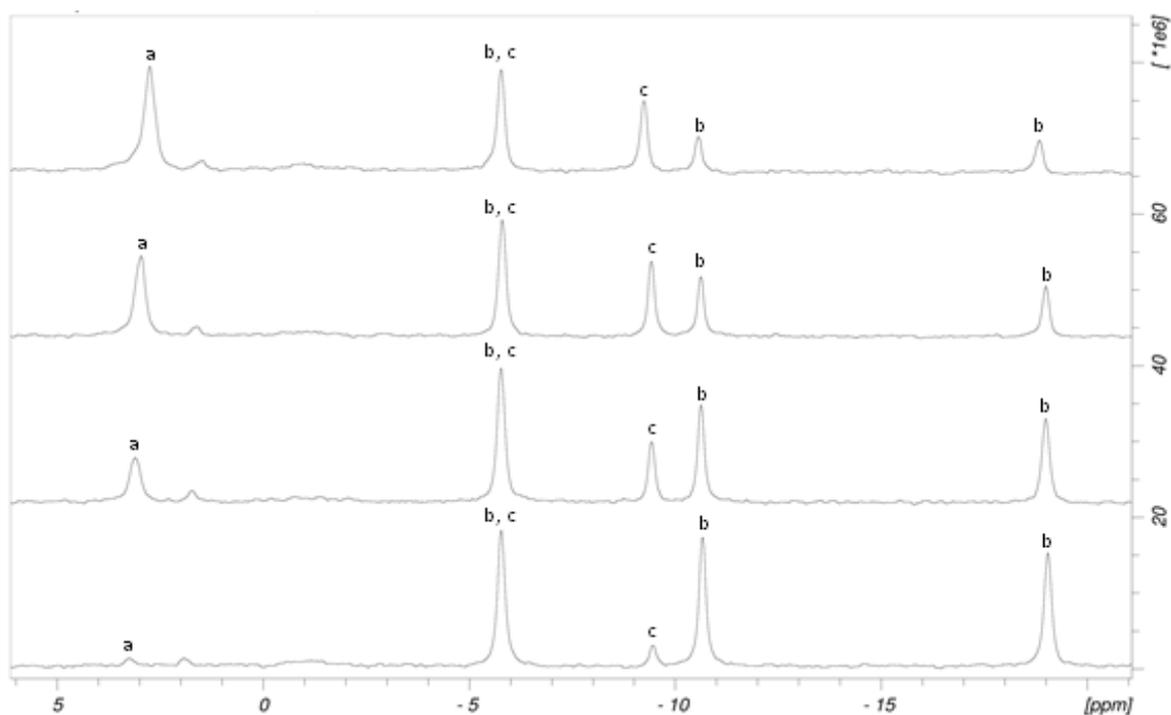
Se detectaron cuatro actividades diferentes en los extractos proteicos estudiados. Dos de ellas, fructoquinasa (Frk) y fosfoglucoisomerasa (Pgi) confirmaron la presencia de una conexión entre la incorporación de fructosa y la ruta de ED. La primera de ellas sería atribuible a Csal0931 y la última a Csal0932. Se detectó además 1-fosfofructoquinasa (1Pfk), lo que se tomó como prueba de la existencia de una ruta similar a EMP y dependiente de un transportador PTS para el catabolismo de la fructosa. Esta actividad podría atribuirse a Csal2647 como parte de un posible operón *fruBKA* en *C. salexigens*. Las series temporales de espectros de las actividades 1-Pfk y Frk se muestran en las Figuras II.5 y V.6, respectivamente. Las series temporales para la actividad Pgi aparecen en la Figura II.S2 del Anexo V.



**Figura II.5. Actividad 1-fosfofructoquinasa.** Los ensayos de actividad se realizaron con extractos libres de células crecidas en medio mínimo M63 con NaCl 0,75 M y fructosa 20 mM como única fuente de carbono. Los extractos se recolectaron durante la fase exponencial de crecimiento, y se les retiraron las impurezas no proteicas. A los extractos se añadió fructosa-1-fosfato y ATP como sustratos de la reacción además del tampón adecuado y el resto de reactivos necesarios (ver sección de *Materiales y métodos* para más información). **A**, zona típica de aparición de las señales de fosfatos y ésteres de fosfato en espectros de  $^{31}\text{P}$ -NMR. **B**, detalle de la zona de aparición de los fosfatos de hexosas. Los espectros aparecen organizados en una serie temporal. De abajo a arriba: inmediatamente después de la adición del sustrato, y tras 20 y 40 minutos de incubación. La identidad de las señales se designa con letras según sigue: **a**, ATP; **b**, ADP; **c**, pirofosfato; **d**, fructosa-1,6-bisfosfato; **e**, fructosa-1-fosfato y **f**, fosfato.

Se detectó además actividad pirofosfato-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa, o 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (Pfp) (Figura II.S3, Anexo V). Esta actividad es reversible y puede funcionar tanto en sentido glucolítico como gluconeogénico. A esta enzima se le atribuye generalmente un papel gluconeogénico. Una prueba de ello sería la incapacidad de esta enzima de complementar la falta de Pfk en *E. coli* (Kemp y Tripathi, 1993). Este sería también el caso de *C. salexigens*, donde la presencia de la actividad Pfp no es capaz de revertir los efectos explicados de la falta de Pfk en el metabolismo de glucosa. Sin embargo, la actividad Pfp sólo pudo ser confirmada experimentalmente en la dirección glucolítica (Figura II.S3, Anexo V).

Por último, no fue posible la detección de una actividad Pfk dependiente de ATP en los extractos proteicos mediante esta técnica, lo que se suma a todos los resultados anteriores que apuntan a la ausencia de esta enzima en *C. salexigens* (Pastor *et al.*, 2013).



**Figura II.6. Actividad fructoquinasa.** Las condiciones de cultivo y procedimiento para obtención del extracto fueron los mismos que en el caso anterior. A los extractos se añadió fructosa y ATP como sustratos de la reacción además del tampón adecuado y el resto de sustratos y reactivos necesarios (ver sección de *Materiales y métodos* para más información). Los espectros aparecen organizados en una serie temporal. De abajo a arriba: inmediatamente después de la adición del sustrato, y tras 30, 60 y 90 minutos de incubación. La identidad de las señales se designa con letras según sigue: **a**, fructosa-6-fosfato; **b**, ATP y **c**, ADP.

### Asignación de funciones a Csal2647, Csal0931 y Csal0639

Para poder asignar de forma inequívoca las actividades detectadas mediante  $^{31}\text{P}$ -RMN, se seleccionaron tres ORFs del genoma de *C. salexigens* para su clonaje en *E. coli* BL21. Las tres proteínas heterólogas se purificaron mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos, y sobre las proteínas purificadas se ensayaron las actividades candidatas mediante métodos espectrofotométricos. Los ORFs escogidos fueron Csal2647, Csal0931, para la confirmación de las actividades 1-Pfk y Frk, respectivamente, y Csal0639, con objeto de determinar su actividad real y si ésta está relacionada con el metabolismo de la fructosa, como apuntan los datos de RT-PCR. Se ensayaron cinco actividades enzimáticas diferentes sobre las tres proteínas purificadas: 1-fosfofructoquinasa, 6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP, fructoquinasa, glucoquinasa y 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato. En el caso de esta última, se realizaron ensayos independientes para los sentidos glucolítico y gluconeogénico de la reacción.

Tal como se esperaba, Csal2647 mostró actividad 1-Pfk y rastros de actividad Frk (esta última en niveles dos órdenes de magnitud inferiores a 1-Pfk). La actividad Frk se debió probablemente a la presencia de trazas de fructosa en el reactivo de fructosa-1-fosfato, antes que ser atribuible a una inespecificidad de sustrato. En el caso de Csal0931, sólo se detectó la actividad Frk esperada (ver Tabla II.3).

Csal0639 no mostró actividad detectable en ninguno de los ensayos, lo que deja su papel fisiológico aún por determinar.

**Tabla II.3.** Actividades enzimáticas detectadas mediante métodos espectrofotométricos en las tres proteínas expresadas en *E. coli* BL21(DE3)  $\Delta patZ$  correspondientes a los tres genes *C. salexigens* clonados. Los valores que se muestran representan el promedio y la desviación estándar de al menos dos replicados biológicos y tres replicados técnicos. Todos los resultados están expresados en micromoles de sustrato/producto consumidos/producidos por minuto y mg de proteína (U/mg). Abreviaturas: Frk, fructoquinasa; 1-Pfk, 1- fosfofructoquinasa. También se llevaron a cabo ensayos específicos para la detección de las siguientes actividades (en ninguno de ellos se detectó actividad): 6-Pfk, 6-fosfofructoquinasa; Glk, glucoquinasa; Pfp, 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato.

Actividad enzimática	Csal2647	Csal0931	Csal0639
Frk	0,05 ± 0,02	2,71 ± 0,75	ND
1-Pfk	1,12 ± 0,32	ND	ND

ND, no detectada.

## DISCUSIÓN

Los microorganismos han desarrollado una enorme flexibilidad en el modo de proveer de carbono el metabolismo central (Sudarsan *et al.*, 2014). En los casos en que existen rutas redundantes, el uso preferente de una u otra ruta lo determinan los condicionantes ambientales a los que se enfrenta el microorganismo, ya que la supervivencia y proliferación microbianas dependen de la distribución de flujos y de su capacidad de satisfacer las necesidades metabólicas impuestas. En el caso del halófilo *C. salexigens*, la adaptación al crecimiento en altas salinidades ha forzado la evolución de su metabolismo en el sentido de mejorar la eficacia de las rutas esenciales para biosíntesis de solutos compatibles. La síntesis de ectoínas impone una alta carga metabólica a la célula, debido especialmente a la alta demanda de equivalentes de NADPH. En este trabajo, se ha demostrado que *C. salexigens* ha desarrollado diferentes estrategias para la incorporación, activación y metabolización de glucosa y de fructosa. La existencia de diferentes rutas tiene importantes implicaciones fisiológicas que afectan la eficiencia metabólica en términos del equilibrio de energía y redox de las rutas globales.

Hemos identificado dos rutas disponibles para la metabolización de la fructosa en *C. salexigens*. La redundancia metabólica parece suponer una ventaja adaptativa para la bacteria. Durante el crecimiento en medio mínimo con glucosa, se acumulan gluconato, piruvato y acetato, especialmente a baja concentración de sal (Pastor *et al.*, 2013). La ausencia de un metabolismo *overflow* observable al crecer en fructosa es indicativo de un consumo de la fuente de carbono muy optimizado y podría ser la consecuencia de la disponibilidad de dos rutas complementarias. De hecho, podría plantearse que *C. salexigens* puede balancear los flujos a través de las rutas de ED y de EMP con el fin de equilibrar a su vez los niveles de cofactores durante el crecimiento y la producción de ectoínas.

En este aspecto, la situación en *C. salexigens* sería semejante a la de *P. putida* y otras Pseudomonas, en las que la fructosa se metaboliza sólo de forma parcial a través de la ruta de EMP (de Crécy-Lagard *et al.*, 1991; Chavarría *et al.*, 2012). Parece obvio que la existencia de dos rutas para la metabolización de la fructosa supone una ventaja para *C. salexigens*. Pero surge la cuestión de si esta distribución es resultado de una evolución, o un hecho accidental. En algunas arqueas de la familia Halobacteriaceae, la fructosa se metaboliza casi de forma completa por medio de la ruta de EMP, se inicie o no a partir de un transportador PTS, mientras que la glucosa se metaboliza de forma preferente por medio de la ruta de ED (Altekar y Rangaswamy, 1992; Johnsen *et al.*, 2001). Al igual que la mayor parte de arqueas, estos organismos no acumulan solutos compatibles en el interior celular para compensar la

osmolaridad exterior, sino que adaptan su maquinaria enzimática y su composición aminoacídica global a una alta concentración intracelular de iones inorgánicos. La carga metabólica impuesta por la síntesis de ectoínas podría ser el motivo de que *C. salexigens* distribuya los flujos de fructosa entre EMP y ED. Un ejemplo de como un gran esfuerzo biosintético puede llevar a diferentes distribuciones de flujo dependiendo de la fuente de carbono empleada es el expuesto por Kiefer y colaboradores (Kiefer *et al.*, 2004). La bacteria productora de lisina *Corynebacterium glutamicum* metaboliza la fructosa casi de forma completa a través de las rutas de EMP y la ruta de las pentosas fosfato (PPP) (36 y 62%, respectivamente). Esta razón de flujos no es lejana a la razón EMP/ED hallada en *C. salexigens* al crecer en fructosa. Tanto PPP como ED son rutas que proveen NADPH, a diferencia de EMP, que provee NADH. Este hecho subraya las ventajas de equilibrar los flujos de varias rutas alternativas con diferentes rendimientos en energía y cofactores reducidos cuando la fuente de carbono puede catabolizarse mediante más de una ruta.

Aunque *C. salexigens* posee dos rutas para la captación y metabolización de la fructosa, el patrón de marcaje con  $^{13}\text{C}$  de las ectoínas demostró que este organismo prefiere usar la ruta de ED para el crecimiento. La ruta dependiente de  $\text{PTS}^{\text{Fru}}$  implica la activación consecutiva de fructosa a fructosa-1-fosfato y fructosa-1,6-bisfosfato. Esta ruta contribuye a la metabolización de la fructosa por medio de una ruta similar a EMP, que produce 2 equivalentes de ATP y 2 de NADH por mol de fructosa. Por otro lado, la ruta dependiente de fructoquinasa conlleva la activación de la fructosa a fructosa-6-fosfato y su posterior isomerización a glucosa-6-fosfato y oxidación a través de la ruta de ED, que produce 1 ATP, 1NADH y 1 NADPH por mol de fructosa. Además, *C. salexigens* carece de 6-fosfofructoquinasa, pero cuenta con una 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato que cataliza la transformación de fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato. Por tanto, los *pools* de fructosa-1-fosfato y fructosa-6-fosfato no son independientes, sino que están conectadas *in vivo*.

En *C. salexigens*, la supervivencia a alta salinidad se apoya en la eficiencia de un alto nivel de anaplerosis que alimenta la ruta de síntesis de ectoínas con suficiente cantidad de precursores, y es precisamente este alto flujo anaplerótico la clave que puede explicar la baja eficiencia del metabolismo de la glucosa a baja salinidad (Pastor *et al.*, 2013). En *C. salexigens*, y otros microorganismos relacionados como *P. putida*, la fructosa se metaboliza en su mayor parte a través de enzimas de la ruta de ED. Ambos microorganismos cuentan con todas las enzimas necesarias para dirigir la fructosa de manera eficaz a través de la ruta de EMP que, a su vez, es termodinámicamente más favorable que la ruta de ED (Chavarría *et al.*, 2012; este trabajo). Los motivos para preferir esta ruta podrían estar relacionados con el estilo de vida, p.

el., una alta demanda de intermedios de ED para la construcción de los polímeros de la pared celular y/o una gran demanda de equivalentes reducidos (NADPH), cuya síntesis se ve favorecida por la ruta de ED (Chavarría *et al.*, 2012; Pastor *et al.*, 2013). En *C. salexigens*, la alta demanda de NADPH es especialmente necesaria en condiciones de osmolaridad elevada para sostener la síntesis de ectoínas (se requieren 2 moles de piruvato y 3 de NADPH por mol de ectoína sintetizada). *P. putida* favorece la ruta de ED sobre la de EMP con el fin de ajustar su metabolismo aeróbico para poder resistir daños oxidativos (Chavarría *et al.*, 2012). La expresión de Pfk<sup>E.coli</sup> en *P. putida* no permitió la reconstrucción de una ruta de EMP funcional, sino que alteró el equilibrio de los niveles de ATP y NADPH, lo que en última instancia resultó perjudicial para el crecimiento de la bacteria (Chavarría *et al.*, 2012). Otras razones que explican la prevalencia de la ruta de ED en algunos microorganismos es que puede suponer una ventaja competitiva frente a microbios que no crecen o crecen de forma ineficiente en gluconato. La ruta de ED permite oxidar rápidamente la glucosa a gluconato con enzimas periplásmicas, secuestrando así la fuente de carbono disponible (Chavarría *et al.*, 2012).

A pesar de que nuestros resultados demuestran que la contribución de la ruta similar a EMP para metabolizar la fructosa tiene una presencia menor, PTS<sup>Fru</sup> podría ser muy importante en el fenotipo observado de *C. salexigens*. En *C. salexigens* y *P. putida*, el transportador específico para fructosa PTS<sup>Fru</sup>, que está constituido por FruB (EI-HPr-EIIA) y FruA (EIIBC), coexiste con un grupo de proteínas parálogo, conocido como PTS<sup>Ntr</sup>, que carece del módulo EIIBC, encargado de la captación del azúcar (Chavarría *et al.*, 2013). La función del sistema alternativo PTS<sup>Ntr</sup> no está clara. En un primer momento se creyó que PST<sup>Ntr</sup> era un sensor del equilibrio metabólico entre N y C, controlando además la entrada y salida de iones potasio. Chavarría y colaboradores (2013) demostraron recientemente que en *P. putida*, PTS<sup>Ntr</sup> influye en el flujo de carbono de y hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT), mediante la inhibición del “*by-pass*” metabólico que convierte malato en piruvato. De hecho, el estado de fosforilación de la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> de PTS<sup>Ntr</sup> responde a señales ambientales ajustando los flujos metabólicos centrales para satisfacer los requerimientos anabólicos y de energía de la fisiología celular global (Chavarría *et al.*, 2013).

Las dos reacciones implicadas en el “*by-pass*” del piruvato, el enzima málico y la piruvato carboxilasa, se han detectado en extractos de *C. salexigens* (Pastor *et al.*, 2013). Ambas reacciones, que están reguladas en cultivos en fructosa de *P. putida*, suponen un “*rodeo*” metabólico, que redundaría en una hidrólisis de ATP y síntesis de NADPH netas. Frecuentemente, las reacciones metabólicas fútiles se comportan como válvulas de seguridad para aliviar un exceso de flujo de carbono (Sauer y Eikmanns, 2005). De forma alternativa, este “*by-pass*”

podría ser una manera de generar poder reductor a expensas del ATP. Este no es el único caso de rodeo metabólico en *P. putida* que podría tener un rol en la promoción de la síntesis de NADPH. Muy recientemente, se ha descrito un ciclo que implica la operación conjunta de las rutas de ED y EMP en *P. putida* (Nikel *et al.*, 2015) al crecer en glucosa. Este ciclo implica el uso de algunas enzimas de las rutas de ED y de las pentosas fosfato, y algunas otras de la ruta de EMP, funcionando esta última en modo gluconeogénico. Este ciclo produce una síntesis neta de NADPH a expensas del ATP, como en el caso del “*by-pass*” del piruvato. Así, con independencia de la fuente de carbono usada, la red metabólica de *P. putida* parece estar limitada por unos requerimientos mínimos de NADPH elevados que siempre han de alcanzarse. Ambos ejemplos reflejan las adaptaciones metabólicas que los microbios que necesitan grandes cantidades de equivalentes de reducción, como en el caso de *P. putida* y *C. salexigens* (Chavarría *et al.*, 2012; Pastor *et al.*, 2013) podrían haber desarrollado, obligados por sus estilos de vida.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado la existencia de dos rutas alternativas interconectadas para la incorporación de fructosa en *C. salexigens*, muy similares a las rutas clásicas de ED y EMP. Ambas difieren entre sí en sus rendimientos de energía y equivalentes redox. Se ha demostrado la actividad de varias enzimas de las dos rutas mediante  $^{31}\text{P}$ -RMN, y en el caso de los genes Csal0931 y Csal2647, se les han podido asignar de forma específica actividades enzimáticas mediante clonaje, expresión heteróloga y purificación en *E. coli*, y ensayos bioquímicos. La verdadera naturaleza de Csal0639 aún debe ser esclarecida. Por último, se estimó la distribución de los flujos de carbono entre ambas rutas rastreando la marca isotópica mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN, subrayando la preferencia por la ruta de ED.

El crecimiento de *C. salexigens* en fructosa resultó ser eficiente, como demuestra el alto rendimiento en biomasa y la ausencia de metabolismo *overflow*. En general, la existencia de dos rutas alternativas para el metabolismo de la fructosa otorga a este halófilo una forma de reconciliar las demandas impuestas por unas condiciones ambientales exigentes con sus propias necesidades de crecimiento y mantenimiento. Los microorganismos han desarrollado ciertas estrategias para optimizar sus rendimientos metabólicos de manera que aseguren la síntesis de solutos compatibles, necesarios para la supervivencia celular y la duplicación. Para poder comprender la relevancia de este hallazgo para la adaptación ambiental de *C. salexigens*, debe tenerse presente que en la naturaleza, los halófilos muy raramente se

encuentran en medios ricos con una única fuente de carbono, sino que más bien se enfrentan a concentraciones pequeñas de unos nutrientes que deben de aprovechar y catabolizar de forma eficiente.

Aunque se ha sugerido que la implicación de PTS<sup>Ntr</sup> en algunos de estos rasgos metabólicos, basándose en los mecanismos descritos en la bacteria relacionada *P. putida*, su papel real en el metabolismo de *C. salexigens* no es conocido. Los mecanismos específicos que conectan la razón de flujos metabólicos entre las rutas ED y EMP con la supresión del metabolismo *overflow* y el equilibrio de flujos del CAT y anapleróticos aún están por revelar.

**BIBLIOGRAFÍA**

Altekar, W., y Rangaswamy, V. (1992) Degradation of endogenous fructose during catabolism of sucrose and mannitol in halophilic archaeobacteria. *Arch Microbiol* **158**: 356-363.

Arahal, D.R., García, M.T., Vargas, C., Cánovas, D., Nieto, J.J., y Ventosa, A. (2001) *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species that includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1457-1462.

Bertagnolli, B.L., y Cook, P.F. (1984) Kinetic mechanism of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Propionibacterium freudenreichii*. *Biochemistry* **23**: 4101-4108.

Canovas, D., Cánovas, D., Vargas, C., Iglesias-Guerra, F., Csonka, L.N., Rhodes, D., et al. (1997) Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. *J Biol Chem* **272**: 25794-801.

Castaño-Cerezo, S., Bernal, V., Röhrig, T., Termeer, S., y Cánovas, M. (2015) Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N(ε)-lysine acetylation. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 3533-45.

Chavarría, M., Führer, T., Sauer, U., Pflüger-Grau, K., y Lorenzo, V. de (2013) Cra regulates the cross-talk between the two branches of the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **15**: 121-32.

Chavarría, M., Nickel, P.I., Pérez-Pantoja, D., y Lorenzo, V. de (2012) The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ Microbiol* **15**: 1772-85.

Conway, T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev* **9**: 1-27.

Copeland, A., O'Connor, K., Lucas, S., Lapidus, A., Berry, K.W., Detter, J.C., et al. (2011) Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11(T)). *Stand Genomic Sci* **5**: 379-88.

Crécy-Lagard, V. de, Bouvet, O.M., Lejeune, P., y Danchin, A. (1991) Fructose catabolism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Sequence of the PTS operon, characterization of the fructose-specific enzymes. *J Biol Chem* **266**: 18154-61.

Csonka, L.N., O'Connor, K., Larimer, F., Richardson, P., Lapidus, A., Ewing, A.D., et al. (2005) What we can deduce about metabolism in the moderate halophile *Chromohalobacter salexigens* from its genomic sequence. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Gunde-Cimerman, N., Oren, A., y Plemenitas, A. (eds). pp. 267-285.

Entner, N., y Doudoroff, M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem* **196**: 853-862.

Führer, T., Fischer, E., y Sauer, U. (2005) Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol* **187**: 1581-90.

- Galinski, E.A. (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* **49**: 487-496.
- He, Y.-Z., Gong, J., Yu, H.-Y., Tao, Y., Zhang, S., y Dong, Z.-Y. (2015) High production of ectoine from aspartate and glycerol by use of whole-cell biocatalysis in recombinant *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **14**: 55.
- Johnsen, U., Selig, M., Xavier, K.B., Santos, H., y Schönheit, P. (2001) Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*. *Arch Microbiol* **175**: 52-61.
- Kemp, R.G., y Tripathi, R.L. (1993) Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase complements fructose 1,6-bisphosphatase but not phosphofructokinase deficiency in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 5723-5724.
- Kiefer, P., Heinzle, E., Zelder, O., y Wittmann, C. (2004) Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol* **70**: 229-239.
- Morozkina, E. V., Slutskaia, E.S., Fedorova, T. V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I., y Koroleva, O. V. (2010) Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Appl Biochem Microbiol* **46**: 1-14.
- Nikel, P.I., Chavarria, M., Fuhrer, T., Sauer, U., y Lorenzo, V. de (2015) *Pseudomonas putida* KT2440 metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *J Biol Chem* Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pu>.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334-348.
- Oren, A. (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 56-63.
- Pastor, J.M., Bernal, V., Salvador, M., Argandona, M., Vargas, C., Csonka, L.N., et al. (2013) Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Biol Chem* **288**: 17769-81.
- Peng, L., y Shimizu, K. (2003) Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 163-178.
- Roberts, M.F. (2004) Osmoadaptation and osmoregulation in archaea: update 2004. *Front Biosci* **9**: 1999-2019.
- Romano, A.H., y Conway, T. (1996) Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res Microbiol* **147**: 448-55.
- Sauer, U., y Eikmanns, B.J. (2005) The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 765-94.
- Sawyer, M.H., Baumann, P., Baumann, L., Berman, S.M., Cánovas, J.L., y Berman, R.H. (1977)

- Pathways of d-fructose catabolism in species of *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* **112**: 49-55.
- Schiraldi, C., y Rosa, M. de (2002) The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol* **20**: 515-21.
- Severin, J., Wohlfarth, A., y Galinski, E.A. (1992) The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 1629-1638.
- Stöveken, N., Pittelkow, M., Sinner, T., Jensen, R.A., Heider, J., y Bremer, E. (2011) A specialized aspartokinase enhances the biosynthesis of the osmoprotectants ectoine and hydroxyectoine in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *J Bacteriol* **193**: 4456-68.
- Sudarsan, S., Dethlefsen, S., Blank, L.M., Siemann-Herzberg, M., y Schmid, A. (2014) The functional structure of central carbon metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **80**: 5292-303.
- Vargas, C., Coronado, M.J., Ventosa, A., y Nieto, J.J. (1997) Host range, stability and compatibility of broad host-range-plasmids and a shuttle vector in moderately halophilic bacteria. Evidence of intrageneric and intergeneric conjugation in moderate halophiles. *Syst Appl Microbiol* **20**: 173-181.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., y Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504-44.
- Werner, S., Diekert, G., y Schuster, S. (2010) Revisiting the thermodynamic theory of optimal ATP stoichiometries by analysis of various ATP-producing metabolic pathways. *J Mol Evol* **71**: 346-55.



## **CAPÍTULO VI**

### **Discusión final y conclusiones**



## INTRODUCCIÓN

A lo largo de los sucesivos capítulos de esta Tesis Doctoral se han abordado distintos aspectos del metabolismo de *Chromohalobacter salexigens* y cómo éstos se interrelacionan con sus necesidades de osmoadaptación. La síntesis y acumulación de los solutos compatibles ectoína e hidroxiectoína es la base de esta adaptación a las condiciones salinas ambientales de esta bacteria halófila. Por otro lado, estas dos sustancias han encontrado en las últimas décadas un número creciente de aplicaciones cosméticas, biotecnológicas, y más recientemente potenciales aplicaciones terapéuticas, que han dado lugar a la aparición de distintas estrategias industriales de producción a partir de microorganismos productores, ya sean naturales o modificados mediante ingeniería genética, que aparecen resumidas en el Capítulo I.

El interés industrial de las ectoínas y otros solutos compatibles, y la estrecha relación entre su biosíntesis y la respuesta de osmoadaptación del metabolismo central de los organismos que las producen, hace evidente la necesidad de contar con un microorganismo halófilo modelo, cuyo metabolismo sirva de referencia para el desarrollo de estrategias de ingeniería metabólica en este tipo de procariotas, en la línea de otros modelos bien establecidos como *Escherichia coli* (Almaas *et al.*, 2004; Keseler *et al.*, 2013) o *Bacillus subtilis* (Mäder *et al.*, 2012). Hoy en día ya están disponibles y anotados los genomas completos de numerosos ejemplos de procariotas halófilos y halotolerantes, tanto arqueas como bacterias, incluyendo a *C. salexigens*. Paralelamente, se ha ido avanzando en la elucidación de las rutas centrales del metabolismo del carbono en halófilos y extremófilos que acumulan iones inorgánicos en respuesta a la alta osmolaridad exterior, principalmente del dominio de las arqueas (Oren y Mana, 2003; Lamble *et al.*, 2003; Falb *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). En algunos ejemplos de bacterias mesófilas se ha estudiado la influencia de la necesidad de adaptación a determinados tipos de estrés abiótico en la configuración de las rutas de degradación de la fuente de carbono, como en el caso de *Pseudomonas putida* y el estrés oxidativo (Chavarría *et al.*, 2012; Nikel *et al.*, 2015), o de *Corynebacterium glutamicum* y una alta demanda biosintética (Varela *et al.*, 2003; Kiefer *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se ha abordado en ningún microorganismo un estudio específico en el que se relacionen directamente la distribución de flujos del metabolismo central con una demanda biosintética cambiante según la salinidad del medio. Los resultados presentados en esta Tesis suponen un paso importante en esa dirección. La respuesta de las bacterias halófilas y halotolerantes aerobias al estrés osmótico se distingue de la de las arqueas y bacterias anaerobias, estando basada en la síntesis y acumulación celular de los denominados “solutos compatibles”. Esta

estrategia, denominada “*organic solutes in*” ejerce una importante presión sobre el metabolismo celular, drenando intermediarios metabólicos y consumiendo otros recursos, tales como energía y poder reductor. Entender mejor las peculiaridades de las adaptaciones desarrolladas por estas bacterias es de tremendo interés para utilizarlas como factorías celulares.

En el primer capítulo de esta Tesis se introduce el papel de las ectoínas dentro de los diferentes solutos compatibles empleados de forma natural por los organismos halófilos. Se expone el conocimiento que se tiene de sus rutas de síntesis y degradación en los microorganismos que las sintetizan y/o acumulan. Se enumeran las diferentes aplicaciones de interés industrial, biológico y médico que se han ido descubriendo, así como las que están en fase de desarrollo y se discuten los mecanismos fisicoquímicos de sus efectos sobre macromoléculas biológicas y células. Por último, se detalla el estado del arte en los métodos y estrategias de producción biotecnológica industrial de ectoínas, y las perspectivas de las nuevas estrategias de mejora de estos métodos.

En el capítulo tercero se aborda el primer estudio conjunto *in silico* y experimental del metabolismo central de *C. salexigens*. Del estudio de la información disponible en el momento en la anotación genómica de *C. salexigens* surge una imagen general de las posibles rutas de su metabolismo de carbono y central, y de síntesis de ectoínas (Figura III.3). En esta imagen aparecen algunas incertidumbres, la más importante de ellas es la planteada por la ausencia de una asignación clara a la enzima glucolítica 6-fosfofructoquinasa (Pfk), y por tanto de las rutas utilizadas por *C. salexigens* en la catabolización de glucosa como fuente de carbono. Mediante la aplicación de diversas técnicas analíticas, como HPLC, RMN y espectrometría de masas se confirma un rasgo central del metabolismo de *C. salexigens*: la presencia de un metabolismo *overflow* a baja salinidad, que conlleva una menor eficiencia en el consumo de la fuente de carbono y la síntesis de biomasa. Los estudios de rastreo de marcaje con glucosa marcada isotópicamente mediante <sup>13</sup>C-RMN, junto con técnicas espectrofotométricas de medida de actividades enzimáticas completan la imagen general del metabolismo arrojando dos resultados principales: i) *C. salexigens* carece aparentemente de la enzima Pfk, lo que le impide metabolizar la glucosa mediante la glucólisis, y emplea en su lugar la ruta de Entner-Doudoroff (ED) como vía principal y ii) existe un alto nivel de anaplerosis y una rigidez en la distribución de flujos del metabolismo central que se mantiene independientemente del nivel de la demanda biosintética impuesta por la salinidad exterior. Esta rigidez puede ser una de las causas de la menor eficacia del metabolismo a baja salinidad y consecuencia de la necesidad primaria de osmoadaptación del microorganismo. Por su parte, la elección de la ruta de ED

como vía principal para la metabolización de la glucosa junto con los altos niveles de anaplerosis, aparecen como posibles estrategias desarrolladas para satisfacer la demanda biosintética en forma de NADPH que exige la síntesis de ectoínas.

El estudio del metabolismo central continúa en el capítulo IV, donde se aborda el análisis de la interrelación entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno. La oportunidad de ese estudio viene dada porque las ectoínas son moléculas con alto contenido en nitrógeno. Se comprueba cómo la proporción C/N en el medio de cultivo afecta a la eficiencia metabólica de *C. salexigens*, afectando enormemente al metabolismo *overflow* y al rendimiento de la síntesis de ectoínas. La información obtenida del estudio permite optimizar el diseño de las condiciones de cultivo (composición y modo de operación), que ofrezcan una mejora en la eficacia del crecimiento y la síntesis de ectoínas. Para comprobar cómo la carga metabólica impuesta por la síntesis de ectoínas condiciona la asimilación de la fuente de nitrógeno, se analizan por primera vez el perfil metabólico de una cepa de *C. salexigens* deficiente en la síntesis de ectoínas (*C. salexigens* CHR62), y se ensayan diferentes fuentes de nitrógeno orgánicas en ambas cepas, CHR61 y CHR62, incluyendo la ectoína, que actúa como fuente de carbono y nitrógeno. Finalmente, se aplica el conocimiento obtenido para diseñar una estrategia de alimentación optimizada en cultivos “*fed-batch*” de *C. salexigens*. El análisis de los resultados revela tres hechos principales: i) una proporción alta de C/N produce una menor eficiencia metabólica en forma de mayor metabolismo *overflow*, mientras que la presencia de ectoína como fuente de carbono y nitrógeno en el medio reduce esta ineficiencia ii) la eficacia en la síntesis de ectoínas es mayor cuando el medio es pobre en fuentes de C y N, y iii) los flujos relativos del metabolismo central, no se ven afectados por la composición del medio en términos de C y N, lo que vuelve a poner de manifiesto la rigidez del metabolismo central. En conjunto estos resultados apuntan a que *C. salexigens* ha evolucionado de forma que su metabolismo prioriza la adaptación por un lado al crecimiento en altas concentraciones de sal, y por otro a una disponibilidad de nutrientes limitada, sacrificando la eficiencia global del metabolismo cuando alguna de estas condiciones restrictivas no se cumple.

En el último capítulo experimental, ya con una imagen más clara del metabolismo central, se aborda en mayor profundidad el estudio de las rutas de catabolización de la fuente de carbono, comparando dos de las más importantes, glucosa y fructosa. A partir de la anotación genómica disponible se preveía la disponibilidad de dos rutas alternativas para la asimilación de fructosa: una de ellas conectada con la ruta de ED, y una ruta glucolítica (EMP), que esquivaba la carencia predicha de la enzima Pfk (Figura V.3A). El crecimiento en fructosa resultó más eficiente que en glucosa, especialmente a bajas salinidades, donde no se observó

metabolismo *overflow*, y se alcanzaron mayores niveles de biomasa. Los estudios de  $^{13}\text{C}$ -RMN confirmaron la contribución de ambas rutas en la síntesis de ectoínas, estimándose de un 85% para ED y un 15% para EMP, independientemente de la concentración de sal. Por otro lado, estudios de extractos proteicos por  $^{31}\text{P}$ -RMN y de expresión de genes mediante RT-PCR, ayudaron a confirmar la presencia de varias enzimas de ambas rutas, y confirmaron nuevamente la carencia de actividad Pfk detectable. Además, en este trabajo se clonaron por primera vez genes de *C. salexigens* no relacionados con el metabolismo de las ectoínas en *E. coli*. Estas proteínas se eligieron al presentar sus genes mayores niveles de expresión al crecer en fructosa que en glucosa. Una vez extraídas y purificadas, se pudo confirmar mediante métodos espectrofotométricos la actividad que se les atribuía a dos de estas proteínas: 1-fosfofructoquinasa (1Pfk) a *csal2647* y fructoquinasa (Frk) a *csal0931*, representantes de las rutas de EMP y ED, respectivamente, mientras que no se consiguió asignar una actividad a la enzima codificada por *Csal0639*. El hallazgo central de este trabajo fue poner en evidencia la disponibilidad en *C. salexigens* de una ruta glucolítica para el crecimiento en fructosa, y cómo el disponer de esta alternativa a la ruta de ED da lugar a un metabolismo más eficiente, posiblemente debido a la diferencia en el rendimiento energético y redox de ambas rutas. El caso de *C. salexigens* se puede comparar con el de *P. putida*, que presenta un esquema similar para la metabolización de la fructosa. En ambos casos, el entorno natural estresante en el que normalmente proliferan convierte la disponibilidad de más de una ruta para la metabolización de la fuente carbono, con diferentes rendimientos energéticos y redox, en una ventaja importante.

## DISCUSIÓN

La síntesis de ectoínas retira de forma cuantitativa intermedios del metabolismo central, impactando enormemente en el metabolismo de carbono y nitrógeno. La acumulación de ectoínas en la célula es masiva, de tal manera que los niveles de ectoínas son comparables a los del resto de componentes de la biomasa. De esta manera, se entiende que el impacto sobre la red completa de flujos metabólicos de *C. salexigens* es enorme. Además, esta demanda biosintética depende fuertemente de la osmolaridad del medio, que en el hábitat natural de muchos halófilos puede sufrir cambios amplios en muy poco tiempo debido a fenómenos como la lluvia y la evaporación. Este estudio del metabolismo de *C. salexigens*, es el primero en el que se aborda desde una perspectiva global la dinámica del metabolismo

cuando una componente cuantitativamente tan grande del mismo está sometida a fluctuaciones rápidas condicionadas por el ambiente.

Uno de los resultados principales de esta Tesis es la aparente rigidez del metabolismo central ante variaciones de salinidad o de disponibilidad de nitrógeno, y cómo esta rigidez da lugar a un metabolismo ineficiente (aparición del *overflow*) cuando la salinidad o la disponibilidad del nitrógeno son bajas. Las condiciones en las que se suelen cultivar las bacterias en el laboratorio difieren mucho de las que se dan en los ambientes naturales de donde se aislaron. En estas condiciones, no es fácil que haya una única fuente de carbono, y que además no sea limitante (Zahran, 1997; Oren, 2002). De esta forma la “ineficiencia” metabólica de *C. salexigens* sólo aparecería en situaciones en las que haya una disponibilidad de carbono mayor de lo habitual. Además la composición de los entornos salinos es compleja, donde los nutrientes pueden provenir de la degradación de restos orgánicos de organismos superiores, como la celulosa y lignocelulosa de las plantas (Zahran, 1997), de los restos celulares de otros procariontes o de sustancias excretadas por estos. *C. salexigens* puede liberar al medio las ectoínas acumuladas cuando la salinidad disminuye bruscamente, y en estas condiciones su capacidad de emplear las ectoínas como fuente de carbono y nitrógeno puede tener un papel muy importante para su mantenimiento (Vargas *et al.*, 2006).

En el capítulo IV se explica cómo al haber ectoína disponible en el medio, *C. salexigens* consume la glucosa más lentamente, y el metabolismo *overflow* disminuye (menor excreción de acetato y piruvato), pero la acumulación en el medio de gluconato se hace mayor, indicando que probablemente la velocidad de la oxidación periplásmica de la glucosa no disminuya. Además, dada la importancia de la ruta de ED y la síntesis de NADPH para *C. salexigens*, la oxidación rápida a gluconato al crecer en glucosa puede verse como una adaptación deficiente de su metabolismo en las condiciones de crecimiento en el laboratorio, pero en un entorno compartido con otras especies procariontes puede suponer una ventaja competitiva frente a otras especies que no sean capaces de degradar el gluconato (Referencia).

En las condiciones en que *C. salexigens* presenta metabolismo *overflow*, el piruvato es el ácido excretado más abundante. En ambientes hipersalinos, muchas bacterias y arqueas excretan piruvato al degradar glicerol o hexosas (Tomlinson y Hochstein, 1976; Oren y Gurevich, 1994). Recientemente se ha visto que el piruvato es un nutriente importante para muchas especies de arqueas, incluso esencial para algunas de ellas (Oren, 2015). Hay aún poca información disponible sobre el papel del piruvato en ambientes salinos, y de los sistemas de

transporte y asimilación de los organismos que lo consumen. Esto sugiere, que el *overflow* podría tener un papel importante aún no conocido en la red trófica de los hábitats en que *C. salexigens* crece. El hecho de que *C. salexigens* “done” parte del carbono metabolizado a otras especies podría no ser accidental, sino la consecuencia de una interdependencia entre especies que favorezca el mantenimiento de la riqueza de las poblaciones en su ecosistema. Por ejemplo, las especies halófilas conocidas que son dependientes de la disponibilidad de piruvato son arqueas halófilas extremas (Oren, 2015), y en las condiciones de baja salinidad, que es en las que *C. salexigens* excreta el piruvato, podría ser una ayuda para estas arqueas.

En el capítulo V hemos visto cómo la fructosa ofrece ventajas para *C. salexigens* sobre la glucosa. La primera le ofrece la posibilidad de alcanzar un compromiso óptimo entre la alta demanda anabólica y los requerimientos de energía. Una consecuencia de ello es que el crecimiento, aunque más lento, es más eficiente. La ventaja de la fructosa sobre la glucosa parece deberse a que permite salvar la imposibilidad de una glucólisis funcional, ofreciendo un atajo que supere la falta de Pfk. Por otro lado, la carencia de Pfk también podría considerarse una ventaja adaptativa. Chavarría y colaboradores (Chavarría *et al.*, 2012) demostraron que la complementación de *P. putida* con una Pfk heteróloga de *E. coli*, no sólo no permite la desviación del flujo del carbono desde la ruta de ED hacia la glucólisis, sino que además hace a *P. putida* más sensible al estrés oxidativo, a causa de una deficiencia de NADPH. Además, se ha comprobado que cepas de *E. coli* deficientes en PfkA y PfkB, redirigen el flujo de carbono hacia la ruta de las pentosas fosfato, aumentando la disponibilidad de NADPH, lo que permite a estas cepas sintetizar mayores niveles de licopeno (Wang *et al.*, 2013). En el caso de *C. salexigens*, hemos comprobado que aunque el consumo de glucosa es menos eficiente, se prefiere sobre la fructosa cuando ambas fuentes de carbono están presentes en el medio. Es decir, el metabolismo de fructosa está reprimido por catabolito. En cultivos con ambas fuentes de carbono, la fructosa empieza a consumirse junto con el piruvato una vez que se ha agotado la glucosa del medio. Todos estos hechos hacen pensar que para *C. salexigens* cada una de las dos hexosas podría ofrecer ventajas diferentes en circunstancias diferentes. Para comprender mejor esto sería necesario conocer mejor la disponibilidad de ambas fuentes de carbono y la red trófica que se establece con otros microorganismos en su medio natural de crecimiento.

En resumen, a lo largo de los capítulos anteriores se han ido dibujando, apoyándonos en resultados experimentales, los rasgos globales más importantes del metabolismo de *C. salexigens*. Además, se han ido relacionando con la información disponible anotada en el genoma, y con las limitaciones impuestas por el medio de crecimiento. Pero aún es necesario un conocimiento más profundo de aspectos esenciales del metabolismo. Por ejemplo, cómo se

integra el recambio (equilibrio entre síntesis y degradación) de las ectoínas con el resto del metabolismo. En este aspecto, el acetato producido en el *overflow* podría tener un papel central, ya que el acetil coenzima A es al mismo tiempo necesario para la síntesis de las ectoínas y un producto intermedio de su degradación. Otros aspectos serían la distribución de los flujos del metabolismo central al crecer en fructosa (flujos relativos), lo cual ayudaría a comprender los mecanismos metabólicos concretos que relacionan la rigidez de las rutas centrales del carbono y los niveles de anaplerosis con la presencia/ausencia de *overflow*, y con las distintas formas de asimilación del amonio del medio. Una forma de obtener e integrar toda esta información es la realización de un modelo metabólico sencillo que aplique análisis de MFA o FBA. Este modelo debería apoyarse en todos estos datos experimentales y otros necesarios para seguir completando un modelo representativo de la realidad del metabolismo. Este tipo de análisis son de mucha utilidad en el diseño de estrategias de optimización de flujos metabólicos para la mejora de cepas por ingeniería genética, que en el caso de una especie productora de una sustancia con tantas aplicaciones es de gran interés. Por último, se debería integrar todo este conocimiento en el contexto natural de *C. salexigens*, donde se tengan en cuenta las condiciones ambientales cambiantes, la disponibilidad de nutrientes y su jerarquía de consumo, y el papel que puede tener en la cadena trófica y la dinámica de las poblaciones de halófilos puede ayudar a comprender mejor el metabolismo de esta especie.

## CONCLUSIONES

Aunque en el último capítulo se han resumido los resultados expuestos a lo largo de esta Tesis, a continuación se exponen las principales conclusiones alcanzadas para una mayor claridad:

1. El metabolismo central de *C. salexigens* está modulado por la salinidad. *C. salexigens* metaboliza la glucosa de forma menos eficiente al crecer en baja salinidad (NaCl 0,6-0,75 M) que a alta salinidad (NaCl 2,5 M). Esta menor eficiencia se caracteriza por: i) un rendimiento en biomasa mayor a mayor salinidad, ii) un coeficiente de consumo de glucosa decreciente con la salinidad y iii) la presencia de *overflow* de piruvato y acetato a baja salinidad.
2. El metabolismo de glucosa ocurre principalmente mediante la ruta de ED (hasta un 95%), mientras que no se aprecia contribución significativa de una ruta glucolítica estándar. Esta elección se debe a la carencia de la enzima glucolítica 6-fosfofructoquinasa (Pfk) y permite la síntesis de NADPH que permite balancear los altos requerimientos de este cofactor debido a la demanda de síntesis de ectoínas.
3. La relación entre el flujo anaplerótico y el flujo a través del ciclo del ácido cítrico es relativamente alta en comparación con otros microorganismos relacionados. El alto nivel de anaplerosis se justifica con una necesidad de reponer los intermediarios retirados para síntesis de ectoínas. El flujo anaplerótico se debe principalmente a la actividad de la enzima piruvato carboxilasa (Pc). La distribución de flujos entre la anaplerosis, ciclo del ácido cítrico y síntesis de ectoínas presenta una rigidez que se demuestra por unos flujos relativos que no varían con la salinidad externa, ni con la proporción C/N del medio.
4. La concentración de amonio modula la velocidad de crecimiento de *C. salexigens* y el rendimiento en biomasa, probablemente debido a la existencia de dos sistemas de incorporación con distinto grado de afinidad. En cultivos discontinuos, una baja concentración de amonio en el medio incrementa la excreción de metabolitos del *overflow*.
5. La ectoína puede actuar como única fuente de nitrógeno para *C. salexigens*. En presencia de glucosa y ectoína, mejora la eficacia metabólica, disminuyendo la excreción de piruvato y la velocidad del consumo de glucosa. La excreción de acetato aumenta al consumir ectoína, probablemente debido a que se acumule al degradarla.

6. La síntesis y acumulación de ectoínas es mayor a menores concentraciones de glucosa y amonio en el medio, lo que sugiere que *C. salexigens* está adaptado a crecer en un medio pobre en nutrientes.
7. Mediante cultivo en “fed-batch”, con dos fases de alimentación, en el que la fuente de carbono es el nutriente limitante, y con una baja concentración de amonio en la segunda fase es posible eliminar la aparición del *overflow* observado en los cultivos discontinuos y alcanzar altos niveles de biomasa (hasta 42,4 g/L) y de ectoínas (hasta... g/L).
8. El crecimiento de *C. salexigens* es más eficaz en fructosa como fuente de carbono que en glucosa. Al crecer en fructosa se alcanza mayor nivel de biomasa y no se observa presencia de *overflow*. La diferencia en el rendimiento en biomasa es mayor a bajas salinidades, donde el *overflow* en glucosa es más significativo.
9. La fructosa puede ser metabolizada por dos rutas de asimilación alternativas en *C. salexigens*. Una implica el transporte y fosforilación a fructosa-1-fosfato por un sistema PTS, que conecta con la ruta de EMP, y probablemente (a través de Pfk dependiente de pirofosfato) también con la ruta de ED. La otra implica la fosforilación de fructosa a fructosa-6-fosfato y su posterior metabolización por medio de ED. *C. salexigens* distribuye el flujo de fructosa entre ambas rutas, destinando un 80-85% a la ruta de ED y un 15-20% a la ruta de EMP. Esta proporción no varía con la salinidad.
10. *C. salexigens* cuenta con una enzima 1-fosfofructoquinasa, codificada por *csal2647*, y con una enzima fructoquinasa, codificada por *csal0931*. La presencia de estas enzimas se corresponde con las rutas predichas de EMP y ED, respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almaas, E., Kovács, B., Vicsek, T., Oltvai, Z.N., y Barabási, A.-L. (2004) Global organization of metabolic fluxes in the bacterium *Escherichia coli*. *Nature* **427**: 839-43.
- Chavarría, M., Nickel, P.I., Pérez-Pantoja, D., y Lorenzo, V. de (2012) The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ Microbiol* **15**: 1772-85.
- Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., Gronau, S. von, *et al.* (2008) Metabolism of halophilic archaea. *Extrem Life under Extrem Cond* **12**: 177-96.
- Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., *et al.* (2013) EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res* **41**: D605-12.
- Kiefer, P., Heinzle, E., Zelder, O., y Wittmann, C. (2004) Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol* **70**: 229-239.
- Lamble, H., Heyer, N.I., Bull, S.D., Hough, D.W., y Danson, M.J. (2003) Metabolic pathway promiscuity in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed by studies on glucose dehydrogenase and 2-keto-3-deoxygluconate aldolase. *J Biol Chem* **278**: 34066-72.
- Liu, T., Shen, Y., Liu, Q., y Liu, B. (2008) The unique Entner-Doudoroff (ED) glycolysis pathway of glucose in archaea: a review. *Acta Microbiol Sin* **48**: 1126-31.
- Mäder, U., Schmeisky, A.G., Flórez, L.A., y Stülke, J. (2012) SubtiWiki: a comprehensive community resource for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **40**: D1278-87.
- Nickel, P.I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., y Lorenzo, V. de (2015) *Pseudomonas putida* KT2440 metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *J Biol Chem* Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pu>.
- Oren, A. (2002) *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Oren, A. (2015) Pyruvate: A key nutrient in hypersaline environments? *Microorganisms* **3**: 407-416.
- Oren, A., y Gurevich, P. (1994) Production of D-lactate, acetate, and pyruvate from glycerol in communities of halophilic archaea in the Dead Sea and in saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* **14**: 147-155.
- Oren, A., y Mana, L. (2003) Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 83-87.
- Tomlinson, G.A., y Hochstein, L.I. (1976) *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* **22**: 587-91.
- Varela, C., Agosin, E., Baez, M., Klapa, M., y Stephanopoulos, G. (2003) Metabolic flux

redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 547-55.

Vargas, C., Jebbar, M., Carrasco, R., Blanco, C., Calderón, M.I., Iglesias-Guerra, F., y Nieto, J.J. (2006) Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Appl Microbiol* **100**: 98-107.

Wang, Y., San, K.-Y., y Bennett, G. (2013) Improvement of NADPH bioavailability in *Escherichia coli* through the use of phosphofructokinase deficient strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 6886-93.

Zahran, H.H. (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol Fertil Soils* **25**: 211-223.



# **ANEXO I**



## MATERIALES Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS

### Ensayos de actividad enzimática

Los valores de las actividades enzimáticas medidas vienen expresados como  $\mu\text{moles}$  de sustrato consumido por minuto (U), por mg de proteína. En cada caso, el volumen completo del cultivo discontinuo se centrifugó durante 15 minutos a 16000g y 4°C. El sobrenadante se retiró y se resuspendió el sedimento celular en tampón de extracción (tampón fosfato potásico 65 mM, pH 7,5). Se sonicaron las células así resuspendidas en baño con hielo durante 6 ciclos de 10 segundos cada uno, a 10  $\mu\text{m}$  de amplitud, con una sonda de 1 cm de diámetro. El extracto sonicado se centrifugó durante 20 minutos a 16000g y 4°C para retirar los restos celulares y se reservó el sobrenadante para las medidas de actividad posteriores. La concentración de proteína en los extractos libres de células se determinó por el método del ácido bicinónico (BCA), usando el kit Pierce® BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, EE.UU.). Las actividades enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente en un lector de microplacas Synergy™ HT Multi-Mode (Bio-Tek, Winooski, EE.UU.) con un volumen total de reacción de 200  $\mu\text{L}$ .

*6-Fosfofructoquinasa (Pfk)*. El método aplicado fue el descrito por Peng y Shimizu (Peng y Shimizu, 2003) con ligeras modificaciones. El tampón de medida fue HEPES-HCl 100 mM (pH 7), y la mezcla de reacción contuvo  $\text{MgCl}_2$  5 mM, NADH 0,25 mM, EDTA 1 mM, ATP 0,2 mM, 0,5 U/mL aldolasa, 0,5 U/mL triosa-fosfato isomerasa, 0,5 U/mL  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa. La reacción se disparó con fructosa-6-fosfato 1 mM. Se siguió la actividad enzimática a lo largo de 5 minutos como la disminución de la absorbancia debida a NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf)*. El método aplicado fue el descrito por Peng y Shimizu (Peng y Shimizu, 2003). El tampón de medida fue Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), y la mezcla de reacción contuvo  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NADP}^+$  1,5 mM. Se empleó glucosa-6-fosfato 10 mM como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática a lo largo de 5 minutos como el aumento de la absorbancia debida a NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Citrato sintasa (Cs)*. El método aplicado fue el de Peng y Shimizu (Peng y Shimizu, 2003), usando Tris-HCl 0,1 M (pH 7,8) como tampón de medida. La mezcla de reacción contuvo acetil coenzima A 0,1 mM, oxalacetato sódico 0,5 mM y ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) 0,15 mM. El coenzima A liberado en la reacción enzimática reacciona con el DTNB produciendo 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB), de color amarillo. Se siguió la actividad enzimática a lo largo de 6 minutos como el aumento de la absorbancia debida al 2-nitro-5-tiobenzoato a 420 nm ( $\epsilon_{\text{NTB}}=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> (Icdh)*. Se aplicó el método descrito por Aoshima et al. (Aoshima et al., 2003). El tampón de medida fue fosfato potásico 65 mM (pH 7,5). La mezcla de reacción contuvo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADP<sup>+</sup> o NAD<sup>+</sup> 2 mM. La reacción se disparó con D,L-isocitrato 2,5 mM. Se siguió la actividad enzimática a lo largo de 5 minutos como el incremento de la absorbancia debida a NADH/NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH/NADPH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Piruvato carboxilasa (Pc)*. La actividad Pc se determinó mediante el seguimiento de la oxidación de NADH en un ensayo acoplado con malato deshidrogenasa (Mdh). El protocolo aplicado fue una adaptación del descrito por Buch et al. (Buch et al., 2008), y se llevó a cabo en dos pasos. En el primer paso, la mezcla de reacción contuvo Tris-HCl 100 mM (pH 8) piruvato potásico 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 50 mM y ATP 5 mM. El extracto celular fue convenientemente diluido e incubado con esta mezcla de reacción durante 10 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción adicionando ácido tricloroacético (TCA), precipitando las proteínas presentes. El precipitado se retiró tras centrifugar a 14000g durante 30 minutos a 4°C. Se llevó el pH de los sobrenadantes a 8 adicionando NaOH 1 M. En el segundo paso del ensayo, el oxalacetato producido en el paso anterior se convirtió en L(-)-malato añadiendo 2 U/mL de Mdh y NADH 0,12 mM. La reacción se siguió utilizando microplacas, que se incubaron a 37°C hasta que la absorbancia a 340 nm se mantuvo constante.

*Fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc)*. La actividad Ppc se determinó mediante el seguimiento de la oxidación de NADH en un ensayo acoplado con malato deshidrogenasa (Mdh). La mezcla de reacción para el primer paso del ensayo contuvo Tris-HCl 100 mM (pH 8), fosfoenolpiruvato potásico 2 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y NaHCO<sub>3</sub> 50 mM. Se detuvo la reacción con ácido tricloroacético (TCA) y el resto de los pasos coinciden con los del protocolo de medida de Pc.

*Isocitrato liasa (Icl)*. Se aplicó el protocolo descrito por Aoshima et al. (Aoshima et al., 2003). El tampón de medida fue fosfato potásico 65 mM (pH 7,5), y la mezcla de reacción contuvo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, fenilhidrazina 20 mM y D,L-isocitrato sódico 5 mM como reactivo disparador. La actividad enzimática se siguió durante 5 minutos como el incremento de la absorbancia a 324 nm debida al producto de reacción del glioxilato con la fenilhidrazina ( $\epsilon_{\text{aducto}}=16800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Enzima málico (Mae)*. Este ensayo, que implica la medida de la actividad en el sentido opuesto al anaplerótico, fue descrito por Van der Werf et al. (van der Werf et al., 1997). El tampón de medida fue Tris-HCl 0,1 M (pH 7,8) y la mezcla de reacción contuvo MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, NADP<sup>+</sup> 2 mM y malato 10 mM como reactivo disparador. Se siguió la actividad enzimática

durante 5 minutos como el aumento de la absorbancia a 340 nm debida a NADH ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Aspartato aminotransferasa (AspAT)*. El método aplicado fue una modificación del descrito por Yagi et al. (Yagi et al., 1976). El tampón de medida fue fosfato potásico 50 mM (pH 7,5), y la mezcla de reacción contuvo NADH 3 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 15 mM, fosfato de piridoxal 0,02 mM y 17 U/mL de malato deshidrogenasa. Se inició la reacción adicionando aspartato 50 mM. Se siguió la actividad enzimática a lo largo de 5 minutos como la disminución de la absorbancia debida a NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADPH (Gdh)*. El método aplicado fue el descrito por Tesch et al. (Tesch et al., 1999). El tampón de medida fue Tris-HCl 50 mM (pH 8), y la mezcla de reacción contuvo NADPH 2 mM, EDTA 1 mM, acetato amónico 250 mM, y ADP 1 mM. Se disparó la reacción mediante la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato 15 mM. Se siguió la actividad enzimática durante 5 minutos como la disminución de la absorbancia debida a NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADPH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

*Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADH (Gdh)*. Se aplicó una variación del método anterior. El tampón de medida fue Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), y la mezcla de reacción contuvo NADH 2 mM, EDTA 1 mM, acetato amónico 250 mM, y ADP 1 mM. Se disparó la reacción mediante la adición de  $\alpha$ -cetoglutarato 6 mM. Se siguió la actividad enzimática durante 5 minutos como la disminución de la absorbancia debida a NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **Estudio *in silico* de las principales rutas metabólicas de *C. salexigens***

En 2005 se completó en el *Joint Genome Institute* la secuenciación del genoma de *C. salexigens* DSM 3043. El genoma tiene un tamaño de 3697 Mb y contiene 3319 marcos abiertos de lectura (ORFs) candidatos de genes codificantes de proteínas. Las anotaciones genéticas basadas en estudios automatizados de homología de los ORFs de *C. salexigens* se encuentran disponibles en el portal web del programa *Computational Biology* del *ORNL* en el *Joint Genome Institute* (<http://genome.jgi-psf.org/microbial/index.html>) (Copeland et al., 2011). Recientemente se ha publicado una reconstrucción a escala genómica del metabolismo de *C. salexigens* (Ates et al., 2011).

Para una mejor comprensión de la interacción entre metabolismo y osmoadaptación, se evaluó cierto número de rutas metabólicas presentes en esta reconstrucción metabólica, relacionadas con el metabolismo central, poniendo énfasis en aquellas rutas que llevaban a la

producción de los precursores de las ectoínas y a los metabolitos hallados en los sobrenadantes. Se llevaron a cabo (i) estudios de homología usando la información disponible en las bases de datos metabólicas (tales como MetaCyc y KEGG (Kanehisa y Goto, 2000; Caspi *et al.*, 2012)) de microorganismos relacionados (como *Pseudomonas*, Enterobacterias y bacterias halotolerantes), (ii) análisis *in silico* de los dominios proteicos conservados, localización proteica, y contexto genómico, (iii) experimentos de crecimiento con D-glucono-1,5-lactona, D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato como fuentes de carbono, y (iv) revisión de datos bibliográficos.

**Metabolismo de la glucosa: ruta de Embden-Meyerhof-Parnas y ruta de Entner-Doudoroff.** La anotación genética sugiere los sistemas de incorporación de azúcar y los mecanismos de represión por catabolito en *C. salexigens* son similares que los presentes en especies de *Pseudomonas*, aunque presentan diferencias en la jerarquía de preferencia de metabolitos (Rojo, 2010). Hay anotados varios sistemas de transporte ABC y varias posibles permeasas dependientes de la fuerza protón motriz, aunque su especificidad de sustrato es difícil de determinar basándose exclusivamente en homología de secuencia (Oren *et al.*, 2005), lo que ha impedido la asignación inequívoca del(los) transportador(es) de glucosa. *C. salexigens* carece de un buen homólogo del sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-azúcar (PTS) específico para glucosa de *E. coli*, aunque posee genes para un PTS específico de fructosa (ver más abajo). Este organismo cuenta con un gen para una glucoquinasa citoplasmática (Csal0935), que podría producir glucosa-6-fosfato a partir de la glucosa incorporada.

La ruta de Entner-Doudoroff (ED) es una alternativa para el catabolismo de azúcares hasta piruvato que emplea enzimas que no forman parte de la ruta de la glucólisis ni de la de las pentosas fosfato (PPP) (Entner y Doudoroff, 1952). La ruta de ED, que presenta un rendimiento en energía menor que el de la glucólisis, está presente en una amplia variedad de bacterias y arqueas, y existe un número limitado de microorganismos eucariotas en los que se haya demostrado la metabolización de glucosa o gluconato mediante esta ruta (Conway, 1992). Normalmente, los microorganismos que emplean la ruta de ED carecen de una o más enzimas esenciales de la glucólisis, con frecuencia la 6-fosfofructoquinasa (Seo *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009), como es el caso del género *Pseudomonas* (Lessie y Phibbs, 1984). Como ya señalaron Kornberg y Smith (Kornberg y Smith, 1970) y Romano *et al.* (Romano *et al.*, 1979), una metabolización completa de la glucosa mediante una ruta que genera solamente una molécula de fosfoenolpiruvato (PEP) por cada molécula de glucosa (como es el caso de ED o PPP), es incompatible con el uso de PTS para la incorporación de glucosa. Una producción y consumo equivalentes de PEP por estas rutas no dejaría ningún PEP disponible para

biosíntesis. Por eso, la falta de PTS específico de glucosa hace posible a *C. salexigens* emplear la ruta de ED para catabolizar este azúcar.

**Análisis bioinformático de fosfofructoquinasas (Pfk).** Los análisis de homología llevados a cabo con BLAST (Ye *et al.*, 2006), indicaron que no existe una anotación directa e inequívoca de una Pfk glucolítica en *C. salexigens* (Csonka *et al.*, 2005). *E. coli* cuenta con dos 6-fosfofructoquinasas, PfkA y PfkB, de las que la primera da cuenta del aproximadamente el 90% de la actividad (Fraenkel, 1966). En la anotación automática se han asignado cinco ORFs (*csal0274*, *0639*, *0931*, *1841* y *2647*) como posibles PfkBs en *C. salexigens*, en base a su similitud con PfkB de *E. coli*, y un sexto ORF (*csal1534*), se ha asignado a una posible 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (Pfp). Todos ellos presentan una baja similitud de secuencia con Pfk genuinas (Tabla I.S1). Para obtener información del papel que juegan estas seis proteínas, se alinearon sus secuencias de aminoácidos con las de PfkAs, PfkBs y Pfps bien caracterizadas, y se construyó un árbol filogenético (Figura I.S2). Además, se trató de detectar la actividad Pfk en extractos libres de células de *C. salexigens*, pero no fue posible la detección de una actividad superior al límite de detección (< 0,05 U/min) (Tabla I.S2).

Entre las proteínas de *C. salexigens* anotadas como Pfk, *Csal2647* es la que muestra la mayor similitud con PfkB de *E. coli* y *Salmonella* (Figura I.S2), con un “Expect value” en BLASTP de  $7e-35$ , pero tiene similitud significativa con PfkA de *E. coli* (“Expect value” en BLASTP de 0,096). Sin embargo, *Csal2647* es muy similar a la proteína fructosa-1-fosfato quinasa (FruK, EC 2.7.1.3) de *E. coli*, con un “Expect value” de  $1e-66$ . Es más, el gen *csal2647* se encuentra en un operón potencial, entre genes que codifican una enzima IIBC (*Csal2646*) y un híbrido EI/HPr/EIIA (*Csal2648*), componentes de un sistema PTS. Estas observaciones apuntan a que, sin duda, *Csal2647* fosforila la fructosa-1-fosfato formada por el sistema PTS en el metabolismo de la fructosa.

Se han observado similitudes parciales y no significativas entre PfkA o PfkB de *E. coli* y *Csal0274*, *Csal0639*, *Csal0931* y *Csal1841* (“Expect value” en BLAST >  $9e-6$ ). El gen *csal0274* está anotado en la base de datos SEED (<http://pubseed.theseed.org/seedviewer.cgi>) como 2-cetogluconato quinasa, y se encuentra en un operón potencial entre un gen que codifica un represor de la utilización del 2-cetogluconato (*csal0275*) y el de una 2-cetogluconato reductasa (*csal0273*). El gen *csal0639* se halla en un operón potencial aguas debajo de varios genes que codifican un sistema de transporte tipo ABC para un poliol (de *csal0633* a *0636*) y una sorbitol deshidrogenasa (*csal0638*). Está anotado como fructoquinasa en la base de datos SEED, así que probablemente esté implicado en el metabolismo de un poliol. El gen *csal0931* se localiza en un entorno cromosómico que incluye genes codificadores de las siguientes (posibles) enzimas de metabolismo de hexosas: transportador de gluconato (*csal0925*), gluconato quinasa

(*csal0926*), fosfoglucoisomerasa (*csal0932*), aldo/ceto reductasa (*csal0933*), aldosa 1-epimerasa (*csal0934*), glucoquinasa (*csal0935*) y 6-fosfogluconato deshidratasa (*csal0936*) (Figura I.S1B). *Csal0931* está anotada en la base de datos SEED como riboquinasa, y algunos ortólogos muy próximos de otros microorganismos están anotados como fructoquinasa. El entorno cromosómico de *csal0931* apunta a que el producto de este gen es una quinasa que fosforila a una hexosa relacionada con la glucosa o el gluconato. El gen *csal1841* está anotado en SEED también como riboquinasa, pero el entorno cromosómico en el que se encuentra no aporta pistas sobre su función.

*Csal1534* es probablemente una fructosa-bisfosfatasa. *Csal1534* muestra un 71% de identidad y 81% de similaridad con un ortólogo de *Methylococcus capsulatus* Bath, del que se ha comprobado su actividad fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (Pfp) *in vitro* (Reshetnikov *et al.*, 2008). Sin embargo, la constante de equilibrio de la reacción fructosa-1,6-bisP + Mg<sup>2+</sup> ↔ fructosa-6-P + Mg·PP es aproximadamente 170 M (a pH 8) (Bertagnolli y Cook, 1984), lo que implica que el equilibrio de hecho favorece la reacción en la dirección gluconeogénica. Además, dado que la constante de Michaelis (K<sub>m</sub>) aparente de la enzima de *M. capsulatus* para fructosa-1,6-bisfosfato es 0,33 mM, mientras que es de 2,3 mM para fructosa-6-fosfato, Reshetnikov *et al.* (Reshetnikov *et al.*, 2008) propusieron que esta enzima funciona como fructosa-bisfosfatasa durante el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas. *Propionibacterium freudenreichii* también cuenta con un ortólogo de esta enzima, aunque comparte únicamente un 40% de similaridad con *Csal1534*. El gen de esta enzima puede complementar en *E. coli* únicamente una mutación de fructosa-bisfosfatasa (*fbp*) pero no mutaciones de fosfofructoquinasa (*pfkA/B*) (Kemp y Tripathi, 1993), lo que representa una prueba firme de que la enzima puede operar *in vivo* sólo en la dirección gluconeogénica. Es más, *C. salexigens* posee dos (supuestas) pirofosfatasa inorgánicas, codificadas por los genes *csal2281* y *csal2390*, cuya acción podría dirigir la reacción aún más hacia la dirección gluconeogénica. En la medida en que el genoma de *C. salexigens* no contiene ningún otro gen que codifique de forma clara una fructosa-bisfosfatasa (Csonka *et al.*, 2005), es probable que la proteína *Csal1534* funcione como una fructosa-bisfosfatasa, más que como una fosfofructoquinasa.

**La ruta de ED en *C. salexigens*.** La combinación de estudios *in silico* y resultados bioquímicos de este trabajo sugiere que, como en el caso de *Pseudomonas* y de algunos otros géneros aerobios que emplean la ruta de ED (Lessie y Phibbs, 1984), *C. salexigens* carece de una glucólisis funcional y se apoya en la ruta de ED para el catabolismo de la glucosa (Figuras III.3 y III.S1).

Se han descrito tres variantes de la ruta de ED según el número de pasos previos a la primera fosforilación. En la ruta EDI (o ruta ED fosforilativa), se fosforilan o bien la glucosa o su producto de oxidación, gluconato. En la ruta EDII (o ruta ED no fosforilativa), la fosforilación ocurre más adelante en la ruta, a nivel de glicerato. En la ruta EDIII (o ruta ED semifosforilativa), el primer sustrato activado es el 2-ceto-3-desoxigluconato, y esta es la ruta preferida para la asimilación de la glucosa en algunas bacterias halófilas, como *Salinibacter ruber* y la mayor parte de miembros del orden de arqueas *Halobacteriaceae* (Oren, 2002; Oren y Mana, 2003). Estas tres variantes difieren en el número de pasos enzimáticos compartidos con la glucólisis y en el rendimiento energético global (Tomlinson *et al.*, 1974; Verhees *et al.*, 2003). Se ha demostrado recientemente que en *Pseudomonas putida*, pariente cercano de *C. salexigens* en términos de homología de secuencia global (Peçonek *et al.*, 2006), la oxidación de la glucosa tiene lugar a través de la variante EDI. En *P. putida*, la glucosa es oxidada por oxidasas periplásmicas a D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato, que se transportan al interior celular donde son fosforilados por quinasas específicas y catabolizados por tres rutas paralelas (del Castillo *et al.*, 2007). En base a la anotación genómica de *C. salexigens*, puede reconstruirse la variante EDI (fosforilativa) desde glucosa o D-gluconato hasta 6-fosfogluconato (Figura I.S1A), aunque estaba anotada de forma incompleta en la reconstrucción metabólica previa (Ates *et al.*, 2011) (véase Tabla I.S1). Nuestro análisis *in silico* sugiere que la oxidación de D-glucosa a D-gluconato a través del intermedio D-glucono-1,5-lactona, podría tener lugar tanto en el periplasma (catalizada por las enzimas periplásmicas quinoproteína-glucosa deshidrogenasa (Csal0170) y gluconolactonasa (Csal2779)) como en el citoplasma (catalizada por una glucosa deshidrogenasa anclada a membrana, Csal2831, y una gluconolactonasa soluble, Csal0453/Csal1727). Las tres supuestas gluconolactonasas cuentan con el dominio gluconolactonasa COG3386.

Dos proteínas con homología significativa con transportadores de gluconato de *Pseudomonas* (GntP) podrían ser responsables de la incorporación del gluconato periplásmico a través de la membrana celular. Como se ha dicho más arriba, el gen que codifica para una de estas dos proteínas (*csal0925*) se encuentra inmediatamente aguas arriba del gen *csal0926*, el cual codifica una posible gluconoquinasa (GnuK), que podría ser la responsable de la fosforilación de D-gluconato a 6-fosfogluconato (Figura I.S1B). Este hallazgo apoya la idea de que *csal0925* codifique el transportador de gluconato de alta afinidad GntP (Figura I.S1A). Nuestros datos apuntan hacia la oxidación de glucosa a gluconato en un primer paso, y un transporte posterior al citosol y activación por fosforilación, en consonancia con la acumulación temprana de gluconato hallada en el medio de cultivo (Figura I.2).

Además, habíamos predicho que el 6-fosfogluconato podría formarse también a partir de la glucosa-6-fosfato a través de la acción secuencial de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf, Csal2741) y la 6-fosfogluconolactonasa (Pgl, Csal2740). Por último, el 6-fosfogluconato podría metabolizarse a través de la variante EDI a gliceraldehído-3-fosfato más piruvato por acción de la enzima 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd, Csal0936) y 2-ceto-3-desoxi-fosfogluconato aldolasa (eda, Csal2739) (Figura I.S1A). Los genes *eda* (csal2739), *pgl* (csal2740) y *zwf* (csal2741), implicados los tres en la ruta de ED, se encuentran agrupados en el genoma de *C. salexigens* (Figura I.S1B).

En *P. putida*, el gluconato se puede oxidar en el periplasma a 2-cetogluconato, el cual es transportado al citoplasma, fosforilado y reducido a 6-fosfogluconato (del Castillo *et al.*, 2007). Como se muestra en la Figura I.S4, *C. salexigens* fue capaz de crecer en D-glucono-1,5-lactona, D-gluconato y 2-ceto-D-gluconato como únicas fuentes de carbono. El crecimiento en D-glucono-1,5-lactona concuerda con la redundancia de posibles enzimas con actividad gluconolactonasa halladas en el genoma (véase Tabla I.S1). Estos ensayos confirmaron la funcionalidad de las enzimas de la ruta de ED, así como la existencia de un “desvío” en la misma a través del 2-cetogluconato en *C. salexigens*. Sin embargo, no se encontró ningún ortólogo para la primera enzima este desvío, gluconato-2-deshidrogenasa (Gad), que es la enzima empleada por *P. putida*. Se trata de una proteína periplásmica asociada a la membrana que convierte gluconato en 2-cetogluconato. De acuerdo con nuestro análisis, esta reacción no ocurre en el periplasma de *C. salexigens*. En su lugar, encontramos un ortólogo del transportador de 2-cetogluconato de *Pseudomonas* KguT, codificado muy probablemente por *csal0137*. Las dos reacciones siguientes de la sub-ruta, que en *P. putida* están catalizadas por 2-ceto-D-gluconato quinasa (KguK) y 2-ceto-D-gluconato-6-fosfato reductasa (KguD), no estaban asignadas en la anotación genómica actual de *C. salexigens*. Sin embargo, dos observaciones apuntan a que estas dos proteínas, KguK y KguD, podrían estar de hecho presentes en *C. salexigens*. i) KguK de *P. fluorescens* posee una similaridad significativa con Csal0274, una de las cuatro proteínas anotadas en *C. salexigens* como fosfofructoquinasa (PfkB). ii) Este gen se encuentra inmediatamente aguas debajo de *csal0273*, asignado a una gluconato deshidrogenasa citoplasmática (GhrB). Csal0273 presentaba además similaridad significativa con la 2-ceto-6-fosfogluconato reductasa (KguD) de *P. putida*. Para profundizar en la función de Csal0273, se llevó a cabo un análisis filogenético que incluía esta proteína así como GhrB, KguK y KguD de especies relacionadas (Figura I.S3). El análisis reveló que *csal0273* se encuentra más próximo a 2-cet-6-fosfogluconato reductasas (v.g. *kguD* de *Pseudomonas* PAO1) que a 2-cetogluconato reductasas (v.g. *yiaE* de *E. coli*).

De acuerdo a todos estos datos, el desvío del 2-ceto-D-gluconato de EDI existiría en *C. salexigens*, aunque anotado de forma parcialmente incorrecta, y las reacciones serían principalmente citosólicas, difiriendo así de lo descrito en *P. putida* (Figura I.S1).

**Ciclo del ácido cítrico (CAT) y ciclo del glioxilato.** La anotación genética indica que todas las enzimas del CAT y del ciclo del glioxilato están bien conservadas en *C. salexigens*, excepto malato deshidrogenasa (Mdh). Existen dos ORFs (*csal1751* y *csal1771*) asignados a malato deshidrogenasas. *csal1751* tiene una asignación laxa como miembro de la familia de malato/L-lactato deshidrogenasas, aunque ambos ORFs presentan alta homología con proteínas de esta familia de enzimas en *H. elongata* y en el género *Pseudomonas*. Sin embargo, no se hallaron secuencias en *C. salexigens* con homología con Mdhs relacionadas con el CAT. Por otro lado, una posible malato-quinona oxidorreductasa (Mqo) con alta similaridad a secuencias de Mqo de *E. coli* y *Pseudomonas* existe en el genoma de *C. salexigens* (Tabla I.S1). Por tanto, esta es probablemente la única enzima que cataliza la conversión de malato a oxalacetato en esta especie, como sucede en el caso de *C. glutamicum* (van der Rest *et al.*, 2000) (Figura I.3). Una de las principales razones por la que algunos organismos emplean Mqo para la oxidación de malato, podría ser que la oxidación por una Mdh dependiente de  $\text{NAD}^+$  presenta una diferencia de energía libre estándar muy desfavorable (+28,5 KJ/mol). En cambio, la oxidación de malato por una quinona sí presenta una diferencia favorable (-18,5 KJ/mol, con menaquinina como aceptor de electrones) (Kather *et al.*, 2000).

*C. salexigens* posee dos genes para isocitrato deshidrogenasas (*csal0525* y *csal1434*), que difieren en la especificidad de cofactor predicha. Según nuestros ensayos en extractos libres de células (Tabla I.3), parece probable que la isoforma activa en el CAT sea la Icdh dependiente de  $\text{NADP}^+$  (Figura I.3), al menos en las condiciones probadas. El papel de la segunda isoforma aún no se comprende bien. Otras bacterias relacionadas, como *E. coli*, *Pseudomonas*, *H. elongata* y *H. chejuensis*, poseen únicamente la isoenzima dependiente de  $\text{NADP}^+$ . La enzima Icdh- $\text{NADP}^+$  de *C. salexigens* presenta similaridad importante con ortólogos de los géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas*, mientras que la similaridad con la correspondiente isoenzima de *E. coli* es mucho menor. La isoforma dependiente de  $\text{NAD}^+$  tiene homología significativa con proteínas Icdh de especies de los géneros *Xanthomonas* y *Bacillus*.

**Anaplerosis.** Existen dos enzimas que pueden convertir los compuestos de 3 átomos de carbono producidos en las rutas EMP y ED en oxalacetato: fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc) y piruvato carboxilasa (Pc) (Sauer y Eikmanns, 2005). Existe anotado un buen ortólogo para Ppc, *Csal1640*, aunque según nuestros datos bioquímicos (ensayos de actividad enzimática en extractos proteicos y datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN), no es importante en la producción de oxalacetato durante el crecimiento en glucosa. No existe en *C. salexigens* ningún marco abierto de lectura

asignado como piruvato descarboxilasa en la anotación del JGI, pero los análisis realizados con BLASTP indicaron que Csal1555 (anotada como “carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding”) y Csal1556 (anotada como “oxaloacetate decarboxylase alpha subunit”) son ortólogos excelentes de las subunidades A y B de una Pc citoplasmática de especies de *Pseudomonas*.

La asignación de Pc resulta complicada debido a la presencia de una supuesta oxalacetato descarboxilasa, cuya subunidad a (Csal0693) muestra una similaridad de secuencia alta con Csal1556. Sin embargo, las tres subunidades de la oxalacetato descarboxilasa de *C. salexigens*, Csal0692, 0693 y 0694 son muy similares a las subunidades ortólogas de una oxalacetato descarboxilasa ligada a membrana que bombea Na<sup>+</sup>, de *Klebsiella pneumoniae*. Con toda probabilidad, por tanto, la función del complejo Csal0692, 0693 y 0694 en *C. salexigens* es la de producir piruvato a partir de oxalacetato.

**Gluconeogénesis.** *C. salexigens* es capaz de crecer en cierto número de fuentes de carbono gluconeogénicas, incluyendo glicerol y varios intermediarios del CAT (Csonka *et al.*, 2005). Este organismo posee un posible enzima málico Csal0605) y una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Csal2657), que podrían ser responsables de la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato y de la descarboxilación dependiente de ATP de oxalacetato a fosfoenolpiruvato, respectivamente. *C. salexigens* posee además una posible fosfoenolpiruvato sintasa (Csal2062) para la fosforilación de piruvato a fosfoenolpiruvato. Por último, por las razones discutidas más arriba, la proteína Csal1534 funciona probablemente en modo gluconeogénico (de fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato), lo que completa el conjunto de enzimas necesarias para la gluconeogénesis.

**Metabolismo de acetato y lactato.** El metabolismo del acetato en *C. salexigens* es diferente del de *Pseudomonas* y *E. coli*. Las dos rutas principales de producción de acetato en *E. coli* son las rutas fosfotransacetilasa-acetato quinasa (Pta-Ack) y piruvato oxidasa (PoxB). Las enzimas Pta y Ack, que en *E. coli* están presentes en niveles altos de forma constitutiva (Wanner *et al.*, 1992), catalizan la interconversión reversible del acetyl coenzima A y el acetato, y son responsables del “overflow” (metabolismo rebosadero) del acetato durante el crecimiento aeróbico de *E. coli* en glucosa (Xu *et al.*, 1999; Castaño-Cerezo *et al.*, 2009). Estas enzimas no están presentes en *C. salexigens*, aunque hay que destacar que sí lo están en bacterias filogenéticamente relacionadas, como *H. elongata* y *H. chejuensis* y algunas especies de *Pseudomonas* (Kretschmar *et al.*, 2001).

La proteína Csal1010 presenta similaridad significativa con PoxB de *E. coli* (“Expect value” en BLASTP de 3e-160). Esta última es una proteína soluble asociada a la membrana externa encargada de la oxidación asociada a FAD del piruvato a acetato más CO<sub>2</sub> (Russell

*et al.*, 1977). En vista a la elevada similaridad con PoxB de *E. coli*, Csal1010 podría catalizar la misma reacción en *C. salexigens*.

En *C. salexigens* existe un ortólogo de la acetil coenzima A sintetasa (con AMP como coproducto) (Acs), la principal enzima para la recuperación del acetato del medio de crecimiento (Starai y Escalante-Semerena, 2004): Csal0865. También cuenta con otros tres ORFs con homología con secuencias de Acs de *E. coli*, *P. putida*, *P. aeruginosa* y *H. elongata*, aunque la similaridad con estas últimas proteínas es menor que la que ostenta Csal0865. Existen dos genes que codifican supuestas permeasas de acetato (ActP) *csal0871* y *csal2927*, que podrían ser responsables de la incorporación del acetato extracelular (Tabla I.S1).

Con respecto al metabolismo del lactato, el genoma de *C. salexigens* cuenta con lactato deshidrogenasas anotadas específicas tanto del isómero L (Csal0404) como del D (Csal3144). Sin embargo, Csal0404 parece ser una proteína respiratoria, dejando Csal3144 como el candidato más probable para convertir en lactato.

**Metabolismo del nitrógeno.** Dado que las ectoínas son compuestos nitrogenados, analizamos algunas enzimas clave implicadas en la asimilación del nitrógeno como amonio, así como en la síntesis de aminoácidos y ectoínas. En el genoma de *C. salexigens* hay anotadas una alanina aminotransferasa (AlaT, Csal1348), una L-alanina deshidrogenasa (Csal2966) y una glutamato sintasa (NADPH-Gogat, formada por dos subunidades, Csal0615 y Csal0616). La glutamato deshidrogenasa (Gdh) junto con NADPH-Gogat llevaría a cabo la transferencia reductiva del amonio al 2-cetoglutarato para generar glutamato (Sakamoto *et al.*, 1975; Goss *et al.*, 2001), molécula que actúa como portadora de amonio en la célula. Aunque sólo se ha asignado Gdh dependiente de NADH a una proteína de *C. salexigens* (Csal1340), hemos visto que en sus extractos proteicos existían las dos actividades Gdh, tanto con requerimiento de NADPH como de NADH (Tabla I.3). Csal1340 presenta una similaridad elevada con enzimas Gdh dependientes de NADH de *H. elongata*, *H. chejuensis* y especies de los géneros *Pseudomonas* y *Legionella*. Por otro lado, *E. coli* cuenta únicamente con una Gdh dependiente de NADPH, que no mostró homología significativa con ninguna proteína del genoma de *C. salexigens*.

La aspartato aminotransferasa, (AspAT), que cataliza la transferencia reversible del grupo amino del glutamato al oxalacetato, produciendo aspartato y 2-cetoglutarato, es una enzima clave en *C. salexigens*. Esta enzima conecta el CAT con la primera enzima de la ruta de síntesis de ectoínas (la aspartoquinasa). La proteína Csal0536 de *C. salexigens* tiene alta similaridad con AspATs de *H. elongata* y *Pseudomonas*, mientras que la proteína AspC de *E. coli* es prácticamente idéntica a una aminotransferasa de aminoácidos aromáticos de *C. salexigens* (Csal1320), anotada previamente como aspartato transaminasa (Tabla I.S1). Se ha visto que AspC de *E. coli* presenta una especificidad de sustrato amplia, ya que es capaz también de

transaminar otros cetoácidos, como el fenilpiruvato, el 4-hidroxifenilpiruvato y compuestos relacionados (Powell y Morrison, 1978). No queda claro, por tanto, que la transaminación del oxalacetato pueda estar catalizada por una o por dos enzimas en *C. salexigens*, y si una de ellas podría jugar un papel específico en la ruta de síntesis de ectoínas.

Las aspartoquinazas (Ask) catalizan la activación de aspartato a aspartil-fosfato, el cual es el primer intermedio de la síntesis de varios aminoácidos derivados del aspartato (treonina, metionina, lisina e isoleucina) y de ectoínas. Existen múltiples isoenzimas de Ask en *E. coli* y en muchos otros microorganismos, teniendo cada una de ellas un papel particular en cada una de las rutas de síntesis de cada aminoácido y se inhiben alostéricamente por uno o más productos finales de cada ruta (Stadtman *et al.*, 1961). Sorprendentemente, *C. salexigens* cuenta únicamente con una aspartoquinasa (Ask, Csal0626), codificada por un gen que queda lejos del operón *ectABC* en el genoma, aunque en muchas otras bacterias productoras de ectoínas el gen *ask* sí forme parte de este operón (Vargas *et al.*, 2008). Este hecho sugiere que la Ask de *C. salexigens*, única y no especializada, debe ser imprescindible para la síntesis de varios aminoácidos y de ectoínas. La cuestión de la regulación por retroalimentación de esta enzima por sus diferentes productos finales aún no ha sido abordada.

### **Estudios filogenéticos**

Se dedujo la historia evolutiva de ciertas proteínas de *C. salexigens* empleando el método “Neighbour-Joining”. Se muestran los árboles filogenéticos óptimos. El porcentaje de réplicas de árboles en los que los taxones asociados aparecen agrupados (de entre 1000 réplicas) se muestra al lado de cada rama. El árbol está representado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas empleadas para deducir el árbol. Se calcularon las distancias evolutivas usando el método de la corrección de Poisson y sus unidades vienen dadas por el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. La tasas de variación entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 1). Los análisis implicaron 14 (Figura I.S2) y 15 (Figura I.S3) secuencias de aminoácidos, respectivamente. Se descartaron las posiciones con menos de un 95% de cobertura. Es decir, se permitió un máximo de un 5% de huecos en el alineamiento, datos faltantes y bases ambiguas en cada posición. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

### **Seguimiento del marcaje isotópico desde glucosa hasta ectoínas**

Para poder determinar la distribución de flujos metabólicos del metabolismo central, se realizó un seguimiento de las rutas de síntesis de ectoínas a partir de [1-<sup>13</sup>C]-, [6-<sup>13</sup>C]- y [2-<sup>13</sup>C]-glucosa, tanto a alta como a baja salinidad. Se hizo una predicción de todos los isotopómeros posibles derivados de estos precursores marcados, a través de las rutas de EMP, ED, anaplerosis, CAT hasta piruvato, fosfoenolpiruvato (PEP), oxalacetato (AOA), acetil coenzima A y ectoínas, basándose en el genoma anotado (Figura I.S5 y Tablas III.S3-S4).

**Predicción de distribuciones de isótopos.** Aunque las rutas metabólicas no se ven alteradas al usar diferentes isotopómeros de glucosa como fuentes de carbono, existen claras diferencias en los espectros de RMN de los intermedios metabólicos y los productos finales del metabolismo, hecho que puede usarse para deducir las distribuciones de flujos metabólicos (Klapa *et al.*, 1999).

Con el fin de poder interpretar los espectros de <sup>13</sup>C-RMN de las ectoínas marcadas, se hizo una predicción de todos los isotopómeros de ectoínas que teóricamente podrían surgir del metabolismo de [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]-glucosa.

Dicha predicción se realizó partiendo de las siguientes asunciones:

1. La glucosa puede dar lugar a piruvato/fosfoenolpiruvato por medio de la ruta de EMP o bien de ED.
2. En presencia de un exceso de glucosa, no se produce la conversión gluconeogénica de piruvato en fosfoenolpiruvato.
3. El piruvato puede transformarse en acetil-CoA por acción de piruvato deshidrogenasa (Pdh), y en AOA por piruvato carboxilasa (Pc), y el fosfoenolpiruvato puede transformarse en AOA por acción de fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc). Se puede considerar la suma de las actividades Pc y Ppc como flujo anaplerótico total.
4. El AOA sintetizado por las reacciones anapleróticas puede ingresar en el CAT (indicado como Pc/Ppc + CAT) para volver a originar AOA. La biosíntesis de ectoínas se alimenta de las reservas celulares de AOA originado por las rutas explicadas.
5. El acetil-CoA puede actuar como sustrato tanto de citrato sintasa (Cs, CAT), como de L-diaminobutirato acetil transferasa (EctA, biosíntesis de ectoínas).
6. Se ha considerado únicamente una única vuelta del CAT. Aunque esta es una aproximación gruesa, i) la alta actividad AspAT detectada (Tabla I.3) apoya esta asunción, dado que retira una parte sustancial del AOA para síntesis de ectoínas y ii) tras una segunda vuelta al CAT, el patrón global de marcaje de los isotopómeros

originados a partir de [2-<sup>13</sup>C]-glucosa es el mismo y la abundancia relativa de marca en cada posición del esqueleto carbonado no cambia de forma significativa.

7. La marca presente en AOA no se dispersa en el CAT a nivel de la molécula simétrica de succinato (es decir, se asume que la reacción que convierte succinato en fumarato no actúa de forma reversible *de facto*). Esta asunción se basa en la ausencia de malato deshidrogenasa (Mdh), que cataliza una reacción con  $\Delta G^0 > 0$ , favoreciendo la reversión del flujo hacia succinato. *C. salexigens* posee la enzima malato-quinona oxidorreductasa (Mqo) que cataliza una reacción termodinámicamente irreversible ( $\Delta G^0 < 0$ ) (ver sección *Ciclo del ácido cítrico (CAT) y ciclo del glioxilato*). Por tanto, a diferencia de lo que ocurre en los microorganismos que cuentan con Mdh, el AOA en este caso no se encontraría en un equilibrio rápido con malato, fumarato y succinato, evitando así la dispersión de la marca debida a la simetría de las dos últimas moléculas. El patrón de marcaje observado en los espectros de ectoínas procedentes de [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]-glucosa (ver Figuras III.4, 5 y 6) concuerda con esta asunción, lo que permitió descartar una distribución simétrica de la marca en los isotopómeros de AOA.

Cada “isotopómero de ectoína” representado en la Tabla I.S4 es una representación del marcaje promedio esperado de un conjunto determinado de isotopómeros. Las probabilidades globales relativas de marcaje se calcularon para cada distribución de isotopómeros predicha para cada una de las seis rutas metabólicas extremas considerada, y para cada uno de los isotopómeros de glucosa usado: [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]-glucosa.

**Marcaje de las ectoínas en cultivos crecidos en [1-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa.** La metabolización de la glucosa a través de EMP produce un 50% de [3-<sup>13</sup>C]-piruvato/PEP, mientras que la ruta de ED produce por un lado [1-<sup>13</sup>C]-piruvato y por otro PEP no marcado (asumiendo que no existe conversión de piruvato a PEP) (Figura I.S5). En las siguientes reacciones de la ruta de ED el PEP no marcado daría lugar a piruvato no marcado, siendo el balance final de la ruta para el piruvato de un 50% marcado en C1 y un 50% sin marcaje. Esta diferencia entre las rutas de EMP y de ED hace que el análisis del marcaje de las ectoínas permita estimar la razón de flujos EMP/ED.

En las células crecidas en [1-<sup>13</sup>C]-glucosa, las posiciones con mayor porcentaje de marcaje en las moléculas de ectoína fueron COOH y C6, independientemente de la concentración de sal, y el marcaje en el resto de carbonos fue cercano a la abundancia natural del isótopo <sup>13</sup>C (Figura I.4). La ruta de ED podría justificar en este caso el marcaje hallado en la

posición COOH. Sin embargo, esta ruta por sí misma no puede explicar el nivel de marcaje en la posición C6. Se podría justificar la marca en esa posición postulando que el  $^{13}\text{CO}_2$  generado por la descarboxilación del [1- $^{13}\text{C}$ ]-piruvato, se reincorpora de forma eficiente por la carboxilación mediante Pc o Ppc. La fijación de  $^{13}\text{CO}_2$  a este nivel produciría una mezcla de [1- $^{13}\text{C}$ ]-, [4- $^{13}\text{C}$ ]- y [1,4- $^{13}\text{C}_2$ ]-AOA, explicando el marcaje observado en las ectoínas. El nivel concreto de enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en la posición COOH permitió estimar que el 95% de la glucosa de la que proviene el carbono de las ectoínas se metaboliza a través de la ruta de ED y de Pc. El enriquecimiento hallado en el resto de posiciones, mucho menor, podría explicarse por una dispersión de la marca entre el resto de posiciones de la molécula de ectoína por rutas como la de las pentosas fosfato. Además, la existencia de una glicolisis funcional, aunque minoritaria, no puede descartarse completamente.

Para poder confirmar que el catabolismo de la glucosa ocurre a través de la ruta de ED, se analizó el perfil de enriquecimiento de las ectoínas a partir de [6- $^{13}\text{C}$ ]-glucosa. En este caso, los espectros obtenidos fueron complementarios a los obtenidos con [1- $^{13}\text{C}$ ]-glucosa, lo que demuestra, al contrario de lo previsto para la ruta de EMP, que los destinos de los carbonos C1 y C6 de la glucosa no son equivalentes, es decir, que el catabolismo de glucosa en este caso tenía lugar a través de metabolitos marcados de forma asimétrica (Figura I.S6). Además, la incorporación de la marca en el glicerol presente en la bicapa de fosfolípidos de la membrana a partir de [6- $^{13}\text{C}$ ]-glucosa (pero no de [1- $^{13}\text{C}$ ]-glucosa) (Figuras III.S7-S8), también concordaban con el marcaje observado en las ectoínas. Por tanto, todos estos datos demuestran que *C. salexigens* metaboliza glucosa a través de la ruta de ED, y esto, junto con la posible carencia de una enzima Pfk, sugiere que la ruta de EMP no es funcional.

Una vez demostrada verosimilitud de asumir que *C. salexigens* metaboliza el 95% de la glucosa a través de la ruta de ED, es posible extraer nuevas consecuencias partiendo de dicha asunción. Como se ha explicado más arriba, el metabolismo de [1- $^{13}\text{C}$ ]-glucosa a través de ED produce por una lado [1- $^{13}\text{C}$ ]-piruvato, y por otro un 100% del PEP no marcado. Si Pc es la principal ruta para la incorporación de  $\text{CO}_2$  a AOA, la marca en C1 del piruvato se traduciría en marca en C1 del AOA, y en última instancia daría lugar a la presencia de marca en el grupo COOH de las ectoínas (Figura I.4). Dado que el C1 del piruvato, por otro lado, se pierde en forma de  $\text{CO}_2$  marcado en la reacción de Pdh, es de esperar que el acetyl-CoA formado a partir de [1- $^{13}\text{C}$ ]-piruvato (que no tendría marca) no contribuya al marcaje de las ectoínas. Sin embargo, el PEP formado a partir de [1- $^{13}\text{C}$ ]-glucosa a través de ED no lleva marca, con lo que una anaplerosis que transcurriera exclusivamente mediante Ppc daría lugar a ectoínas no marcadas. Por tanto, la eficiencia de la incorporación la marca en el grupo carboxílico de las

ectoínas puede emplearse para estimar las contribuciones relativas de las actividades Pc y Ppc a la anaplerosis total.

**Marcaje de las ectoínas en cultivos crecidos en [2-<sup>13</sup>C]glucosa.** Partiendo de [2-<sup>13</sup>C]-glucosa como fuente de carbono, el metabolismo a través de la ruta de EMP produciría un 50% de [2-<sup>13</sup>C]-PEP, y en el siguiente paso de la ruta, un 50% de [2-<sup>13</sup>C]-piruvato. El metabolismo a partir de la ruta de ED generaría también un 50% de [2-<sup>13</sup>C]-piruvato, pero el 100% del PEP quedaría sin marcar (Figura I.S5). Por tanto, es posible analizar el destino del [2-<sup>13</sup>C]-piruvato sin hacer ninguna asunción adicional (Figura I.5). Las posibles rutas para la síntesis de AOA a partir de piruvato/PEP son las siguientes: i) Los carbonos del piruvato pueden ingresar en el CAT como acetil coenzima A, producido éste por la piruvato deshidrogenasa (Pdh), produciendo AOA tras una vuelta al ciclo (Figura I.5A), ii) el piruvato y el PEP pueden sufrir carboxilación para dar AOA por la acción de Pc o Ppc, respectivamente (Figura I.5B), o iii) una combinación de ambas rutas (Figura I.5C). A partir del alto porcentaje de marcaje en la posición C4 de las ectoínas a partir de [2-<sup>13</sup>C]-glucosa (Figura I.5) puede concluirse que la contribución de Ppc a la actividad anaplerótica total en la célula es despreciable. Esto estaría de acuerdo con las actividades enzimáticas medidas (Tabla I.3).

De entre estas tres opciones, la ruta que transcurre a través de Pc convierte [2-<sup>13</sup>C]-piruvato en [2-<sup>13</sup>C]-AOA, lo que se refleja en las ectoínas en forma de la presencia del isótopo [4-<sup>13</sup>C]-ectoína. En la ruta que transcurre a través de Pdh, un 50% de [2-<sup>13</sup>C]-piruvato da lugar a un 50% de [1-<sup>13</sup>C]-acetil-CoA, que a su vez ingresa en el CAT para dar AOA no marcado (a partir de ese 50 % de acetil-CoA no marcado), o AOA marcado en C1 o en C4 (a partir de [1-<sup>13</sup>C]-acetil-CoA), ambos isótopos con la misma probabilidad (Figuras III.5 y III.S5). Partiendo de [2-<sup>13</sup>C]-glucosa, las sucesivas vueltas al CAT no darían lugar a la aparición de ningún isótopo de AOA diferente a los citados. Las marcas en C1 y C4 del AOA contribuirían a las marcas en el grupo COOH y C6 de las ectoínas, respectivamente. Además, el [1-<sup>13</sup>C]-acetil-CoA producido por Pdh se incorporaría a las ectoínas en la posición C2 (Figuras III.5A-5C). En la Tabla I.S4 se recogen todas las posibilidades previstas para el destino de la marca de [2-<sup>13</sup>C]-glucosa en las moléculas de ectoínas.

En resumen, la marca en C6 y el grupo COOH de las ectoínas es proporcional al flujo a través de Pdh, mientras que la marca en C4 es proporcional al flujo a través de Pc. La marca en C2 es el resultado de la incorporación a la molécula de ectoína por acción de la actividad de EctA del acetil-CoA producido por Pdh. Ninguna de estas combinaciones de rutas predice la aparición de marca en el grupo metilo de las ectoínas. Estas predicciones concuerdan bastante

bien con los espectros obtenidos, en los que la señal proveniente del grupo metilo es la menos intensa, siendo las más intensas las correspondientes a las posiciones C2 y C4 (Figura I.5E).

### **Experimentos de marcaje con $^{13}\text{C}$ -glucosa: marcaje de los glicerofosfolípidos de membrana**

Con el fin de aportar más pruebas de la metabolización de la glucosa mediante la ruta de ED por *C. salexigens*, se analizó la distribución de la marca de  $^{13}\text{C}$  en los glicerofosfolípidos de membrana en cultivos crecidos en  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ - y  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa. Se extrajeron los lípidos con cloroformo deuterado, y se registraron los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de estos extractos (Figuras III.S7-S8).

En un organismo que emplee mayoritariamente la ruta de ED, al crecer en  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa, el 100% del gliceraldehído-3-fosfato producido por dicha ruta debe presentar marca en C3, mientras que al crecer en  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa, no se espera marca en ninguna posición de esta molécula (Figura I.S5). Una situación paralela se esperaría para las moléculas de glicerol-fosfato, que se deriva del gliceraldehído-3-fosfato vía dihidroxiacetona-fosfato. Nosotros encontramos que el glicerol presente en los fosfolípidos producidos a partir de  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa estaba marcado en las posiciones C1 y C3 en proporciones similares, mientras que el procedente de  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa no presentaba un nivel de marcaje apreciable en ninguna posición (Figura I.S8) (La marca en la posición C1 del glicerol procedente de  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa no se esperaba teniendo en cuenta las rutas del metabolismo centrar consideradas, pero puede explicarse si tenemos en cuenta la dispersión de la marca entre las posiciones C1 y C3 debido al equilibrio de hidrólisis/fosforilación del glicerol-fosfato).

En resumen, el patrón de marcaje observado en estos experimentos también apoya que *C. salexigens* usa la ruta de ED para la oxidación de la glucosa.

### **Comparación de las actividades enzimáticas determinadas *in vitro* y de los flujos *in vivo***

Las actividades enzimáticas determinadas *in vitro* pueden considerarse una aproximación válida para la estimación de los flujos metabólicos *in vivo*. Se trata de una aproximación burda, dado que las concentraciones de enzimas, metabolitos y cofactores podrían diferir *in vivo* e *in vitro*, y por tanto, las velocidades reales *in vivo* pueden ser estimadas de forma incorrecta (van Eunen *et al.*, 2010). Generalmente se reconoce que estas actividades medidas exceden los flujos *in vivo*, lo que implica que el control de las rutas metabólicas se debe principalmente a la disponibilidad de los metabolitos y cofactores implicados.

Con el fin de comprobar si las actividades enzimáticas medidas en este trabajo son suficientes para asegurar los flujos *in vivo* a través de las principales rutas de *C. salexigens*, se compararon las actividades con los flujos metabólicos. Las velocidades de consumo de glucosa y de amonio se consideran como los flujos globales de carbono y nitrógeno del entorno a las células.

Se ha considerado a las actividades citrato sintasa (Cs) y glutamato deshidrogenasa (Gdh) como representativas de los flujos de carbono y nitrógeno, respectivamente. La actividad citrato sintasa puede dar una idea del flujo a través del CAT. La glucosa se metaboliza hasta piruvato (principalmente a través de la ruta de ED) y acetyl-CoA. Una fracción significativa del flujo total del carbono se desvía hacia el metabolismo *overflow* (principalmente piruvato, pero también acetato y lactato) y hacia la síntesis de ectoínas vía AOA. De esta forma, la velocidad de consumo de glucosa debería ser mayor que el flujo máximo a través de Cs, especialmente bajo las condiciones en las que el metabolismo *overflow* es más activo (v. g. condiciones de baja salinidad).

A pesar de las alteraciones significativas en la velocidad de consumo de glucosa en las diferentes salinidades, la actividad Cs no mostró cambios importantes. A baja salinidad (NaCl 0,6 y 0,75 M), el flujo máximo a través de Cs fue entre 11 y 27 veces menor que la velocidad de consumo de glucosa, mientras que a alta salinidad (NaCl 2,5 M), el flujo a través de CS fue sólo 5 veces menor (Tabla I.S3). Este hecho concuerda con los cambios asociados con la salinidad observados en el metabolismo *overflow* (Figura I.2), indicando que una expresión reducida de las enzimas del CAT puede ser parcialmente responsable de este fenómeno.

Es posible extraer una conclusión similar en el caso de la comparación de la actividad Gdh con la velocidad de consumo de amonio. La actividad Gdh fue prácticamente constante en todas las condiciones probadas, mientras que la velocidad de consumo de amonio resultó superior que el flujo total de Gdh en todas las salinidades, indicando que algunas reacciones que incorporan amonio (v.g. glutamina sintetasa o glutamato sintasa) contribuyen a la asimilación total en estas condiciones.

Además, la comparación de las actividades Pc y Ppc con la velocidad total de producción de ectoínas indica que el flujo anaplerótico máximo teórico no se ve afectado de forma significativa por la salinidad, a pesar del diferente nivel de demanda para síntesis de ectoínas. Es posible correlacionar también este hecho con el fenómeno del metabolismo *overflow*, dado que el "exceso" de carbono provisto por la anaplerosis podría ser parcialmente dirigido hacia la excreción de piruvato y acetato, cuando los requerimientos de ectoínas son bajos.

#### **Determinación de flujos metabólicos relativos**

Para estimar las razones de flujo en nodos metabólicos clave del metabolismo central de *C. salexigens*, se hizo uso de los patrones de marcaje de las ectoínas a partir [2-<sup>13</sup>C]-glucosa, según el procedimiento explicado en la sección anterior, y se aplicaron además ecuaciones de balance de masa derivadas de los flujos implicados en cada uno de los nodos. Estas ecuaciones se basan en las siguientes asunciones:

1. No se produce reciclado de la marca isotópica a causa de la presencia de ciclos fútiles.
2. No existe compartimentalización de metabolitos (v.g. fenómenos de canalización de metabolitos) y existe una reserva homogénea para cada metabolito que es común en todos los casos a todas las rutas consideradas.
3. No se produce dispersión de la marca isotópica a causa del funcionamiento de la ruta de las pentosas fosfato (esta ruta daría lugar a marcaje en todas las posiciones de la molécula de ectoína, pero a partir de los espectros registrados, se pudo estimar que la ruta de PPP contribuye con menos de un 5% al flujo total de glucosa a ectoínas, y por tanto, se ha desestimado su efecto para el resto de análisis).
4. Se alcanzan los estados estacionarios metabólico e isotópico.
5. La dilución isotópica que impone la presencia de una reserva preexistente en la célula de intermedios no marcados es despreciable.
6. La capacidad de discriminación de isótopos de las enzimas implicadas es nula.

Con [2-<sup>13</sup>C]-glucosa como fuente de carbono, la ruta de ED da lugar a una reserva homogénea de 50% de [2-<sup>13</sup>C]-piruvato y de PEP no marcado. De esta forma, el patrón de marcaje de las ectoínas daría información del destino metabólico de PEP y piruvato. Se han tenido en cuenta los isotopómeros predichos que se generarían por la combinación de la acción de rutas que parten de 50% de [2-<sup>13</sup>C]-piruvato y 50% de [1-<sup>13</sup>C]-acetil-CoA.

La contribución de la actividad Ppc al flujo anaplerótico total puede ser despreciada (ver explicación más adelante).

Se han tenido en cuenta tres posibles vías de producción de ectoínas a partir de piruvato:

1. Descarboxilación del [2-<sup>13</sup>C]-piruvato a [1-<sup>13</sup>C]-acetil-CoA (por Pdh), seguida por su incorporación al CAT, rindiendo [1-<sup>13</sup>C]- y [4-<sup>13</sup>C]-AOA tras una vuelta al ciclo (Figura I.5A). En este caso, la marca se repartiría entre el carbono del grupo COOH y C6 de las ectoínas. Además, la actividad EctA incorporaría marca en C2. Así, con esta ruta, se formarían ectoínas marcadas en C2, C6 y COOH en una proporción 2:1:1.
2. Carboxilación directa del [2-<sup>13</sup>C]-piruvato para producir [2-<sup>13</sup>C]-AOA (Pc), y su posterior transaminación a [2-<sup>13</sup>C]-aspartato (por AspAT) para la síntesis de ectoínas

(Figura I.5B). Las ectoínas así producidas presentarían marca en C4 y C2 (siendo esta última debida a la incorporación de [1-<sup>13</sup>C]-acetil-CoA en la molécula de ectoína por EctA). Así, mediante esta ruta, se sintetizarían ectoínas marcadas en C2 y C4 en proporción 1:1.

3. Ingreso en el CAT de las moléculas de AOA producidas por las rutas anapleróticas (Figura I.5C). Como en el caso anterior, se consideró únicamente una vuelta al CAT, dado que no se esperaba una mayor dispersión de la marca en vueltas posteriores. Como resultado de esta ruta, la marca de <sup>13</sup>C se dispersaría más que en los casos anteriores, previéndose un patrón de marcaje en las ectoínas en C2, C4, C5, C6 y COOH en proporción 2:1:1:1:1.

La carboxilación del PEP no marcado por Ppc, produciría AOA no marcado, y posteriormente a ectoínas marcadas únicamente en C2 (proveniente del C1 del acetil-CoA). Sin embargo, hemos explicado que puede asumirse despreciable la contribución de Ppc al flujo anaplerótico, y además las áreas de las señales de C4 y C5 de ectoínas (relacionadas directamente con la actividad Pc) representan el  $97 \pm 14\%$  del área de la señal correspondiente a C2 (relacionada con la actividad EctA). Esto estaría de acuerdo con las actividades enzimáticas medidas (Tabla I.3).

El marcaje en las posiciones COOH y C6 debería ser aproximadamente equivalente en cualquiera de las tres posibilidades explicadas más arriba, y directamente proporcional al flujo a través del CAT. Teniendo en cuenta esto, se definió una proporción de marcaje promedio para estas dos posiciones: [Av(C6,COOH)]. Por otro lado, el marcaje en C4 y C5 es proporcional al flujo a través de Pc. La única posición de la que no se espera un marcaje mayor al de la abundancia natural en ninguno de los tres casos explicados es el carbono del grupo metilo. Aunque se encontró un marcaje significativo en dicha posición, debe destacarse que esta posición presenta el marcaje relativo menor de todos los carbonos de la molécula de ectoína, y muy ligeramente superior al esperable de la abundancia natural de <sup>13</sup>C (1,11%). Como se explica más arriba, esa ligera diferencia permitió estimar que la ruta de las pentosas-fosfato y otras rutas dispersadoras del marcaje contribuyen con menos del 5% al flujo total de glucosa a ectoínas. Por todo ello, no se tuvo en cuenta el marcaje en el grupo metilo de las ectoínas para la estimación de las razones de flujos.

A partir de todo lo explicado, se dedujeron las siguientes ecuaciones para estimar las razones de flujos  $P_c/P_{dh}$ ,  $C_s/EctA$  y  $P_c/C_s$  (flujos relativos):

$$[1] \quad \frac{P_c}{P_{dh}} = \frac{C_4 + C_5}{C_2 + 2 \cdot Av(C_6, COOH)}$$

$$[2] \quad \frac{C_s}{EctA} = \frac{2 \cdot Av(C_6, COOH)}{C_2}$$

$$[3] \quad \frac{P_c}{C_s} = \frac{C_4 + C_5}{2 \cdot Av(C_6, COOH)}$$

Donde:

$P_{dh}$ ,  $P_c$ ,  $C_s$  y  $EctA$  representan los flujos absolutos a través de piruvato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa, citrato sintasa y L-diaminobutirato acetil transferasa, respectivamente.

$C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$  y  $COOH$  son los valores de las áreas de los respectivos picos en los espectros de  $^{13}C$ -RMN.  $Av(C_6, COOH)$  representa el promedio del área de esos dos picos.

Aplicando las ecuaciones [1], [2] y [3] a las áreas de los picos de los espectros de la Figura I.5E pueden determinarse los flujos relativos (Tabla I.4). Para los cultivos crecidos en M63 con NaCl 0,75 M, los flujos relativos se estimaron a partir del marcaje de la ectoína (ya que no se detectó en las muestras o razón señal/ruido era demasiado baja). Para los cultivos crecidos en NaCl 2,5 M, los flujos relativos se estimaron usando los patrones de marcaje tanto de ectoína como de hidroxietoína.

## TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla I.S1:** Análisis genómico de los genes de *C. salexigens* implicados en el metabolismo central, organizado por rutas.

Enzimas	Especificidad de cofactor	Detección experimental	Código E.C.	Gen	Asignación previa (Ates et al., 2011)	Topología
<b>Rutas de Embden-Meyerhof-Parnas y de Entner-Doudoroff</b>						
Glucoquinasa (Gik)	ATP	ND	2.7.1.2	Csal0935 (YP_572991)	Glucoquinasa	Citoplasmática
Piruvato quinasa (Pyk)	ATP	ND	2.7.1.40	Csal1559 (YP_573611)	Piruvato quinasa	Citoplasmática
Glucosa deshidrogenasa (soluble) (Gcd)	NAD(P)H	ND	1.1.1.47	Sin correspondencia clara con ningún ORF		
Glucosa deshidrogenasa (quinoproteína) (Gdhq)	Quinona	ND	1.1.5.2	Csal0170 (YP_572233)	Glucosa deshidrogenasa	Periplásmica
				Csal2831 (YP_574876)	Sin asignación	Citoplasmática, anclada a membrana
Gluconolactonasa (Glcnl)		ND	3.1.1.17	Csal0453 (YP_572514)	Sin asignación	Citoplasmática
				Csal1727 (YP_573778)	Sin asignación	Citoplasmática
				Csal2779 (YP_574825)	Gluconolactonasa	Periplásmica
Transportador de gluconato (GntP)		ND	-	Csal3175 (YP_575218) Familia del antiportador Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup>	Sin asignación	Transmembrana
				Csal0925 (YP_572981) Familia del antiportador Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup>	Sin asignación	Transmembrana
Gluconoquinasa (GnuK)	ATP	ND	2.7.1.12	Csal0926 (YP_572982)	Gluconoquinasa	Citoplasmática
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf)	NADPH	+	1.1.1.49	Csal2741 (YP_574787)	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Citoplasmática
6-Fosfogluconolactonasa (Pgl)		ND	3.1.1.31	Csal2740 (YP_574786)	6-Fosfogluconolactonasa	Citoplasmática
2-Ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (Eda)		ND	4.1.2.14	Csal2739 (YP_574785)	2-Ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa	Citoplasmática
Transportador de 2-Cetogluconato <sup>1</sup> (KguT)		ND	-	Csal0137 (YP_572200)	Sin asignación	Transmembrana

<b>Gluconato deshidrogenasa<sup>2</sup> (GhrB)</b>	NAD(P) <sup>+</sup>	ND	1.1.1.215	Csal0273 (YP_572335)	2-Ceto-D-gluconato reductasa (NADPH)	Citoplasmática
<b>Gluconato deshidrogenasa (membrana) (Gad)</b>	FAD	ND	1.1.99.3	-		
<b>2-Cetogluconato quinasa<sup>3</sup> (KguK)</b>	ATP	ND	2.7.1.13	Posiblemente Csal0274 (YP_572336)	2-Deshidro-3-desoxigluconoquinasa (KgdK) 2.7.1.45	Citoplasmática
<b>2-Ceto-6-fosfogluconato reductasa (KguD)</b>	NADPH	ND	1.1.1.43	Posiblemente Csal0273 (YP_572335)	2-Deshidro-D-gluconato reductasa (NADPH) 1.1.1.215	Citoplasmática
<b>6-Fosfofructoquinasa (PfkB)</b>	ATP	ND	2.7.1.11	Posiblemente Csal2647 (YP_574693)	Fructosa-1-fosfato quinasa 2.7.1.56	Citoplasmática
				Csal0274 (YP_572336)	2-Deshidro-3-desoxigluconoquinasa 2.7.1.45	Citoplasmática
				Csal0639 (YP_572700)	Sin asignación	Citoplasmática
				Csal0931 (YP_572987)	Fructoquinasa 2.7.1.4	Citoplasmática
				Csal1841 (YP_573892)	Riboquinasa/desoxiriboquinasa 2.7.1.15	Citoplasmática
<b>6-Fosfofructoquinasa (dependiente de pirofosfato) (Pfp)</b>	Pirofosfato	ND	2.7.1.90	Posiblemente Csal1534 (YP_573586)	Fosfofructoquinasa 2.7.1.11	Citoplasmática
<b>Ruta de las pentosas fosfato</b>						
<b>6-Fosfogluconato deshidratasa (Edd)</b>		ND	4.2.1.12	Csal0936 (YP_572992)	6-Fosfogluconato deshidratasa	Citoplasmática
<b>6-Fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd)</b>	NAD(P)H	ND	1.1.1.44	Csal0666 (YP_572726.1)	Fosfogluconato deshidrogenasa	Citoplasmática
<b>6-Fosfogluconato deshidrogenasa</b>	NAD	ND	1.1.1.60	Csal0960 (YP_573016.1)	Tartronato semialdehído reductasa	Citoplasmática
				Csal1751 (YP_573802.1)	Sin asignación	Citoplasmática
				Csal3190 (YP_575233.1)	Sin asignación	Citoplasmática
<b>Ciclo del ácido cítrico</b>						
<b>Componente E1 del complejo piruvato deshidrogenasa (piruvato deshidrogenasa)</b>	TPP	ND	1.2.4.1	Csal0855 (YP_572911)	Piruvato deshidrogenasa	Citoplasmática
<b>Componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (dihidrolipoamida acetiltransferasa)</b>	Lipoato-coenzima A	ND	2.3.1.12	Csal0856 (YP_572912)	Sin asignación	Citoplasmática

<b>Componente E3 del complejo piruvato deshidrogenasa (dihidrolipoamida deshidrogenasa)</b>	FAD	ND	1.8.1.4	Csal1219 (YP_573273) <sup>4</sup>	Piruvato deshidrogenasa (dihidrolipoamida acetiltransferasa)	Citoplasmática
<b>Citrato sintasa (Cs)</b>		+	2.3.3.1	Csal1212 (YP_573266)	Citrato (Si)-sintasa	Citoplasmática
<b>Isocitrato deshidrogenasa (NADPH-Icdh)</b>	NADPH	+	1.1.1.42	Csal0525 (YP_572586)	Isocitrato deshidrogenasa (NADP)	Citoplasmática
<b>Isocitrato deshidrogenasa (NADH-Icdh)</b>	NADH	ND	1.1.1.41	Csal1434 (YP_573487)	Isocitrato deshidrogenasa (NAD <sup>+</sup> )	Citoplasmática
<b>Malato/lactato deshidrogenasa</b>	NADH	ND	1.1.1.37	Csal1752 (YP_573803)	Malato deshidrogenasa	Citoplasmática
<b>Malato/lactato deshidrogenasa</b>	NADPH	ND	1.1.1.82	Csal1771 (YP_573822)	Malato deshidrogenasa	Citoplasmática
<b>Malato-quinona oxidorreductasa (Mqo)</b>	Quinona	ND	1.1.5.4	Csal2579 (YP_574625)	Malato deshidrogenasa (Ubiquinona-8/menaquinona-8 como aceptor)	Citoplasmática
<b>Ciclo del glioxilato</b>						
<b>Isocitrato liasa (Icl)</b>		+	4.1.3.1	Csal2449 (YP_574495)	Isocitrato liasa	Citoplasmática
<b>Malato sintasa G (Ms)</b>		ND	2.3.3.9	Csal_3154 (YP_575197)	Malato sintasa	Citoplasmática
<b>Anaplerosis/Gluconeogénesis</b>						
<b>Oxalacetato descarboxilasa (Oad)</b>		ND	4.1.1.3	Csal0692 (YP_572752)	Sin asignación	Citoplasmática
				Csal0693 (YP_572753)	Homocitrato sintasa 2.3.3.14	
				Csal0694 (YP_572754)	Oxaloacetate decarboxylase	
<b>Piruvato carboxilasa, subunidad A<sup>5</sup></b>	ATP	+	6.4.1.1	Csal_1555 (YP_573607)	Piruvato carboxilasa	Citoplasmática
<b>Piruvato carboxilasa, subunidad B<sup>6</sup></b>				Csal_1556 (YP_573608)	Sin asignación	Citoplasmática
<b>Malic enzyme (Mae)</b>	NADPH	+	1.1.1.40	Csal0605 (YP_572666)	Enzima málico (NADP)	Citoplasmática
<b>Fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc)</b>		+	4.1.1.31	Csal1640 (YP_573692)	Fosfoenolpiruvato carboxilasa	Citoplasmática
<b>Fosfotransacetilasa (Pta)</b>	Fosfato	ND	2.3.1.8	Sin correspondencia clara con ningún ORF		
<b>Piruvato oxidasa (Pox)<sup>7</sup></b>	TPP, FAD, Citocromo	ND	1.2.5.1	Csal1010 (YP_573066)	Piruvato oxidasa	Citoplasmática

<b>Acil fosfatasa (AcyP)</b>		ND	3.6.1.7	Csal1839 (YP_573890)	Acil fosfatasa	Citoplasmática
<b>Acetil-coenzima A sintetasa<sup>8</sup> (Acs)</b>	ATP	ND	6.2.1.1	Csal0865 (YP_572921)	Acetil-coenzima A sintetasa	Citoplasmática
<b>Acetato permeasa<sup>9</sup> (ActP)</b>	Simportador Na <sup>+</sup> -soluto	ND	-	Csal 0871 (YP_572927) Csal 2927 (YP_574971)	Sin asignación	Transmembrana
<b>L-Lactato deshidrogenasa (citocromo)<sup>10</sup></b>	Citocromo	ND	1.1.2.3	Csal0404 (YP_572465)	Sin asignación	Citoplasmática
<b>D-Lactato deshidrogenasa<sup>11</sup></b>	NAD	ND	1.1.1.28	Csal3144 (YP_575187)	D-Lactato deshidrogenasa	Citoplasmática
<b>Metabolismo del nitrógeno</b>						
<b>Alanina aminotransferasa<sup>12</sup> (AlaAT)</b>	Piridoxal 5'-fosfato	+	2.6.1.2	Csal1348 (YP_573402)	Sin asignación	Citoplasmática
<b>L-Alanina deshidrogenasa (Ald)</b>	NADH	ND	1.4.1.1	Csal_2966 (YP_575010)	L-Alanine deshidrogenasa	Citoplasmática
<b>Glutamato sintasa (Gls)</b>	NAD(P)H	ND	1.4.1.14 (NADH)	Csal0615 (YP_572676)	Glutamato sintasa (ferredoxina)	Citoplasmática
			1.4.1.13 (NADPH)	Csal0616 (YP_572677)	Glutamato sintasa (NADPH), subunidad menor	Citoplasmática
<b>Glutamato deshidrogenasa (NADPH-Gdh)</b>	NADPH	+	1.4.1.4	Sin correspondencia clara con ningún ORF		Citoplasmática
<b>Glutamato deshidrogenasa (NADH-Gdh)</b>	NADH	+	1.4.1.2	Csal1340 (YP_573394)	Glutamato deshidrogenasa (NAD)	Citoplasmática
<b>Aspartato aminotransferasa (AspAT)</b>		+	2.6.1.1	Csal0536 (YP_572597) <sup>13</sup>	Sin asignación	Citoplasmática
				Csal1320 (YP_573374)	Aspartato aminotransferasa	Citoplasmática
<b>Aspartoquinasa (Ask)</b>	ATP	ND	2.7.2.4	Csal0626 (YP_572687)	Aspartato quinasa	Citoplasmática

ND: no detectada

Los análisis de topología se realizaron con Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

y TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

<sup>1</sup>Anotada en JGI como: Major Facilitator Superfamily MSF\_1.

<sup>2</sup>Anotada en JGI como: 2-ketogluconate kinase (KguK).

<sup>3</sup>Anotada en JGI como: 6-phosphofruktokinase (PfkB).

<sup>4</sup>Anotada en JGI como: pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase dimerization region.

<sup>5</sup>Anotada en JGI como: carbamoyl-phosphate synthase.

<sup>6</sup>Anotada en JGI como: oxaloacetate decarboxylase (Oad) alpha subunit.

<sup>7</sup>Anotada en JGI como: thiamine pyrophosphate enzyme-like (TPP-binding).

<sup>8</sup>Anotada en JGI como: acetate-coenzyme A ligase.

<sup>9</sup>Anotada en JGI como: Na<sup>+</sup>/solute symporter.

<sup>10</sup>Anotada en JGI como: FMN-dependent alpha-hydroxyacid dehydrogenase.

<sup>11</sup>Anotada en JGI como: D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase NAD-binding.

<sup>12</sup>Anotada en JGI como: aminotransferase class I and II.

<sup>13</sup>Anotada en JGI como: aminotransferase class I and II.

**Tabla I.S2.** Análisis de la actividad 6-fosfofructoquinasa (Pfk) en extractos proteicos de las cepas *C. salexigens* y *E. coli*.

	<i>C. salexigens</i> DSM 3043 <sup>T</sup>		<i>E. coli</i> BW25113
	M63 + NaCl 0,75 M	M63 + NaCl 2,5 M	Medio mínimo M9
<b>Pfk (U/min)</b>	<0,05	<0,05	0,50 ± 0,14

**Tabla I.S3.** Comparación de los flujos metabólicos máximos estimados a partir de las actividades Cs, Cdh, Pc y Ppc con las velocidades globales de consume de fuentes de carbono y nitrógeno y de producción de ectoínas. Para permitir una comparación directa, todos los valores vienen dados en mmol/g<sub>ps</sub>·h.

<b>Flujo (mmol/g<sub>ps</sub>·h)</b>	<b>Salinidad ([NaCl])</b>		
	<b>0,6 M</b>	<b>0,75 M</b>	<b>2,5 M</b>
Flujo máximo a través de Csa	0,52	1,05	0,39
Velocidad de consumo de glucosa	14,3	11,7	2,1
Flujo máximo a través de Gdh <sup>a,b</sup>	0,78	0,83	0,57
Velocidad de consumo de amonio	3,7	6,5	2,5
Flujo máximo a través de Pc <sup>a</sup>	2,01	1,64	2,10
Flujo máximo a través de Ppc <sup>a</sup>	<i>N.M.</i>	0,21	0,20
Velocidad de producción de ectoínas <sup>c</sup>	0,049	0,127	0,174

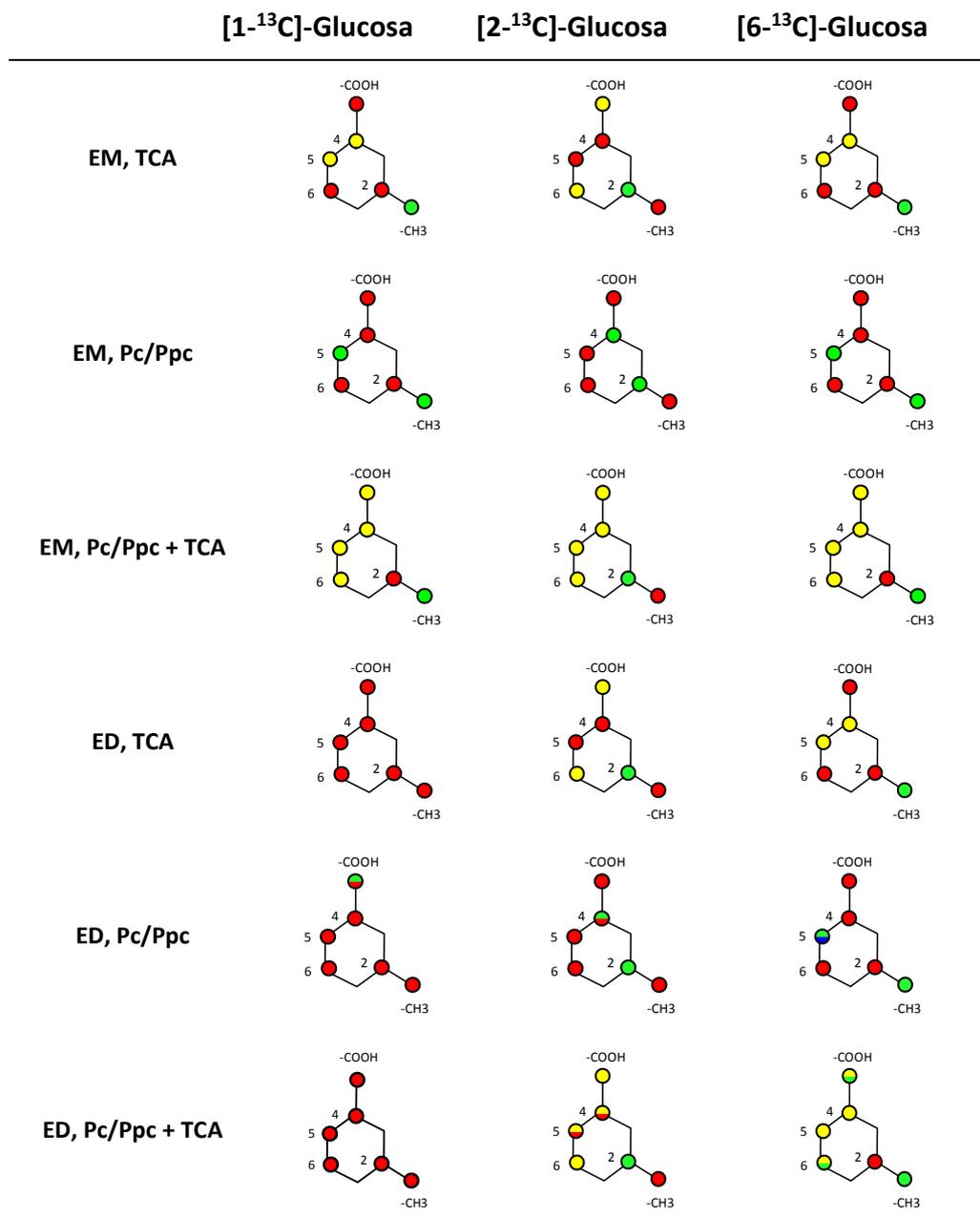
<sup>a</sup>El peso seco se calculó a partir de la concentración de proteínas aplicando correlaciones empíricas obtenidas para cada concentración de sal. Para cada salinidad, se determinó también el contenido específico en proteínas.

<sup>b</sup>El flujo representado es la suma de los calculados a partir de las actividades de Gdh dependientes de NADPH y de NADH determinadas.

<sup>c</sup>La velocidad total de síntesis de ectoínas es la suma de la producción de ectoína y de hidroxiectoína.

*N.M.*, no medido.

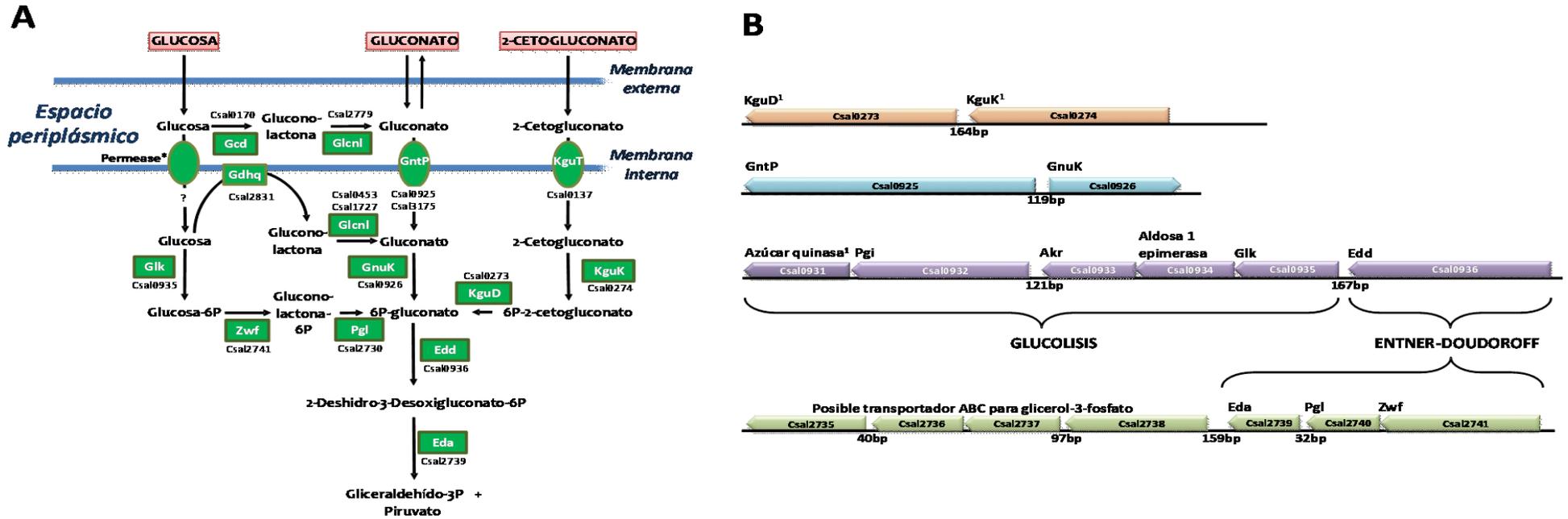
**Tabla I.S4.** Patrones de marcaje de las moléculas de ectoína previstos para cada una de las rutas extremas consideradas. La escala de color representa la probabilidad de marcaje en cada posición para la combinación del sustrato marcado y las rutas metabólicas seguidas (rojo, 0%; amarillo, 25%; verde, 50%; azul, 100%). En las posiciones en las que se espera un marcaje diferente para Pc y Ppc, la mitad superior de la posición de carbono corresponde al flujo de Pc, y la mitad inferior al flujo de Ppc.



\*Abreviaturas: EM, ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (glucolisis); ED, ruta de Entner-Doudoroff; CAT, ciclo de los ácidos tricarbónicos; Pc, piruvato carboxilasa, Ppc, fosfoenolpiruvato carboxilasa.

\*Las distintas distribuciones de isotopómeros predichas solo tienen en cuenta una única vuelta al CAT, en su caso. En las distribuciones previstas para [1-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa, si se tienen en cuenta más vueltas al CAT, se predice la aparición de nuevos isotopómeros con mayor número de carbonos marcados (especialmente en el carbono carboxílico y C6). En las distribuciones predichas para [2-<sup>13</sup>C]-glucosa (usadas para la estimación de flujos relativos), las vueltas segunda y posteriores al CAT no dan lugar a presencia de marca en posiciones previamente no marcadas en la distribución tras la primera vuelta.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

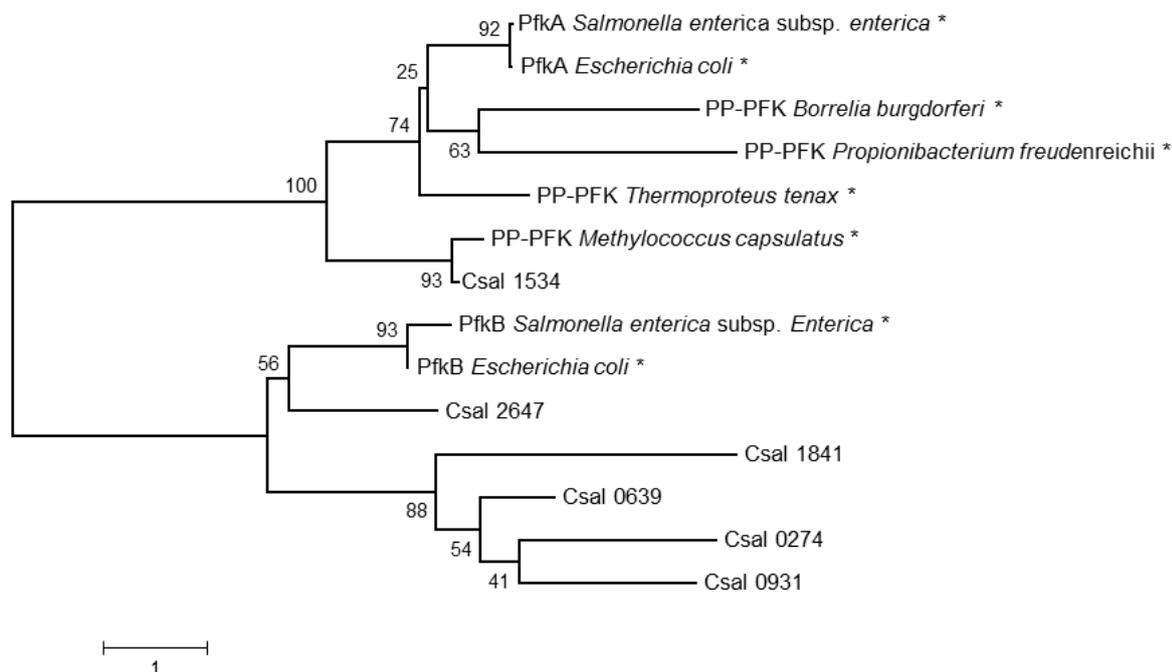


**Figura I.S1.** (A) La ruta de ED propuesta para *C. salexigens*. La ruta se basa en estudios filogenéticos e *in silico* en los que se compara *C. salexigens* con *P. putida* y otras especies relacionadas. Los nombres de enzimas y transportadores aparecen en rectángulos y elipses, respectivamente. (B) Operones y grupos de genes relacionados con las rutas glucolítica y de Entner-Doudoroff en *C. salexigens*. Sobre cada ORF se muestra el nombre de la asignación más plausible.

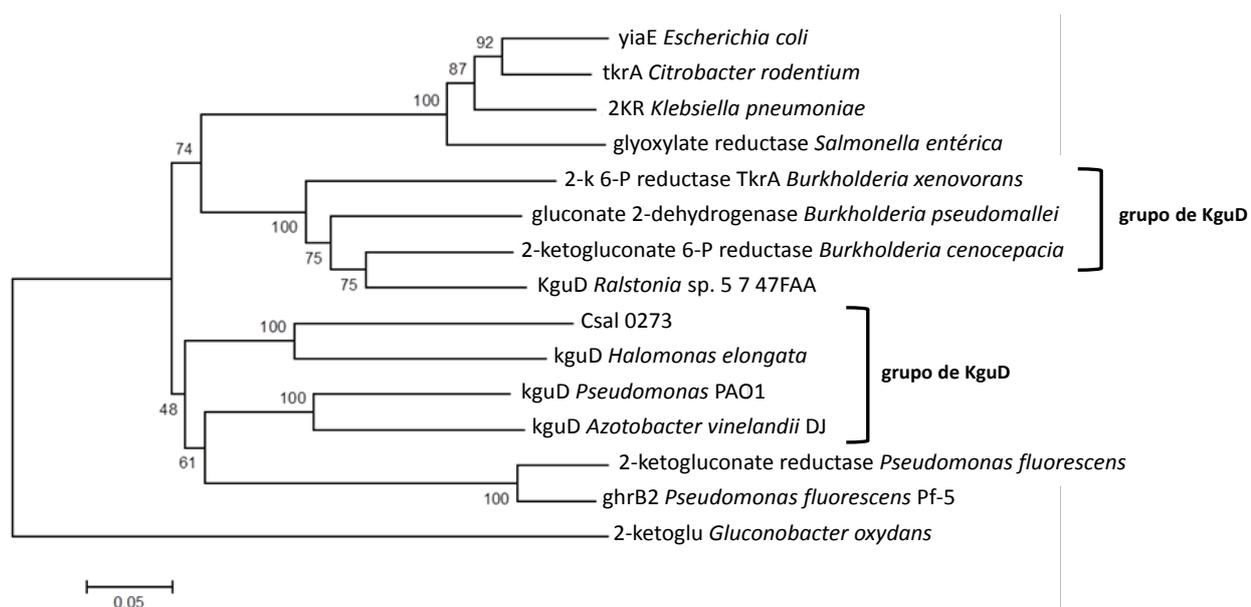
<sup>1</sup>En este trabajo se ha asignado Csa0273 a GhrB (gluconato deshidrogenasa); Csa0274 y Csa0931 están anotadas en JGI como PfkB (6-fosfofructoquinasa); KguD, KguK y azúcar quinasa son las asignaciones propuestas de acuerdo con los estudios *in silico* y filogenéticos de este trabajo.

\*Permeasa para glucosa; existen varios sistemas de transporte ABC en el genoma de *C. salexigens*, generalmente con una especificidad de sustrato ambigua.

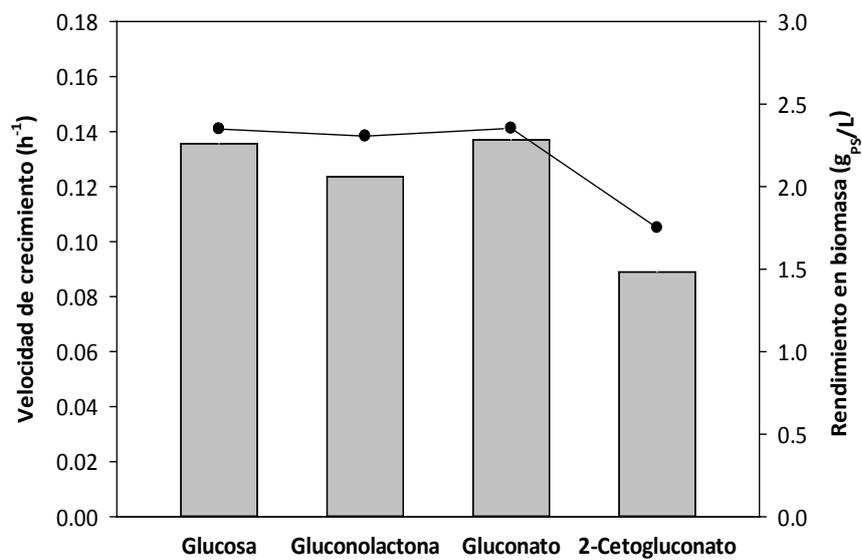
Abreviaturas: Akk, aldo-cetorreductasa; Eda, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa; Edd, 6-fosfogluconato deshidratasa; Gdhq, glucosa deshidrogenasa; Glnl, gluconolactonasa; Gik, glucoquinasa; GntP, transportador de gluconato; GnuK, gluconoquinasa; KguD, 2-ceto-6fosfogluconato reductasa; KguK, 2-cetogluconato quinasa; KguT, transportador de 2-cetogluconato y Pgl, 6-fosfogluconolactonasa.



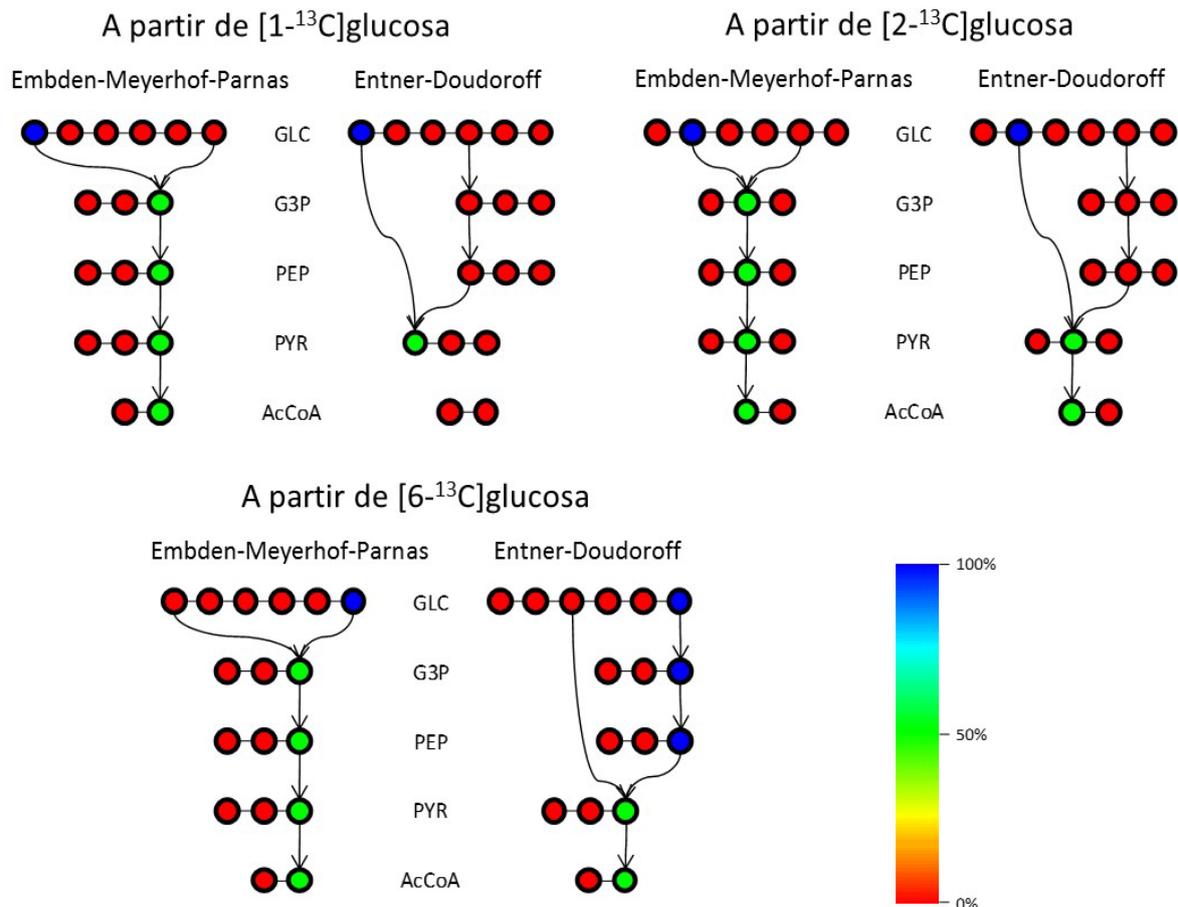
**Figura I.S2.** Análisis filogenético de los ORFs anotados como 6-fosfofructoquinasa (Pfk): Csal0274, Csal0639, Csal0931, Csal1534, Csal1841 y Csal2647. Las proteínas que han sido caracterizadas aparecen marcadas con un asterisco.



**Figura I.S3.** Estudio filogenético del ORF asignado como 2-ceto-6-fosfogluconato reductasa (KguD), Csal0273.

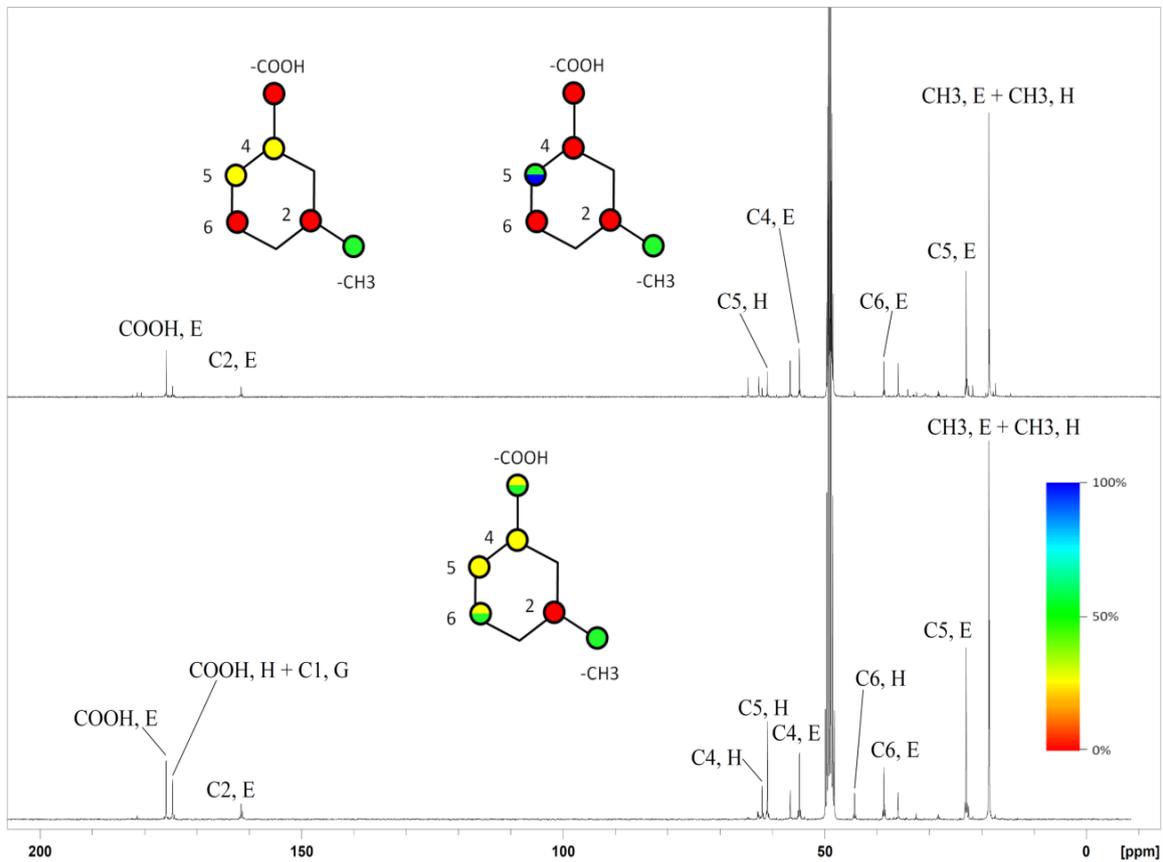


**Figura I.S4.** Rendimiento máximo en biomasa (círculos) y velocidades de crecimiento (barras) de *C. salexigens* en cultivos discontinuos crecidos en medio mínimo M63 con NaCl 2,5 M y D-glucosa, D-glucono-1,5-lactona, D-gluconato o 2-ceto-D-gluconato 20 mM como única fuente de carbono.

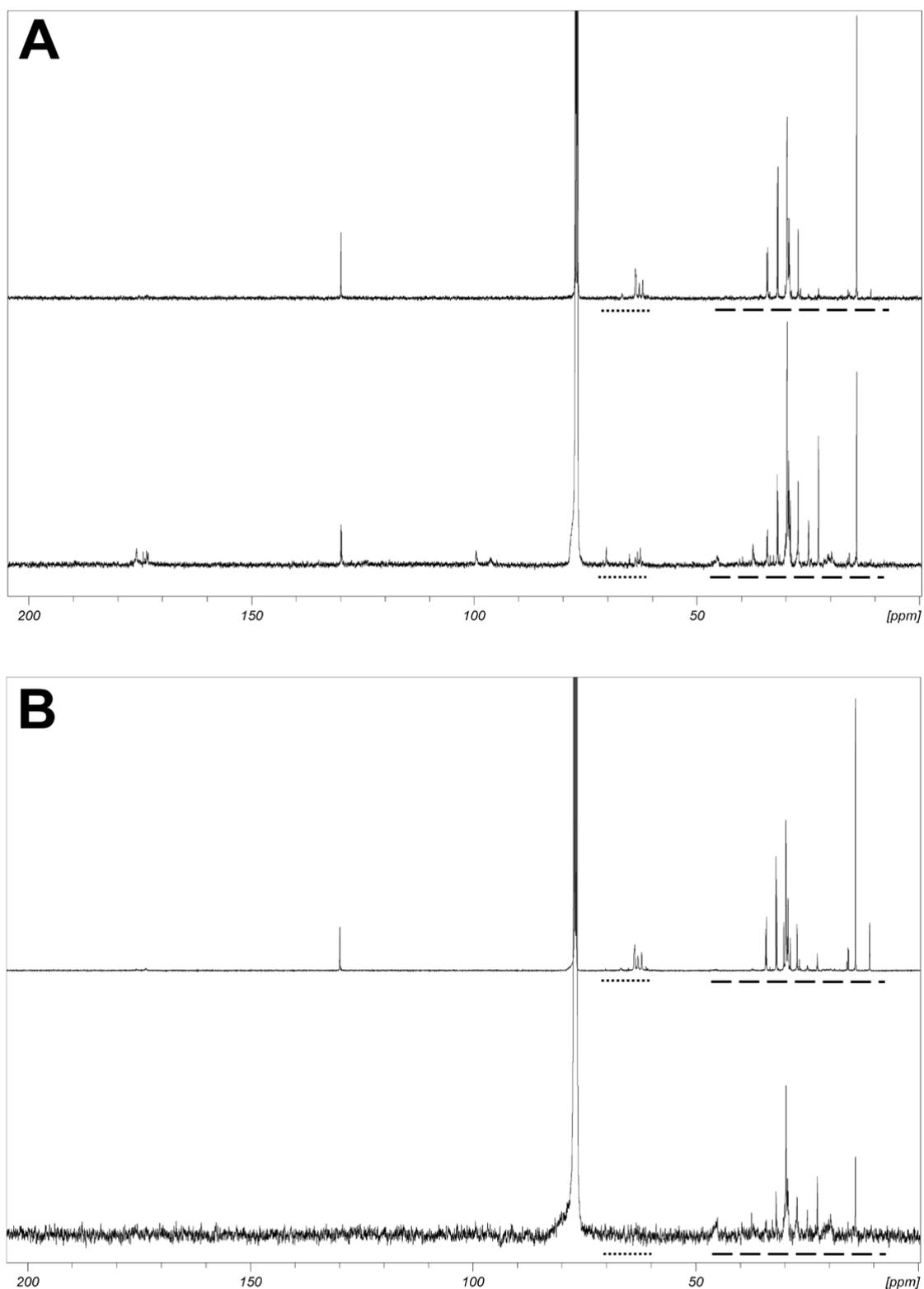


	Embden-Meyerhof-Parnas			Entner-Doudoroff		
	1- <sup>13</sup> C	2- <sup>13</sup> C	6- <sup>13</sup> C	1- <sup>13</sup> C	2- <sup>13</sup> C	6- <sup>13</sup> C
<b>Gliceraldehído-3-fosfato</b>	3(50%)	2(50%)	3(50%)	N.M.	N.M.	3(100%)
<b>Fosfoenolpiruvato</b>	3(50%)	2(50%)	3(50%)	N.M.	N.M.	3(100%)
<b>Piruvato</b>	3(50%)	2(50%)	3(50%)	1(50%)	2(50%)	3(50%)
<b>Acetil-coenzima A</b>	2(50%)	1(50%)	2(50%)	N.M.	1(50%)	2(50%)

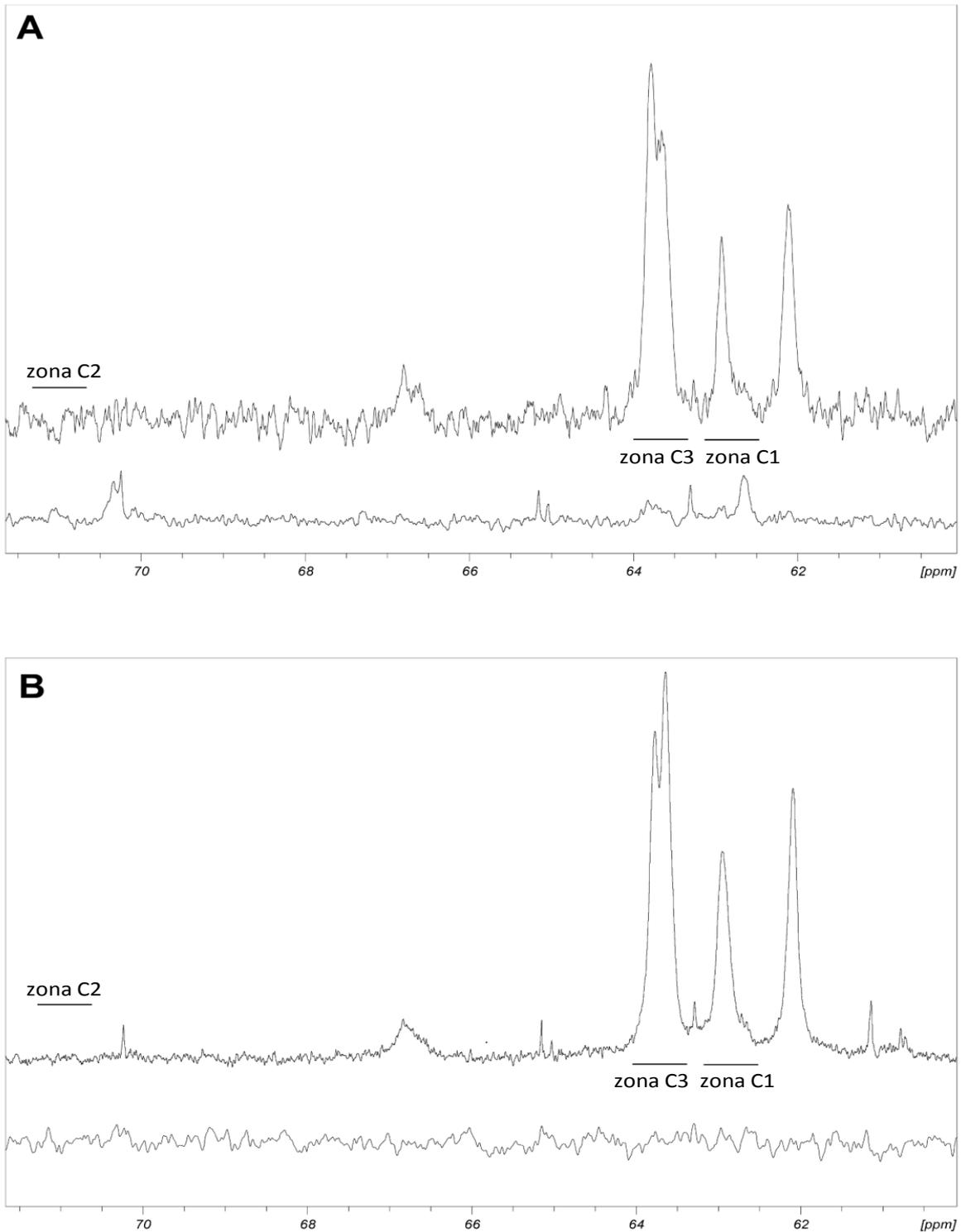
**Figura I.S5.** Destino previsto de la marca proveniente de [1-<sup>13</sup>C]-, [2-<sup>13</sup>C]- y [6-<sup>13</sup>C]glucosa en fosfoenolpiruvato, piruvato y acetil coenzima A, según se metabolizan a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas o la ruta de Entner-Doudoroff. La posición de la marca y el porcentaje de marcaje esperado se muestran en la tabla inferior. El código de color usado para representar el porcentaje de marcaje se muestra en la escala de la parte inferior derecha.



**Figura I.S6.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN obtenidos de extractos celulares de cultivos crecidos en  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ glucosa. Se usó medio mínimo con NaCl 0,75 M (espectro superior) y 2,5 M (espectro inferior). Se indicant las señales correspondientes a la marca en el carbon carboxílico, carbono metílico, C2, C4 y C6 de la ectoína (E) y de la hidroxiectoína (H). Nótese que las señales de los carbonos metílicos de ectoína e hidroxiectoína aparecen solapados. Las tres moléculas de ectoína que aparecen representadas muestran el porcentaje esperado de marcaje en las distribuciones de isotopómeros correspondientes a los tres casos extremos considerados (arriba a la izquierda, ED (o EMP) seguida de una vuelta al CAT; arriba a la derecha, ED seguida de anaplerosis por Pc o Ppc; abajo, ED seguida de una combinación de Pc o Ppc y una CAT; ver Tabla I.S4 para mayor detalle). Para representar el porcentaje de marcaje se siguió el código de color representado en la escala de la parte inferior derecha.



**Figura I.S7.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de lípidos extraídos de cultivos crecidos en  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ - y  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glucosa. Se usó medio mínimo con (A) NaCl 0,75 M y (B) NaCl 2,5 M. Tanto en (A) como en (B), el espectro superior corresponde a  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa, y el inferior a  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa. Se destacan las regiones de los espectros correspondientes a las señales de ácidos grasos (línea discontinua) y al glicerol (línea de puntos).



**Figura I.S8.** Ampliación de las regiones de las señales correspondientes al glicerol-3-fosfato de espectros  $^{13}\text{C}$ -RMN obtenidos de extractos lipídicos procedentes de cultivos crecidos en  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ - y  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa. Se usó medio mínimo M63 con (A) NaCl 0,75 M y (B) NaCl 2,5 M. Tanto en (A) como en (B), el espectro superior corresponde a  $[6\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa, y el inferior a  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosa. Se destacan las zonas en las que se esperan las señales de  $^{13}\text{C}$  de los carbonos C1, C2 y C3 del glicerol-3-fosfato.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aoshima, M., Ishii, M., Yamagishi, A., Oshima, T., y Igarashi, Y. (2003) Metabolic characteristics of an isocitrate dehydrogenase defective derivative of *Escherichia coli* BL21(DE3). *Biotechnol Bioeng* **84**: 732-737.
- Ates, O., Oner, E.T., y Arga, K.Y. (2011) Genome-scale reconstruction of metabolic network for a halophilic extremophile, *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. *BMC Syst Biol* **5**: 12.
- Bertagnolli, B.L., y Cook, P.F. (1984) Kinetic mechanism of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Propionibacterium freudenreichii*. *Biochemistry* **23**: 4101-4108.
- Buch, A., Archana, G., y Naresh Kumar, G. (2008) Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Res Microbiol* **159**: 635-42.
- Caspi, R., Altman, T., Dreher, K., Fulcher, C.A., Subhraveti, P., Keseler, I.M., et al. (2012) The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res* **40**: D742-53.
- Castaño-Cerezo, S., Pastor, J.M., Renilla, S., Bernal, V., Iborra, J.L., y Cánovas, M. (2009) An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **8**: 54.
- Castillo, T. del, Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J., Fuhrer, T., Sauer, U., y Duque, E. (2007) Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *J Bacteriol* **189**: 5142-52.
- Conway, T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev* **9**: 1-27.
- Copeland, A., O'Connor, K., Lucas, S., Lapidus, A., Berry, K.W., Detter, J.C., et al. (2011) Complete genome sequence of the halophilic and highly halotolerant *Chromohalobacter salexigens* type strain (1H11(T)). *Stand Genomic Sci* **5**: 379-88.
- Csonka, L.N., O'Connor, K., Larimer, F., Richardson, P., Lapidus, A., Ewing, A.D., et al. (2005) What we can deduce about metabolism in the moderate halophile *Chromohalobacter salexigens* from its genomic sequence. In *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Gunde-Cimerman, N., Oren, A., y Plemenitas, A. (eds). pp. 267-285.
- Entner, N., y Doudoroff, M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol Chem* **196**: 853-862.
- Eunen, K. van, Bouwman, J., Daran-Lapujade, P., Postmus, J., Canelas, A.B., Mensonides, F.I.C., et al. (2010) Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology. *FEBS J* **277**: 749-60.
- Fraenkel, D. (1966) Glycolysis. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). ASM Press, Washington, D.C. pp. 189-198.
- Goss, T.J., Perez-Matos, A., y Bender, R.A. (2001) Roles of glutamate synthase, gltBD, and gltF in

- nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **183**: 6607-19.
- Kanehisa, M., y Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**: 27-30.
- Kather, B., Stingl, K., Rest, M.E. van der, Altendorf, K., y Molenaar, D. (2000) Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate:quinone oxidoreductase. *J Bacteriol* **182**: 3204-3209.
- Kemp, R.G., y Tripathi, R.L. (1993) Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase complements fructose 1,6-bisphosphatase but not phosphofructokinase deficiency in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 5723-5724.
- Klapa, M.I., Park, S.M., Sinskey, A.J., y Stephanopoulos, G. (1999) Metabolite and isotopomer balancing in the analysis of metabolic cycles: I. Theory. *Biotechnol Bioeng* **62**: 375-391.
- Kornberg, H.L., y Smith, J. (1970) Role of phosphofructokinase in the utilization of glucose by *Escherichia coli*. *Nature* **227**: 44-6.
- Kretzschmar, U., Schobert, M., y Görisch, H. (2001) The *Pseudomonas aeruginosa* *acsA* gene, encoding an acetyl-CoA synthetase, is essential for growth on ethanol. *Microbiology* **147**: 2671-7.
- Lessie, T.G., y Phibbs, P. V (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annu Rev Microbiol* **38**: 359-88.
- Oren, A. (2002) *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Oren, A., Larimer, F., Richardson, P., Lapidus, A., y Csonka, L.N. (2005) How to be moderately halophilic with broad salt tolerance: clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extrem Life under Extrem Cond* **9**: 275-9.
- Oren, A., y Mana, L. (2003) Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 83-87.
- Peçonek, J., Gruber, C., Gallego, V., Ventosa, A., Busse, H.-J., Kämpfer, P., et al. (2006) Reclassification of *Pseudomonas beijerinckii* Hof 1935 as *Chromohalobacter beijerinckii* comb. nov., and emended description of the species. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1953-7.
- Peng, L., y Shimizu, K. (2003) Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 163-178.
- Powell, J.T., y Morrison, J.F. (1978) The purification and properties of the aspartate aminotransferase and aromatic-amino-acid aminotransferase from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **87**: 391-400.
- Reshetnikov, A.S., Rozova, O.N., Khmelenina, V.N., Mustakhimov, I.I., Beschastny, A.P., Murrell, J.C., y Trotsenko, Y.A. (2008) Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *FEMS Microbiol Lett* **288**: 202-10.
- Rest, M.E. van der, Frank, C., y Molenaar, D. (2000) Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:

6892-9.

Rojo, F. (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 658-84.

Romano, A.H., Trifone, J.D., y Brustolon, M. (1979) Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *J Bacteriol* **139**: 93-7.

Russell, P., Schrock, H.L., y Gennis, R.B. (1977) Lipid activation and protease activation of pyruvate oxidase. Evidence suggesting a common site of interaction on the protein. *J Biol Chem* **252**: 7883-7887.

Sakamoto, N., Kotre, A.M., y Savageau, M.A. (1975) Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J Bacteriol* **124**: 775-83.

Sauer, U., y Eikmanns, B.J. (2005) The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 765-94.

Seo, J.-S., Chong, H., Park, H.S., Yoon, K.-O., Jung, C., Kim, J.J., et al. (2005) The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol* **23**: 63-8.

Stadtman, E.R., Cohen, G.N., LeBras, G., y Robichon-Szulmajster, H. de (1961) Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **236**: 2033-2038.

Starai, V.J., y Escalante-Semerena, J.C. (2004) Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming). *Cell Mol Life Sci* **61**: 2020-2030.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-9.

Tang, K.-H., Feng, X., Tang, Y.J., y Blankenship, R.E. (2009) Carbohydrate metabolism and carbon fixation in *Roseobacter denitrificans* OCh114. *PLoS One* **4**: e7233.

Tesch, M., Graaf, A.A. de, y Sahm, H. (1999) *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1099-1109.

Tomlinson, G.A., Koch, T.K., y Hochstein, L.I. (1974) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. *Can J Microbiol* **20**: 1085-1091.

Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., y Nieto, J.J. (2008) Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems* **4**: 14.

Verhees, C.H., Kengen, S.W.M., Tuininga, J.E., Schut, G., Adams, M.W.W., Vos, W.M. De, y Oost, J. Van Der (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J* **375**: 231-46.

Wanner, B.L., Wilmes-Riesenberg, M.R., y Wilmesriesenberg, M.R. (1992) Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the

phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 2124-2130.

Werf, M.J. van der, Guettler, M. V., Jain, M.K., y Zeikus, J.G. (1997) Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp. 130Z. *Arch Microbiol* **167**: 332-342.

Xu, B., Jahic, M., y Enfors, S.O. (1999) Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **15**: 81-90.

Yagi, T., Toyosato, M., y Soda, K. (1976) Crystalline aspartate aminotransferase from *Pseudomonas striata*. *FEBS Lett* **61**: 34-7.

Ye, J., McGinnis, S., y Madden, T.L. (2006) BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res* **34**: W6-9.

## **ANEXO II**



Tabla II.S1. Lista de cebadores usados en los experimentos de PCR a tiempo y en los clonajes.

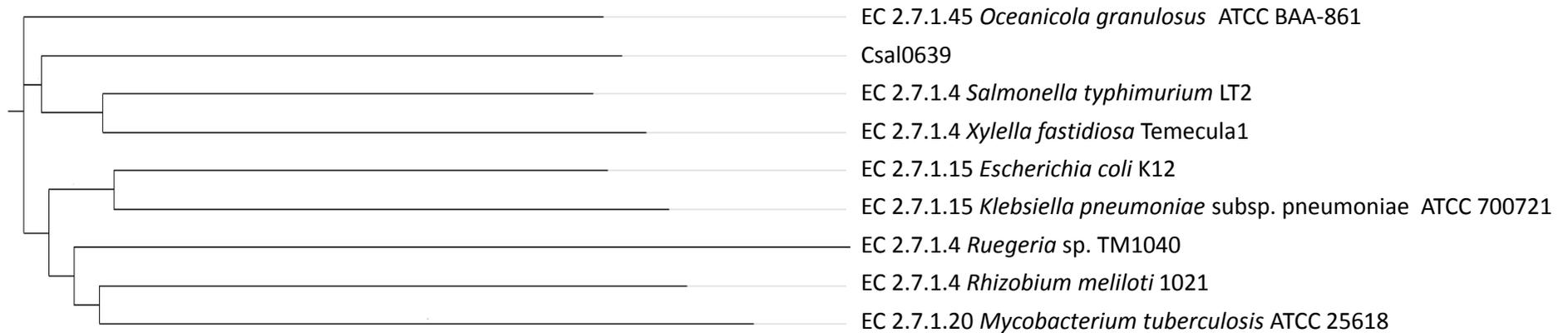
Grupo	ORF	Gen <sup>1</sup>	Nombre usado en este estudio	Número E.C. <sup>1</sup>	Cebadores directo y reverso
Control interno	Csal0001	<i>dnaA</i>	<i>dnaA</i>	NA	5'-CGGCCAGCAGATGATCCT-3' 5'-CCACCCCGCTGATTTTCCT-3'
	Csal0548	<i>polA</i>	<i>polA</i>	2.7.7.7	5'-CGACGCCTGGATGGTGAT-3' 5'-CGCCTCCTTGACCTCGAAG-3'
ORFs analizados mediante RT-PCR	Csal0274	<i>kdgK</i>	<i>kguK</i>	2.7.1.45	5'-ATGAAACGGCCGAAGCTG-3' 5'-GGCGTTTCAGGTCGCCT-3'
	Csal0370	<i>fbaA</i>	<i>ald</i>	4.1.2.13	5'-TGATGCCTTCGACGATTTCTT-3' 5'-AGGAATGGCTGGAAGTCATCAA-3'
	Csal0639	<i>pfkB<sup>2</sup></i>	<i>Csal0639</i>	-	5'-GAACGACTGGCGGATTGC-3' 5'-GCGGGTGAAGACAGCGAC-3'
	Csal0931	<i>scrK</i>	<i>frk</i>	2.7.1.4	5'-GGCTATGCTCAGCGTGGTCT-3' 5'-CATCTGTGCAGCAACAGCCT-3'
	Csal0932	<i>pgi</i>	<i>pgi</i>	5.3.1.9	5'-GATGACGCCCTGGACGAAT-3' 5'-CCTGGGCGCACTGATTG-3'
	Csal0935	<i>glk</i>	<i>glk</i>	2.7.1.2	5'-CGGACAGCGAAGGATAATGC-3' 5'-GGGCGTTCGACCTTCATG-3'
	Csal1534	<i>pfkA</i>	<i>pfp</i>	2.7.1.90	5'-GGTCTTGGGAACGTGAATCG-3' 5'-TCGCAGCTCTCGAAAAGAT-3'
	Csal1841	<i>pfkB<sup>2</sup></i>	<i>Csal1841</i>	-	5'-CACGCCGAAAACGCCA-3' 5'-TCGCTGAAGCCGTGATTG-3'
	Csal2646	<i>fruA</i>	<i>pts EIIB/C</i>	2.7.1.69	5'-TCAAGGAGAAGGGCGTTTACA-3' 5'-CGACAATGCGATGCACAAC-3'
	Csal2647	<i>fruK</i>	<i>1-pfk</i>	2.7.1.56	5'-CGCCAATTGACCATGCAG-3' 5'-TACCGTGTGTGCCGGTGA-3'
	Csal2648	<i>fruB</i>	<i>pts EI/HPr/IIA</i>	2.7.1.69	5'-TCGACCTATCTCGGCAATGG-3' 5'-AACTGCAACACCCGTACGC-3'
	Csal2741	<i>zwf</i>	<i>zwf</i>	1.1.1.49	5'-TCACGGCGGACGAACAA-3' 5'-GATGCCTACGAGCGTCTGTTG-3'
Cebadores usados en los clonajes	Csal0639				5'-GGTGGTGGTACCATGAGCGCAGACCTGCCTC-3' 5'-GGTGGTAAGCTTTCATCGGGCACCTCCGTGG-3'
	Csal0931				5'-GGTGGTCTGCAGATGACCCCGCTCATTGCCTTCGG-3' 5'-GGTGGTAAGCTTTCAGGTCATGGCGTCGAGATCGTC-3'
	Csal2647				5'-GGTGGTCTGCAGATGGCGCGCTGCTGACATTGAC-3' 5'-GGTGGTAAGCTTTCATAGGGTCTCCCTCGCGCCG-3'

<sup>1</sup>Los nombres y números E.C. según la función a la que aparecen asociados en la base de datos KEGG Orthology (KO)

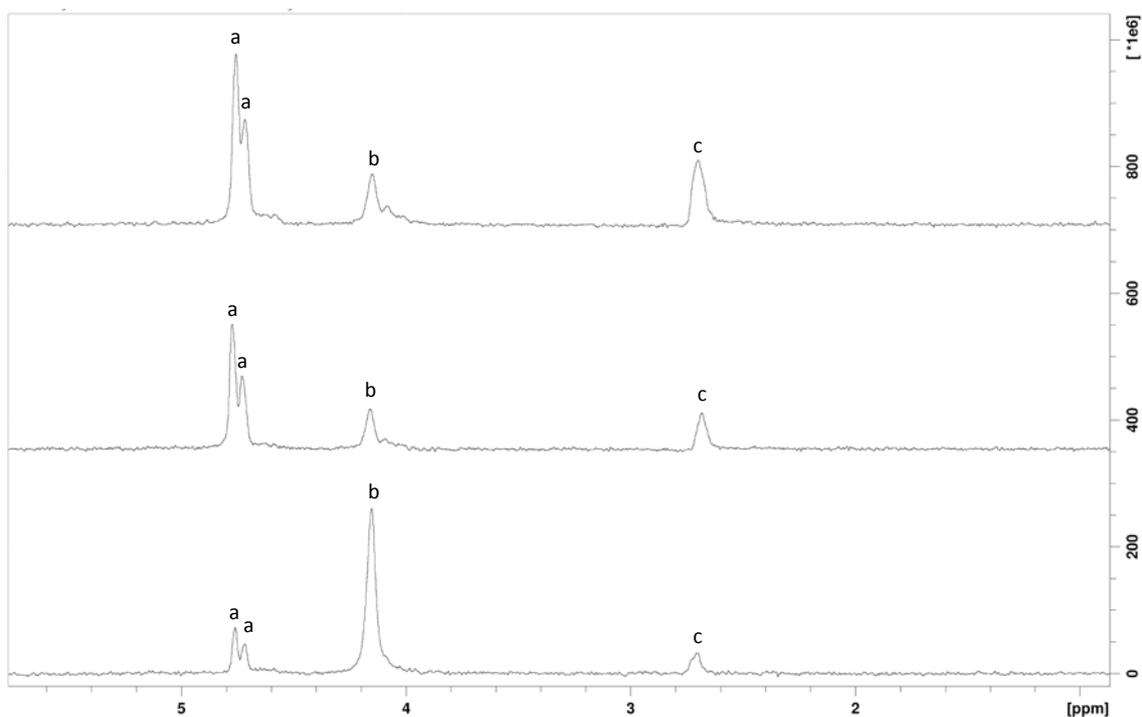
<sup>2</sup>Asignación provisional por anotación automática (según JGI y KEGG)

NA: No aplicable

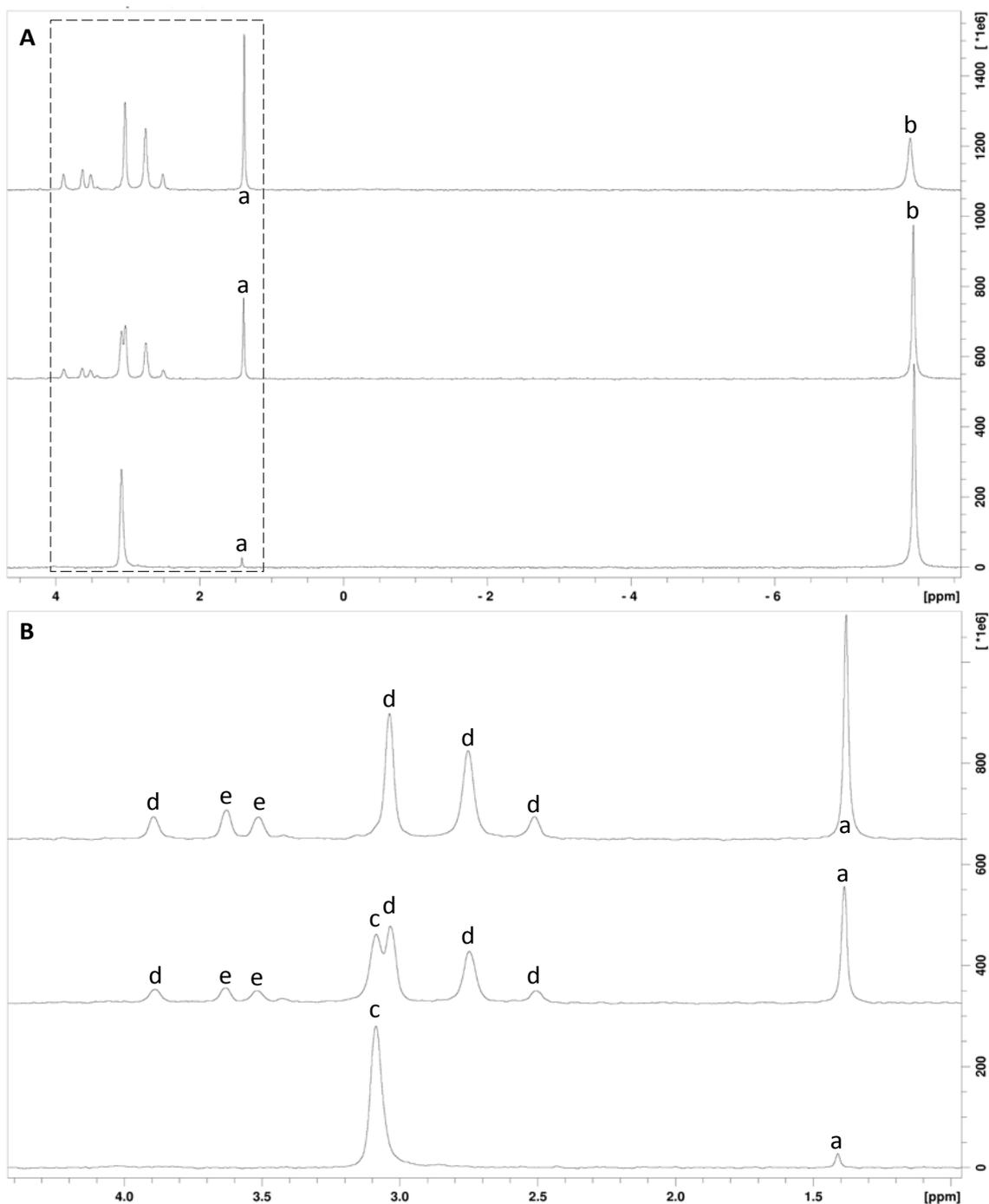
## ESTUDIO FILOGENÉTICO



**Figura II.S1.** Árbol filogenético elaborado para Csal0639 y varios genes ortólogos de distintas especies de proteobacterias y de *Mycobacterium tuberculosis*. Los genes ortólogos se seleccionaron en base a la homología de sus secuencias de aminoácidos con la secuencia de Csal0639 (usando la base de datos KEGG, <http://www.kegg.jp>). Del grupo inicial de genes seleccionado se descartaron las secuencias pertenecientes a especies de arqueas. Por último, solo se tuvieron en cuenta para este estudio las secuencias correspondientes a proteínas de las que había sido descrita y registrada su estructura tridimensional y de cuya actividad enzimática se disponían datos experimentales en la bibliografía. Las actividades atribuidas a estas secuencias son: EC 2.7.1.4, fructoquinasa; EC 2.7.1.15, riboquinasa; EC 2.7.1.20, adenosina quinasa; EC 2.7.1.45, 2-deshidro-3-desoxigluconoquinasa. También se hallaron varios ortólogos de Csal0639 a los que se había asignado de forma automática actividad deshidrogluconoquinasa (EC 2.7.1.13) y 5-deshidro-2-desoxigluconoquinasa (EC 2.7.1.92), pero no se incluyeron en este debido a la carencia de pruebas experimentales de dichas actividades. La matriz de distancia se generó usando la aplicación Phylip en <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::protdist>, y la representación del árbol se hizo en <http://itol.embl.de/>.



**Figura II.S2. Actividad fosfoglucoisomerasa.** Los ensayos de actividad se realizaron con extractos libres de células crecidas en medio mínimo M63 con NaCl 0,75 M y fructosa 20 mM como única fuente de carbono. Los extractos se recolectaron durante la fase exponencial de crecimiento, y se les retiraron las impurezas no proteicas. A los extractos se añadió fructose-6-fosfato como reactivo disparador de la reacción además del tampón adecuado y el resto de sustratos y reactivos necesarios (ver sección de *Materiales y métodos* para más información). Los espectros aparecen organizados en una serie temporal. De abajo a arriba: inmediatamente después de la adición del sustrato, y tras 30, 60 y 90 minutos de incubación. La identidad de las señales se designa con letras según sigue: **a**, glucosa-6-fosfato; **b**, fructosa-6-fosfato y **c**, fosfato.



**Figura II.S3. Actividad 6-fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato.** Las condiciones de cultivo y procedimiento para obtención del extracto fueron los mismos que en el caso anterior. A los extractos se añadió fructose-6-fosfato y pirofosfato como reactivos disparadores de la reacción además del tampón adecuado y el resto de sustratos y reactivos necesarios (ver sección de *Materiales y métodos* para más información). **A**, zona típica de aparición de las señales de fosfatos y ésteres de fosfato en espectros de  $^{31}\text{P}$ -NMR. **B**, detalle de la zona de aparición de los fosfatos de hexosas. Los espectros aparecen organizados en una serie temporal. De abajo a arriba: inmediatamente después de la adición del sustrato, y tras 20 y 40 minutos de incubación. La identidad de las señales se designa con letras según sigue: **a**, fosfato; **b**, pirofosfato; **c**, fructosa-6-fosfato; **d**, fructosa-1,6-bisfosfato; **e**, glucosa-6-fosfato.



