

Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff

Adrián Mauricio García Ortega, Elizabeth Ponce Rivas

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (C.I.C.E.S.E.),
Departamento de Biotecnología Marina. Laboratorio de Microbiología Molecular.
Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada. CP 22860. Ensenada, Baja California., México.
Telf.: (+52-646) 175-05-00 ext. 24441; Fax: (+52-646)175-05-34; E-mail:eponce@cicese.mx

RESUMEN

En bacterias entéricas como *Escherichia coli*, el catabolismo de gluconato se lleva a cabo principalmente por las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff. A pesar de que la presencia de esta vía se consideraba limitada a unas cuantas bacterias Gram negativas, ahora se reconoce que se encuentra presente en un grupo muy diverso de organismos; escalando desde la división Archea, Bacteria, hasta la Eucariota. Debido a la importancia de la vía de Entner-Doudoroff para el catabolismo de diferentes carbohidratos, recientemente ha surgido la inquietud de estudiar más su función tanto desde el punto de vista de su metabolismo como de su regulación. En este sentido esta revisión integra la información existente en los últimos 50 años sobre la vía de Entner-Doudoroff principalmente en tres de los microorganismos de mayor importancia biomédica y/o biotecnológica: *E. coli*, *Zymomonas mobilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Particularmente la revisión esta enfocada a destacar las diferencias en la forma en la que esta vía opera en el catabolismo del gluconato, en la organización de los genes y su papel en la fisiología de estos microorganismos. Asimismo se discute la posibilidad de utilizar las características particulares de la vía de Entner-Doudoroff para la detección y control de microorganismos patógenos.

Palabras clave: metabolismo, Vía de Entner-Doudoroff, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Biotecnología Aplicada 2003;20:85-94

ABSTRACT

Carbon Metabolism in Microorganisms of Biomedical and Biotechnological Interest: The Entner-Doudoroff Pathway. In enteric bacteria, like *Escherichia coli*, gluconate catabolism is mainly carry out by the enzymes of the Entner-Doudoroff pathway. Although the presence of this pathway was considered limited to few Gram negative bacteria, now it is known that it is present in a very diverse group of organisms; ranging from Archea Division, Bacteria to the Eucariota. Given the importance of the Entner-Doudoroff pathway in the carbohydrate catabolism, recently the necessity to study deeply the function of this pathway from the point of view of its metabolism as of its regulation has arisen. In this sense, this review integrates the information available in the last 50 years on this pathway mainly in three of the microorganisms of greater biomedical and/or biotechnological importance: *E. coli*, *Zymomonas mobilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Particularly the revision is focused to emphasize the differences in the way in which this pathway operates in the catabolism of the gluconate, the organization of the genes and its role in the physiology of these microorganisms. Also the possibility of using the particular characteristics of the Entner-Doudoroff pathway for the detection and control of pathogenic microorganisms is discussed.

Keywords: metabolism, Entner-Doudoroff pathway, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Introducción

En muchas bacterias con metabolismo oxidativo, el catabolismo de D-gluconato, vía gluconato-6-fosfato, se lleva a cabo principalmente por las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff. Esta vía está formada por la gluconato-6-fosfato deshidratasa (EC 4.2.1.12), codificada por el gen *edd* y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (EC 4.1.2.14), codificada por el gen *eda* [1]. De hecho, la vía de Entner-Doudoroff parece ser una alternativa a la vía Embden-Meyerhof-Parnas [1-3]. La ausencia del proceso normal de glicólisis en la vía Embden-Meyerhof-Parnas en bacterias Archea, indica que la vía de Entner-Doudoroff es la ruta más antigua de utilización de carbohidratos y que la vía Embden-Meyerhof-Parnas funcionó inicialmente como ruta anabólica, demostrando que muchos microorganismos son capaces de generar energía por mecanismos que son completamente independientes al metabolismo central [2-5].

La vía de Entner-Doudoroff fue descubierta primero en *Pseudomonas saccharophila* [6] y años después se encontró en *Escherichia coli* [7] y *Salmonella enterica* serotipo (Typhimurium) [8]. La función primordial de esta vía es aportar piruvato a la célula [1]. Este intermediario metabólico es muy importante, puesto que gran parte del piruvato formado es utilizado para la biosíntesis de aminoácidos, los cuales están involucrados en procesos anabólicos [9, 10].

Las bacterias como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *V. harveyi*, *Zymomonas mobilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Azotobacter vinelandii* y *Xylella fastidiosa*; que presentan la vía de Entner-Doudoroff, son de gran interés biotecnológico [11-14]. De estas bacterias *E. coli* es la que ha sido utilizada mas ampliamente para la producción de proteínas recombinantes, así como para la producción de polímeros, pigmentos, carotenoides, hormonas y etanol entre

1. Fraenkel DG. Glycolysis. Class I Reactions: Generation of Precursor Metabolites and Energy. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Lin EC, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press; 1996. p. 189-98.

2. Conway T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev* 1992; 103:1-28.

3. Peekhaus N, Conway T. What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1998; 180(14):3495-502.

4. Romano AH, Conway T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. In: Regulation of carbon metabolism in bacteria. 14th Forum in Microbiology; 1996; 147(6-7):448-55.

otros [9, 15-17]. No obstante que *E. coli* se ha convertido en el principal modelo de estudio en ingeniería genética, no se conoce por completo su metabolismo en general y menos aún su regulación. *Z. mobilis* es de gran interés para la industria de la producción de etanol, ya que es eficiente para convertir gran parte de la glucosa, existen cepas de *Z. mobilis* capaces de llevar a cabo la fermentación anaerobia de un azúcar como la xilosa a etanol a través de la combinación de las vías de las Pentosas fosfato y la de Entner-Doudoroff [19]. Asimismo, esta bacteria ha sido utilizada para la producción de pigmentos como el β -caroteno [15]. Debido a que *Z. mobilis* es inocua al hombre y a los animales la Food and Drug Administration (FDA, EE. UU.) la ha denominado como microorganismo que es generalmente reconocido como seguro (GRAS), a diferencia de *E. coli* y *P. aeruginosa* [19].

En este sentido, el presente manuscrito incluye una revisión de la información existente sobre el papel de la vía de Entner-Doudoroff en el metabolismo del carbono en los últimos 50 años (1951- 2002), así como las principales diferencias en la organización de la vía y de los genes que participan en tres de los microorganismos de gran interés biomédico y biotecnológico: *E. coli*, *Z. mobilis* y *P. aeruginosa*.

Organización de la vía de Entner-Doudoroff

Muchos microorganismos utilizan la vía de Entner-Doudoroff para el catabolismo de carbono [1-3]. La Tabla 1 muestra la presencia de esta vía en un gran número de microorganismos, en especial aquellos patógenos para el hombre. Solo se muestran aquellos más representativos para cada grupo, los cuales han sido clasificados según Holt *et al.* [42]. A pesar de que se conoce la secuencia del genoma para bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Pyrococcus furiosus* y *Staphylococcus aureus* [43], a la fecha no existe literatura que corrobore la presencia de los genes *edd* y *eda* en estos microorganismos.

En *E. coli*, esta vía opera de manera lineal y es inducida por gluconato [1, 2] el cual es introducido en la célula vía transporte protón simporte y fosforilado por la enzima gluconato cinasa para formar gluconato-6-fosfato [7]. La primer enzima de la vía, la gluconato-6-fosfato deshidratasa, cataliza la conversión del gluconato-6-fosfato para formar la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato; mientras que la segunda enzima, la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa cataliza la ruptura del grupo aldol del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato para formar piruvato y gliceraldehído-3-fosfato [2, 3] (Figura 1). Por lo tanto, los esquemas generales de la vía de Entner-Doudoroff y de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas parecen ser muy similares: fosforilación de azúcares de seis carbonos y rompimiento en dos intermediarios de tres carbonos por enzimas aldolasas [1-3].

En *Z. mobilis* la vía de Entner-Doudoroff es constitutiva y funciona anaeróticamente. Esta vía también opera de manera lineal (Figura 2), pero a diferencia de las bacterias entéricas como *E. coli*, esta es la principal vía para el catabolismo de glucosa, fructosa y sacarosa, dando como productos etanol, ácido láctico y CO₂. En cambio la maltosa,

Tabla 1. Localización de la vía de Entner-Doudoroff.

Organismo	Enzimas	Regulación	Modo	Vías alternas	Referencia
Grupo 1					
<i>Treponema pallidum</i>	EDA*	NC	NC	EMP, PP	20-22
Grupo 2					
<i>Helicobacter pylori</i>	EDD, EDA	C	CC	EMP, PP	20, 21, 23-25
Grupo 4					
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	13, 21
<i>Alcaligenes faecalis</i>	EDD, EDA	NC	NC	NC	26
<i>Azotobacter vinelandii</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	11, 21
<i>Brucella melitensis</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	21
<i>Legionella pneumophila</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	21, 27
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	EDD, EDA	I	L	EMP, PP	21, 28, 29
<i>Neisseria meningitidis</i>	EDD, EDA	I	L	EMP, PP	21, 28
<i>Pseudomonas</i> spp.	EDD, EDA	I	CC	EMP, PP	21, 30, 31
<i>Xylella fastidiosa</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	14, 21, 22
Grupo 5					
<i>Erwinia herbicola</i>	EDA	NC	NC	EMP, PP	21, 31
<i>Escherichia coli</i>	EDD, EDA	I	L	EMP, PP	1-3, 20, 21, 31
<i>Haemophilus influenzae</i>	EDD, EDA	C	NC	EMP, PP	20, 21
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	31
<i>Proteus mirabilis</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	31
<i>Salmonella Typhimurium</i>	EDD, EDA	I	L	EMP, PP	1, 8, 21
<i>Serratia marcescens</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	31
<i>Shigella flexneri</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	21
<i>Vibrio cholerae</i>	EDD, EDA	I	NC	EMP, PP	11, 21
<i>Vibrio harveyi</i>	EDD, EDA	I	NC	EMP, PP	2
<i>Yersinia pestis</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	21, 32
<i>Zymomonas mobilis</i>	EDD, EDA	C	L	NC	2, 18, 33
Grupo 6					
<i>Thermotoga maritima</i>	EDD, EDA	C	M	EMP, PP	4, 5, 21
Grupo 11					
<i>Synechocystis</i> sp. (PCC 6803)	EDA*	NC	NC	EMP, PP	20-22
Grupo 17					
<i>Enterococcus faecalis</i>	EDD, EDA	I	NC	EMP, PP	21, 34
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	EDA*	NC	NC	EMP, PP	21, 22
<i>Streptococcus pyogenes</i>	EDA*	NC	NC	EMP, PP	21, 22
Grupo 18					
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP, PP	2
<i>Bacillus subtilis</i>	EDA*	NC	NC	EMP, PP	20, 22
<i>Clostridium</i> spp.	EDD, EDA	I	M	EMP, PP	21, 35
Grupo 19					
<i>Listeria monocytogenes</i>	EDA*	NC	NC	EMP, PP	21, 22
Grupo 21					
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	EDD, EDA	I	NC	EMP, PP	36
Grupo 24					
<i>Streptomyces coelicolor</i> (A3)	EDA*	NC	NC	EMP, PP	21, 22
Grupo 33					
<i>Halobacterium saccharovororum</i>	EDD, EDA	C	M	PP	4, 21, 37
Grupo 34					
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	EDD, EDA	C	M	PP	4, 21, 37
Grupo 35					
<i>Sulfolobus</i> spp.	EDD, EDA	C	M	PP	4, 5, 21, 37
<i>Thermoproteus tenax</i>	EDD, EDA	C	M	EMP-M	4, 5
Eucariotas					
<i>Aspergillus niger</i>	EDD, EDA	I	M	EMP, PP	38
<i>Penicillium notatum</i>	EDD, EDA	C	M	EMP, PP	39
<i>Entamoeba histolytica</i>	EDD, EDA	NC	NC	EMP-PPDK	40, 41

Abreviaturas: EDD, gluconato-6-fosfato deshidratasa; EDA, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa; EMP, Embden-Meyerhof-Parnas; PP, Pentosas fosfato; EMP-PPDK, EMP-Piruvato fosfato dicinasa; NC, no conocido; I, inducible; C, constitutiva; CC, cíclico; L, lineal; M, modificada; *Solo se ha reportado la presencia de la enzima a partir de alineamiento de genes [20, 43] y de diversos bancos de datos [21, 22]. Grupos bacterianos según Holt *et al.* [42]: 1) Espiroquetas; 2) Bacterias Gram-negativas aerobias/microaerófilas, móviles, helicoidales/vibrioides; 4) Bacilos y cocos Gram-negativos aerobios/microaerófilos; 5) Bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos; 6) Bacterias Gram-negativas, anaerobias, rectas, curvas y helicoidales; 17) Cocos Gram-positivos; 18) Bacilos y cocos Gram-positivos formadores de esporas; 19) Bacilos Gram-positivos no formadores de esporas; 21) Micobacterias; 24) Actinomicetos; 33) Arqueobacterias (halobacterias) halófilas extremas, aerobias; 34) Arqueobacterias carentes de pared celular; 35) Termófilos extremos e hipertermófilos metabolizadores de S². Tomado y modificado de Conway [2].

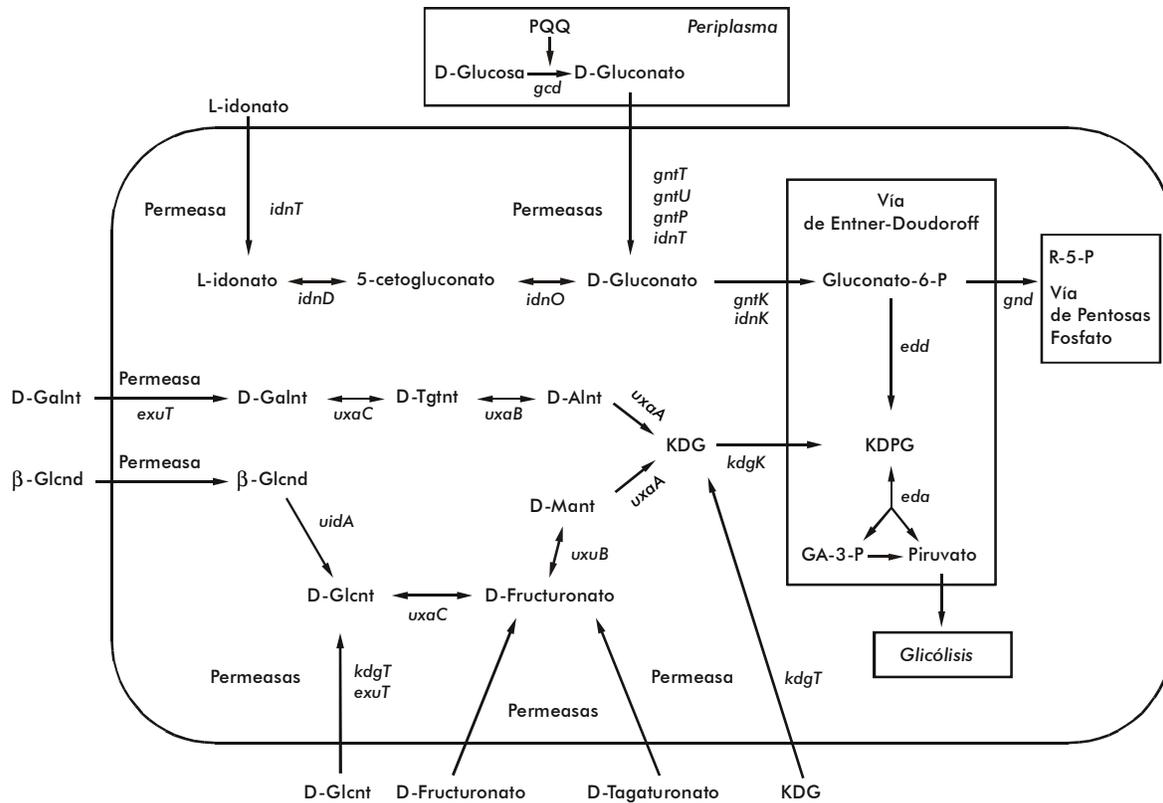


Figura 1. Vía de Entner-Doudoroff y vías alternas para la formación de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato en *E. coli*. Abreviaturas: KDG, 2-ceto-3-desoxigluconato; KDPG, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato; GA-3-P, gliceraldehído-3-fosfato; D-Galnt, galacturonato; D-Tgtnt, tagaturonato; D-Alnt, altronato, D-Mant, manonato; β -Glcnd, glucurónido; D-Glcnt, glucuronato. Genes de enzimas: *gcd*, glucosa deshidrogenasa; *idnK*, gluconocinasa I; *gntK*, gluconocinasa II; *gnd*, gluconato-6-fosfato deshidrogenasa; *edd*, gluconato-6-fosfato deshidratasa; *eda*, 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa; *kdgK*, 2-ceto-3-desoxigluconato cinasa; *idnD*, L-idonato-5-deshidrogenasa; *idnO*, 5-ceto-gluconato reductasa; *uxaA*, D-altronato deshidratasa; *uxaB*, D-altronato oxidorreductasa; *uxaC*, D-galacturonato/D-glucuronato isomerasa; *uxuA*, D-manonato deshidratasa; *uxuB*, D-manonato oxidorreductasa; *uidA*, β -glucuronidasa. Tomado y modificado de Peekhaus y Conway [3].

lactosa, manosa, galactosa, arabinosa, dextrina y manitol no son fermentados por *Z. mobilis* [44]. Esta bacteria carece de la enzima gluconato-6-fosfato deshidrogenasa (vía de Pentosas fosfato) y tiene el ciclo de Krebs incompleto, por lo que la vía de Entner-Doudoroff aporta todos los precursores metabólicos necesarios para los procesos de biosíntesis y generación de energía [2, 18].

En *P. aeruginosa*, la vía de Entner-Doudoroff es la ruta central junto con la vía de las Pentosas fosfato para el catabolismo de glucosa-6-fosfato y gluconato-6-fosfato a partir de glucosa. Esta vía es constitutiva y opera de forma cíclica, ya que el gliceraldehído-3-fosfato producido a partir de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato es reutilizado por enzimas gluconeogénicas para formar gluconato-6-fosfato (Figura 3) [45]. En este paso, la enzima 6-fosfogluconolactonasa (*pgl*) contribuye en gran medida a que la vía de Entner-Doudoroff opere de manera cíclica en esta bacteria [46].

En algunos casos la vía puede estar modificada y utilizar intermediarios no fosforilados. Esta variación fue descrita inicialmente para *Rhodobacter sphaeroides* y algunas especies de *Clostridium*. Las reacciones en esta vía requieren la conversión de gluconato a 2-ceto-3-desoxigluconato por una deshidratasa específica. Posteriormente es fosforilado por una cinasa para formar 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato y ser utilizado

por la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa. Esta misma variación la encontramos en Arqueobacterias halófilas como *Halobacterium saccharovorum*, en donde el metabolismo oxidativo de la glucosa se lleva a cabo vía gluconato [4]. Arqueobacterias hipertermófilas como: *Sulfolobus* y *Thermoproteus* utilizan la vía de Entner-Doudoroff de manera no fosforilada. Sin embargo, el género Eubacteria hipertermófilo *Thermotoga* utiliza de forma convencional las vías Embden-Meyerhof-Parnas y Entner-Doudoroff [5]. Estos estudios sugieren que la vía de Entner-Doudoroff fue la ruta más utilizada en la degradación de carbohidratos por microorganismos ancestrales [4, 5].

En especies del género *Sulfolobus*, la vía de Entner-Doudoroff consta de una enzima gluconato deshidratasa y una 2-ceto-3-desoxigluconato aldolasa las cuales permiten la formación de gliceraldehído y piruvato a partir de glucosa. En *Thermoplasma acidophilum*, el gliceraldehído formado es convertido a glicerato por la gliceraldehído deshidrogenasa y posteriormente el glicerato es fosforilado para formar 2-fosfoglicerato [4].

Papel de la vía Entner-Doudoroff en *E. coli*

El gluconato es una fuente de alimento importante para *E. coli* en el intestino de mamíferos, donde se

5. Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P. Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. Arch Microbiol 1997;167(4):217-32.

6. Entner N, Doudoroff M. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. J Biol Chem 1951;196: 853-62.

7. Eisenberg R, Dobrogosz W. Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1967; 93(3):941-9.

encuentra su ambiente natural [3]. En bacterias como *E. coli* y *S. Typhimurium*, la vía de Entner-Doudoroff es inducida solamente por gluconato extracelular [1, 8] por lo que en las cepas silvestres, ningún otro azúcar es catabolizado por esta vía [1, 47].

En cepas silvestres de *E. coli* las fuentes de carbono como la glucosa son metabolizadas principalmente a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y en forma secundaria a través de la vía de Pentosas fosfato [48, 49]. No obstante, se sabe que cultivos de *E. coli* crecidos en una mezcla de gluconato (o glucuronato) y glucosa, ambas fuentes de carbono pueden ser metabolizadas simultáneamente por la vía de Entner-Doudoroff y por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, respectivamente [7]. Estudios en cepas mutantes de *E. coli* en las que se han inactivado los genes que codifican para enzimas importantes del catabolismo de la glucosa como el sistema de la fosfotransferasa de carbohidratos (sistema PT) [49] y la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*) sugieren que la vía de Entner-Doudoroff pudiera tener un papel relevante en el metabolismo de la glucosa [50, 51].

La vía de Entner-Doudoroff puede ser inducida por la oxidación de glucosa a gluconato en el periplasma (Figura 1) por acción de la enzima glucosa deshidrogenasa (*gcd*) dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ) [52]. *E. coli* solo es capaz de sintetizar la glucosa deshidrogenasa como apoenzima, pero no produce la PQQ como cofactor [53]. Este cofactor es producido de forma natural por otras enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* [54].

Mutantes de *E. coli* carentes de la enzima gluconato-6-fosfato deshidrogenasa (*gnd*) y que por tanto no pueden catabolizar el gluconato-6-fosfato por ninguna otra ruta que la vía de Entner-Doudoroff, crecen a una velocidad similar a la cepa silvestre cultivada en gluconato [55]. En contraste, mutantes en *edd*, crecen muy lentamente en gluconato debido a la utilización de la vía de las Pentosas fosfato [1, 47]. Estudios realizados en organismos carentes del gen *edd*, sugieren que estas especies son capaces de crecer en ácidos hexurónicos (D-galacturonato y D-glucuronato) y hexurónidos (D-glucurónidos y β-galacturónidos) gracias a que cuentan con la enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa [3, 56-58] (Figura 1).

Por otro lado, mutantes en *eda* son incapaces de crecer en gluconato o ácidos hexurónicos [59], ya que ocurre una acumulación de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, un intermediario tóxico en niveles elevados [60]. En consecuencia los dobles mutantes en *edd-eda* son incapaces de crecer en gluconato como única fuente de carbono [1]. Asimismo, el crecimiento en gluconato es bloqueado completamente en dobles mutantes *edd-gnd* [1]. De hecho, la actividad específica de la enzima gluconato-6-fosfato deshidrogenasa en extractos de *E. coli* parece ser independiente de la naturaleza de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento del organismo, mientras que la enzima gluconato-6-fosfato deshidratasa esta presente solo en cantidades traza si el organismo no ha sido crecido previamente en gluconato [61].

Otro aspecto importante es el hecho de que gracias a la presencia de las enzimas gluconato-6-fosfato deshidratasa y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa, *E.*

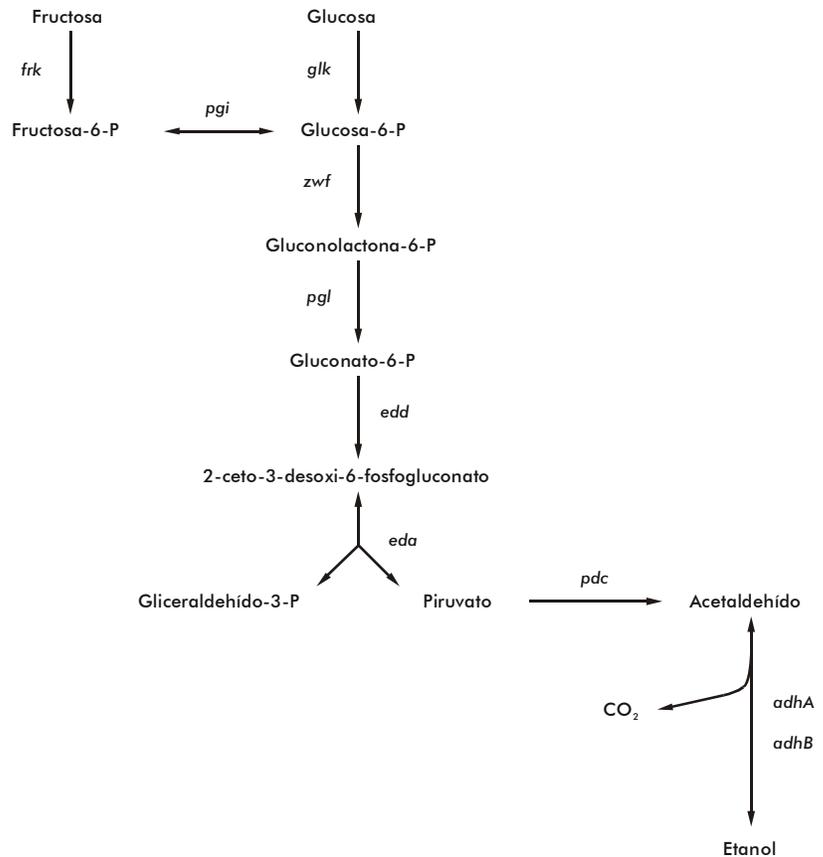


Figura 2. Vía lineal de Entner-Doudoroff en *Z. mobilis*. Abreviaturas: *frk*, fructocinasa; *pgi*, glucosa-6-fosfato isomerasa; *glk*, glucocinasa; *zwf*, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *pgl*, 6-fosfogluconolactonasa; *pdc*, piruvato descarboxilasa; *adhA*, alcohol deshidrogenasa I, *adhB*, alcohol deshidrogenasa II. Otras abreviaturas son citadas en la Figura 1.

coli es capaz de colonizar el intestino de mamíferos utilizando sustratos como D-gluconato, L-idonato, D-glucuronato, D-galacturonato, hexonatos y hexuronatos, contenidos en el moco intestinal [62].

Papel de las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff en *E. coli*

Además del papel que juegan las enzimas de la vía en el catabolismo del gluconato-6-fosfato, la enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa participa en el proceso de detoxificación de metabolitos reactivos como glioxilato, disminuyendo los niveles intracelulares [63]. Además, esta enzima tiene como función catalítica la beta-descarboxilación del oxalacetato, así como la conversión del 4-hidroxi-2-oxoglutarato a piruvato y oxalacetato [22, 64]. En *E. coli*, esta enzima esta conformada por un homotrimer de 66.8 kDa, con 213 aminoácidos por subunidad. El sitio activo presenta los aminoácidos: Glu⁴⁵, Arg⁴⁹ y Lys¹³³, los cuales son esenciales para su actividad catalítica. La secuencia primaria de aminoácidos de esta enzima en *E. coli*, presenta una gran similitud con *Z. mobilis* y *P. putida* (68.4% y 65.4 %, respectivamente) incluyendo los aminoácidos del sitio activo [63]. Esto indica que probablemente también posea una secuencia altamente conservada en otros organismos [64]. En células de *E. coli* con limitaciones de nitrógeno y

8. Fraenkel DG, Horecker BL. Pathways of D-Glucose Metabolism in *Salmonella typhimurium*: A study of a mutant lacking phosphoglucose isomerase. *J Biol Chem* 1964; 239(9):2765-71.

9. Ponce E. Effect of growth rate reduction and genetic modification on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. *J Biosc Bioeng* 1999; 87(6):775-80.

10. Ponce E, Martínez A, Bolívar F, Valle F. Stimulation of glucose catabolism through the pentose pathway by the absence of the two pyruvate kinase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 1998;58(2-3):292-5.

11. Todar K. The Diversity of Metabolism in Prokaryotes [monograph online] Univ. Wisconsin; [53 screens]. Available from: URL: <http://www.bact.wisc.edu/Bact303/Metabolism>.

12. Kommedal R, Bakke R, Dockery J, Stooley P. Modelling production of extracellular polymeric substances in a *Pseudomonas aeruginosa* chemostat culture. *Water Sci Technol*. 2001; 43(6):129-34.

13. Goodner B, Hinkle G, Gattung S, Miller N, Blanchard M, Qurollo B, et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 2001;294(5550):2323-8.

fosfato; células expuestas a dinitrofenol y en cultivos en fase estacionaria se ha observado un nivel elevado de esta enzima [65]. Por otra parte, cepas carentes del gen *eda* son incapaces de reparar los daños causados por la radiación ultravioleta, lo que sugiere que esta enzima participa en el proceso de respuesta del sistema SOS [66]. Asimismo, se ha comprobado que esta enzima se encuentra involucrada en el fenómeno de respuesta a estrés por nutrientes. Este es un mecanismo de adaptación rápida de las actividades celulares al agotarse la fuente de carbono y aminoácidos. En este mecanismo la enzima GTP pirofosfocinasa (RelA) es inducida, lo que provoca un aumento en la expresión del gen *eda* [67].

La enzima gluconato-6-fosfato deshidratasa de *E. coli* está conformada por 602 aminoácidos por subunidad. Es un homodímero de 64.4 KDa y en su secuencia de aminoácidos tiene una similitud del 54.2% con *Z. mobilis* [63]. Hasta el momento, no se ha reportado la caracterización del sitio activo. Finalmente, la expresión del gen *edd* o tal vez un fragmento de la enzima en sí, disminuye los efectos tóxicos que resultan de la sobreexpresión de la proteína chaperona DnaK en *E. coli* [68].

Papel de la vía de Entner-Doudoroff en otros microorganismos

Z. mobilis es una bacteria Gram negativa que durante la evolución se ha especializado para crecer en plantas de savia con alto contenido de azúcares. *Z. mobilis* utiliza la vía de Entner-Doudoroff exclusivamente para la conversión de carbohidratos a piruvato y la posterior descarboxilación de éste por la enzima piruvato descarboxilasa para dar lugar a la producción de etanol [18].

Z. mobilis a través de la vía de Entner-Doudoroff obtiene solo un mol de ATP por mol de glucosa fermentada. Esto hace que este organismo requiera un flujo de carbono rápido [18, 69]. El sistema de transporte de azúcares por difusión facilitada, acoplado a la alta expresión de los genes para las enzimas piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasas I y II (Figura 2), permiten la conversión rápida y eficiente de glucosa a etanol [70, 71]. Cabe mencionar que en *Z. mobilis* las enzimas responsables de los procesos de fermentación componen el 50% del contenido total de proteína soluble [72].

A pesar de su alto flujo de carbono, *Z. mobilis* debe mantener los intermediarios metabólicos tóxicos en niveles bajos sin dejar de proveer los metabolitos precursores requeridos por las vías biosintéticas. Aunque las enzimas glicolíticas y las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff no son inhibidas por etanol, la vía es indirectamente inhibida por la pérdida de cofactores y coenzimas [73]. Este organismo ha mostrado ser ideal para la biocatálisis de la producción de etanol dado su alto rendimiento, tolerancia, alta selectividad de fermentación y productividad específica, así como su habilidad de fermentar azúcares a pH bajo [19].

Los microorganismos agrupados en el género *Pseudomonas* son capaces de utilizar un amplio rango de fuentes de carbono para su crecimiento en diferentes condiciones ambientales. Esto le da la posibilidad de colonizar nuevos habitat, incluyendo

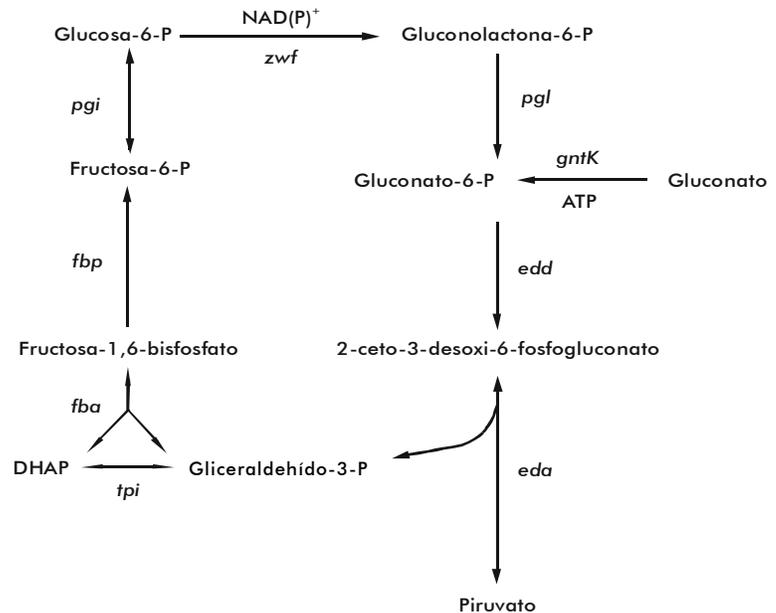


Figura 3. Vía cíclica de Entner-Doudoroff en *P. aeruginosa*. Abreviaturas: DHAP, 1,3-dihidroxiacetona fosfato; *fbp*, fructosa-1,6-bisfosfatasa; *fba*, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; *tpi*, triosa fosfato isomerasa.

aquellos que son tóxicos para la mayoría de los microorganismos, por lo que se encuentran presentes prácticamente en cualquier ambiente. Esta bacteria es capaz de adquirir y desarrollar mecanismos específicos de resistencia natural a compuestos dañinos [74, 75] y a la mayoría de los antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones en humanos [76]. También es un patógeno oportunista, sobretodo de personas con padecimiento de fibrosis quística e inmunodeficientes [77].

Dependiendo de las condiciones fisiológicas, las especies de *Pseudomonas* convierten la glucosa a gluconato-6-fosfato a través de una vía oxidativa o de una fosforilativa. En este sentido, aunque los intermediarios del ciclo de Krebs tales como succinato son utilizados preferencialmente por *P. aeruginosa*, este organismo (como todos los del género) es capaz de utilizar eficientemente la glucosa a través de la vía de Entner-Doudoroff, previa oxidación a gluconato [78].

En *P. fluorescens* la vía de Entner-Doudoroff está relacionada con el catabolismo de D-glucoamina, un carbohidrato involucrado en la síntesis de la pared celular. La D-glucoamina es metabolizada inicialmente a D-glucoaminato para formar 2-ceto-3-desoxigluconato, el cual es entonces utilizado por la enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa de la vía de Entner-Doudoroff [79].

Helicobacter pylori no utiliza gluconato a través de la vía Entner-Doudoroff, de manera que el catabolismo de glucosa se realiza vía gluconato-6-fosfato [23-25]. En esta bacteria, la vía de Entner-Doudoroff opera de forma cíclica junto con la vía de Pentosas fosfato [23]. Estudios fisiológicos han demostrado que en *H. pylori*, las vías de Entner-Doudoroff y Pentosas fosfato son más activas que la de la vía glicolítica [23-25]. En *Neisseria gonorrhoeae*, esta vía es inducida por la

14. Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. Nature 2000;406(6792):151-7.

15. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, editors. Brock Biology of Microorganisms. USA: Prentice-Hall; 1997. p. 514, 704-705.

16. Ingram LO, Conway DP, Sewell GW, Preston JF. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 1987;53(10):2420-5.

17. Sandmann G. Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures. Chem Biochem 2002;3(7):629-35.

18. Viikari L. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. Crit Rev Biotechnol 1988; 3(7):237-61.

19. Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelshtein M, Picataggio S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanogenic *Zymomonas mobilis*. Science 1995;267:240-3.

20. Dandekar T, Schuster S, Snel B, Huynen M, Bork P. Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. Biochem J 1999;343:115-24.

21. Bioinformatics Center Institute for Chemical Research [database online] Kyoto Univ. [10 screens]. Available from: URL: <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>

22. ExPASy (Expert Protein Analysis System) [database online]. Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) [3 screens]. Available from: URL: <http://www.us.expasy.org/sprot/>

adición de suero humano en el medio de crecimiento [80]. Se ha descrito también la presencia de la enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa en bacterias pectinolíticas encontradas en el tracto digestivo de mamíferos rumiantes: *Lachnospira multiparus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Prevotella ruminicola*. Esta enzima es indispensable para metabolizar los oligogalacturónidos, producto de la degradación de la pectina [81, 82]. En especies pectinolíticas como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus polymyxa*, *Erwinia carotovora* y *E. coli*, el D-galacturonato es metabolizado por la vía Entner-Doudoroff modificada, formando como intermediarios 2-ceto-3-desoxigluconato y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato [82].

Entre las bacterias que presentan la vía de Entner-Doudoroff y que también son patógenos para el ser humano están *Shigella dysenteriae* y *S. flexneri*. De todas las especies del género, *S. dysenteriae* tipo 1 es causante de epidemias mortales a escala mundial. Cabe mencionar que los primeros estudios realizados para dilucidar la participación de la vía de Entner-Doudoroff para este género sólo se limitaron al cultivo en diferentes fuentes de carbono [83]. A la fecha, sólo se ha secuenciado por completo el genoma de *S. flexneri*, encontrándose presentes los genes *edd* y *eda* [21, 43].

Organización de los genes de la vía de Entner-Doudoroff

Los genes para las enzimas involucradas en la vía de Entner-Doudoroff han sido clonados y secuenciados, de manera que se conoce la localización en el genoma, así como el tamaño de los transcritos para *E. coli* [84-86], *Z. mobilis* [87, 88] y algunas especies del género *Pseudomonas* [30, 89].

En *E. coli* los genes *zwf*, *edd* y *eda* se encuentran formando un operón (Figura 4 A) [84-86]. A pesar de su cercanía, la expresión de estos genes está regulada de manera diferente. La expresión de *edd* está regulada negativamente por el producto de *gntR*, mientras que el gen *eda* está regulado negativamente por el producto de *kdgR*. Al igual que en *S. Typhimurium*, la expresión del gen *edd* solo ocurre en presencia de gluconato, mientras que la expresión del gen *eda* es constitutiva [1-3, 8]. Sin embargo, en *E. coli* la expresión de *eda* se ve aumentada en presencia de gluconato ó ácidos hexurónicos. En *E. coli* y *S. Typhimurium* los genes *edd* y *eda* son cotranscritos en presencia de gluconato [1-3, 8, 86]. La secuencia de DNA del operón *edd-eda* revela la presencia de cuatro promotores para la expresión del gen *eda* (Figura 4 A). El primer promotor participa en la expresión inducida del operón *edd-eda*, mientras que los promotores 2,3 y/o 4 presentes en la secuencia del gen *edd* son responsables de la expresión constitutiva del gen *eda*. Sin embargo, no se conoce por completo la relación entre los promotores 2, 3 y 4; tampoco la expresión del gen *eda* en presencia de gluconato como inductor [86] (Figura 4 A).

En *Z. mobilis* el gen *edd* forma parte del operón *glf-zwf-edd-glk*, mientras que el gen *eda* se encuentra en un locus aparte (Figura 4 B) [87, 88]. En este mismo orden, los genes de este operón son cotranscritos por un solo promotor. El gen *glf* codifica para una permeasa específica para glucosa y

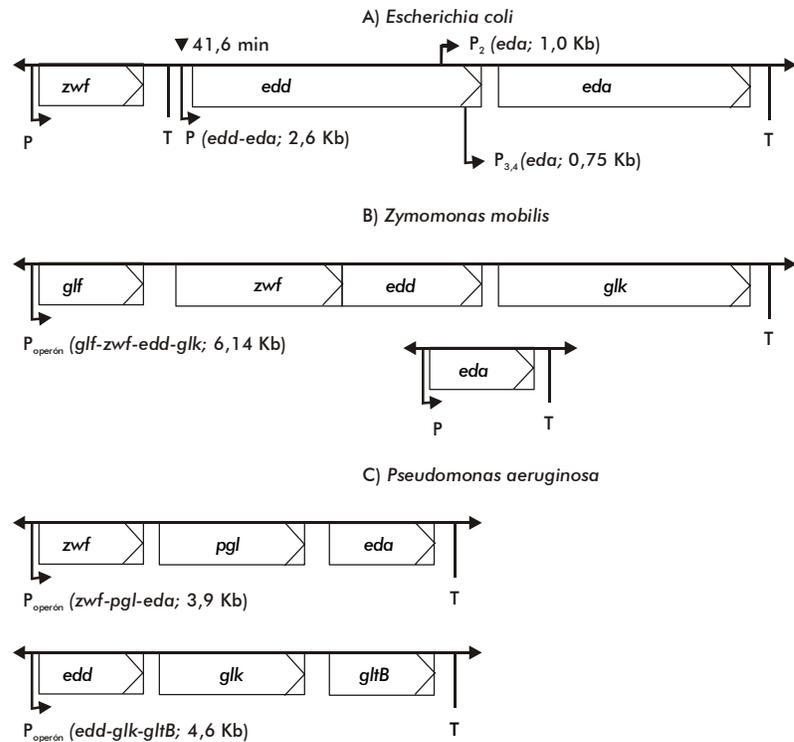


Figura 4. Organización y expresión de los genes de la vía de Entner-Doudoroff. A) *E. coli*; B) *Z. mobilis*; C) *Pseudomonas aeruginosa*. Se indica el tamaño de los transcritos (RNAm) por el respectivo promotor (P) y terminador (T), excepto *eda* en *Z. mobilis*. Solo se indica la localización en el genoma del operón *edd-eda* para *E. coli*. Tomado y modificado de Patil y Dekker [63]; Carter et al. [84]; Conway et al. [85]; Egan et al. [86]; Conway et al. [87]; Liu et al. [88]; Petruschka et al. [91].

fructosa, la cual pertenece a una gran familia de transportadores de glucosa [89]. El gen *zwf* codifica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y *glk* codifica para una glucocinasa [88, 89]. Estudios enzimáticos han mostrado que la actividad de la glucocinasa es el paso limitante más importante del flujo de carbono en esta bacteria [90]. El orden y expresión de los genes que controlan el transporte, utilización de glucosa y los primeros pasos de la vía de Entner-Doudoroff en este microorganismo, proporcionan un mecanismo regulador para los niveles de enzimas que controlan el flujo de carbono a 2-ceto-3-desoxifosfogluconato [18, 69].

Las primeras investigaciones que se realizaron para dilucidar el papel de la vía de Entner-Doudoroff en el género *Pseudomonas* incluyeron a cepas como *P. fluorescens*, *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* y *P. putida* [45]. Recientemente se descubrió que en *P. aeruginosa* (cepa PAO1) y *P. putida* (cepa KT2440), el gen *eda* se encuentra formando parte del operón *zwf-pgl-eda* que da lugar a un transcrito de 3.9 Kb (Figura 4 C) [91]. El gen *pgl* codifica para la 6-fosfogluconolactonasa. En *P. aeruginosa*, los genes *edd* y *eda* están separados por 4 Kb, el gen *gap* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) se encuentra entre estos dos genes. A pesar de que los genes *edd* y *gap* están en estrecha cercanía, son transcritos por promotores distintos [2]. El gen *edd* se encuentra formando parte de otro operón junto con el gen *glk* y *gltB*. Este último gen codifica para la proteína

23. Schilling CH, Covert MW, Famili I, Church GM, Edwards JS, Palsson BO. Genome-Scale Metabolic Model of *Helicobacter pylori* 26695. *J Bacteriol* 2002; 184(16):4582-93.

24. Mendz GL, Hazell SL, Burns, BP. The Entner-Doudoroff Pathway in *Helicobacter pylori*. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312(2):349-56.

25. Kelly DJ. The physiology and metabolism of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Adv Microb Physiol* 1998;40:137-89.

26. DeLey J, Kersters K, Khan-Matsubara J, Shewan JM. Comparative D-Gluconate metabolism and DNA base composition in *Achromobacter* and *Alcaligenes*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1970;36:193-207.

27. Tesh MJ, Morse SA, Miller RD. Intermediary metabolism in *Legionella pneumophila*: Utilization of amino acids and other compounds as energy sources. *J Bacteriol* 1983;154:1104-9.

28. Leighton MP, Kelly DJ, Williamson MP, Shaw JG. An NMR and enzyme study of the carbon metabolism of *Neisseria meningitidis*. *Microbiol* 2001;147(Pt 6):1473-82.

29. Morse SA, Stein S, Hines J. Glucose metabolism in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 1974;120(2):702-14.

30. Cuskey SM, Wolff JA, Phibbs PV Jr, Olsen RH. Cloning of genes specifying carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 1985;162(3):865-71.

de unión a glucosa (Figura 4 C) [2]. La expresión de los genes *zwf*, *eda*, *edd* y *glk*, en las bacterias género *Pseudomonas*, es inducida por el gluconato-6-fosfato [2, 45]. Particularmente en *P. aeruginosa* y *P. putida*, la expresión del operón *zwf-pgl-eda* es inducida por la presencia de glucosa, gluconato y glicerol, los cuales dan lugar a gluconato-6-fosfato [91]. Cabe mencionar que la secuencia de los genes del operón *zwf-pgl-eda* tiene gran semejanza entre *P. putida* (KT2440) y *P. aeruginosa* (PAO1) [91].

Catabolismo del D-gluconato

Para poder catabolizar el gluconato *E. coli* debe introducirlo al citoplasma y fosforilarlo a gluconato-6-fosfato por medio de una cinasa. En este organismo el gluconato-6-fosfato puede ser catabolizado ya sea por la vía de las Pentosas fosfato o por la vía de Entner-Doudoroff [1]. Por lo tanto, para el catabolismo del gluconato se requiere de dos funciones, la realizada por una permeasa y la de una cinasa. Sin embargo, estas funciones son llevadas a cabo por más de una enzima [57]. De hecho, el transporte y fosforilación de gluconato esta conformado por dos sistemas de genes distintos, localizados en diferentes regiones del genoma. Los genes *gntU* y *gntK* se encuentran formando un operón [92-95]. *GntI*, es el sistema central que consiste en una permeasa de alta afinidad (*GntT*), una permeasa de baja afinidad (*GntU*) y una gluconocinasa termorresistente (*GntK*, gluconocinasa II) [22, 92-95]. Además del operón *edd-eda*, los genes *gntT*, *gntU* y *gntK* se encuentran regulados negativamente por el producto del gen *gntR*. *GntII* es el sistema auxiliar que consiste de una permeasa para gluconato (*IdntT*, antes designada como *GntW*) y una gluconocinasa termosensible (*IndK* [antes designada como *GntV*], gluconocinasa I) [22, 48, 92]. Además de los sistemas *Gnt I* y *II*, Peekhaus *et al.* (1997) describen más genes para permeasas de gluconato como: *gntP*, *ORF449*, *dsdX*, *yjhF* y *ORF454* [96].

A diferencia de los genes del operón *edd-eda*, los genes *gntT*, *gntU* y *gntK* se encuentran sujetos al fenómeno de represión catabólica dependiente de AMP cíclico (AMPc) [86, 92, 95]. El gluconato es un carbohidrato que no es transportado por el sistema PT, pero que provoca que se de el mecanismo de represión catabólica. Se sugiere que el gluconato o algún componente del sistema de regulación del gluconato interactúe directa o indirectamente con la enzima adenilato ciclasa y la proteína receptora de AMPc (CRP), provocando la disminución de los niveles de AMPc y CRP [97-99]. La presencia de los genes *gntT* y *gntK* en muchos organismos que no cuentan con *edd*, sugiere que el gluconato puede ser metabolizado a través de la vía de Pentosas fosfato [3].

Con lo que respecta a otros microorganismos, existe un considerable interés en la fisiología y metabolismo de *Z. mobilis*, debido a que es un microorganismo que tiene la capacidad de convertir glucosa a etanol y dióxido de carbono de 3 a 4 veces más rápido que las levaduras utilizadas para este propósito a nivel industrial [33, 100]. Cabe mencionar que, de las dos isoenzimas que catalizan la conversión de acetaldehído a etanol en *Z. mobilis*, solo la alcohol deshidrogenasa II (gen *adhA*) es inhibida por etanol como producto

final [22]. Aunque la vía de Entner-Doudoroff es la principal vía de glucosa a etanol en este organismo también se encuentran presentes las enzimas 6-fosfofructocinasa y la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa [18]. El transporte de glucosa en *Z. mobilis* se realiza a través de un proceso de difusión facilitada, de alta velocidad y baja afinidad [70, 101]. Una vez fosforilada, la glucosa-6-fosfato es convertida a gluconato-6-fosfato por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y finalmente el gluconato-6-fosfato es metabolizado por las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff para dar piruvato y gliceraldehído-3-fosfato [102].

A diferencia de organismos como *E. coli*, *P. aeruginosa* no metaboliza la glucosa a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas debido a que no posee la enzima 6-fosfofructocinasa. Por lo tanto el catabolismo de la glucosa se lleva a cabo a través de la vía de Entner-Doudoroff [78]. Dependiendo de las condiciones fisiológicas en *Pseudomonas* la glucosa es convertida a gluconato-6-fosfato, ya sea a través de una vía oxidativa o de una fosforilativa. La vía oxidativa directa involucra la oxidación de la glucosa a gluconato y 2-cetogluconato en el periplasma por las enzimas glucosa y gluconato deshidrogenasas, respectivamente. De forma alterna, la vía fosforilativa requiere de la incorporación de glucosa por un sistema de transporte inducible. Una vez dentro del organismo es fosforilada por la glucocinasa y convertida a gluconato-6-fosfato por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [103]. En *P. putida* se han descrito dos sistemas enzimáticos diferentes involucrados en el primer paso de la degradación de glucosa vía gluconato: una glucosa deshidrogenasa unida a membrana y un sistema de transporte específico para gluconato (GOTS). Aparentemente la energía para GOTS es derivada solamente del sistema de transporte de electrones y no de ATP [104, 105]. Sin embargo, en otras especies como *P. fluorescens* y *P. ovalis* la oxidación de la glucosa a gluconato es llevada a cabo por la NAD(P)-glucosa deshidrogenasa [106].

Catabolismo del L-idonato

En las bacterias *Erwinia* sp. [107] y *Gluconobacter oxydans* el L-idonato había sido considerado inicialmente solo como un intermediario metabólico en el catabolismo del 2,5-dicetogluconato [108], así como de la formación de ácido tartárico a partir del ácido ascórbico en frutos como la uva [109]. Sin embargo, *E. coli* es capaz de crecer en L-idonato, metabolizándolo inicialmente a D-gluconato [48] (Figura 1). Recientemente se descubrió que el sistema *GntII* contiene los genes involucrados en el catabolismo del L-idonato en el cual el D-gluconato es un intermediario. Hasta el momento, *E. coli* y *Erwinia* sp. (ATCC 39140) son los únicos microorganismos reportados capaces de metabolizar el L-idonato [48, 107]. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otras especies del género *Erwinia* contengan los genes relacionados con el catabolismo de este carbohidrato. Los genes involucrados en el transporte y utilización del L-idonato han sido clonados y secuenciados [48]. Los genes *idnD*, *idnO*, *idnT* e *idnR* forman un operón, mientras que el gen *idnK* (*gntV*) se encuentra en un locus aparte. El gen *idnR* codifica para una proteína represora que regula la

31. Kersters K, DeLey J. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1968; 34:393-408.

32. Mortlock RP. Gluconate metabolism of *Pasteurella pestis*. *J Bacteriol* 1962; 84:53-9.

33. Doelle HW, Kirk L, Crittenden R, Toh H, Doelle MB. *Zymomonas mobilis*-science and industrial application. *Crit Rev Biotechnol* 1993;13(1):57-98.

34. Sokatch JT, Gunsalus IC. Aldonic acid metabolism: I Pathway of carbon in an inducible gluconate fermentation by *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1957; 73:452-60.

35. Bender R, Andreesen JR, Gottschalk G. 2-keto-3-deoxygluconate, an intermediate in the fermentation of gluconate by clostridia. *J Bacteriol* 1971;107(2):570-3.

36. Bai NJ, Pai RM, Murthy PS, Venkitesubramanian TA. Pathways of carbohydrate metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Can J Microbiol* 1976;22(9):1374-80.

37. Danson, MJ. Archaeobacteria: The comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv Microb Physiol* 1988;29:165-231.

38. Elzainy TA, Hassan MM, Allam, AM. New pathway for nonphosphorylated degradation of gluconate by *Aspergillus niger*. *J Bacteriol* 1973;114(1):457-9.

39. Pitt D, Mosely MJ. Enzymes of gluconate metabolism and glycolysis in *Penicillium notatum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1985;51(4):365-84.

40. Entner N. On the pathway of carbohydrate metabolism in *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol* 1958;44:638.

41. Saavedra-Lira E, Ramirez-Silva L, Pérez-Montfort R. Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1382(1):47-54.

42. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9na ed. Maryland, USA: Williams and Wilkins; 1994. 787 pp.

43. National Center for Biotechnology Information [database online]. National Library of Medicine [2 screens]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

44. Swings J, De Ley J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* 1977;41:1-46.

45. Phibbs PV. Genetic analysis of carbohydrate metabolism in *Pseudomonas*. In: Hagedorn SR, Hanson RS, Kunz DA, editors. *Microbial metabolism and the carbon cycle*. New York, NY: Harwood Academic Publishers; 1988. p. 413-436.

46. Hager PW, Calfee MW, Phibbs PV. The *Pseudomonas aeruginosa devB/SOL* homolog, *pgl*, is a member of the hex regulon and encodes 6-phosphogluconolactonase [published erratum appears in *J Bacteriol* 2000;182(19):5639]. *J Bacteriol* 2000;182(14):3934-41.

47. Zaboltny R, Fraenkel, DG. Glucose and gluconate metabolism in a mutant of *Escherichia coli* lacking gluconate-6-phosphate dehydrase. *J Bacteriol* 1967 93(5):1579-81.

expresión del operón *idnT-idnO-idnD* y del gen *idnK*. Este último gen codifica para la enzima gluconato cinasa I; *idnD* codifica para la L-idonato-5-deshidrogenasa; *idnO* codifica para la 5-ceto-D-gluconato-5-reductasa; mientras que el gen *idnT* codifica para una permeasa (Figura 5) [48].

Existen otras vías para la formación de L-idonato. La 2-cetogluconato reductasa de *E. coli*, codificada por el gen *tkrA* (antes designado como *viaE*), ha sido clonada, expresada y caracterizada [22, 110]. Esta enzima citosólica participa en el catabolismo de cetogluconato, ya que cataliza la reducción de 2,5-diceto-D-gluconato a 5-ceto-D-gluconato, de 2-ceto-D-gluconato a D-gluconato y de 2-ceto-L-gluconato a L-idonato [22, 110]. Esta enzima también ha sido purificada y caracterizada en *Brevibacterium ketosoreductum* (ATCC 21914) y se sabe que lleva a cabo las mismas reacciones mencionadas en *E. coli*. Sin embargo, la conversión de 2-ceto-D-gluconato a D-gluconato y de 2-ceto-L-gluconato a L-idonato que ocurren en *B. ketosoreductum* se llevan a cabo en menor grado [111]. Otras bacterias como *P. putida* y *Gluconobacter melanogenus*, además de contener las enzimas que catalizan las reacciones de la vía de la L-sorbosa como en *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 27858) y *Serratia marcescens* (ATCC 27857), son capaces de sintetizar L-idonato a través de la enzima 2-ceto-L-gulonato reductasa. Esta enzima participa en la conversión del 2-ceto-L-gulonato (producto de la oxidación de L-sorbosa) a L-idonato [22, 112].

Microorganismos de importancia biomédica

Muchas de las bacterias patógenas al humano tienen la vía de Entner-Doudoroff. Entre ellas encontramos a *E. coli* O157:H7, *V. cholerae* 01 (Biotipo El Tor), *S. Typhimurim*, *S. dysenteriae* Tipo 1, *Neisseria meningitidis* y *P. aeruginosa*. Esta vía también se encuentra presente en organismos eucariotas como *Entamoeba histolytica*, un protozoo parásito que es causante de amibiasis a escala mundial [113]. La infección causada por *H. pylori* es probablemente la infección bacteriana crónica más común en el mundo. Esta bacteria es causante de gastritis y ulceraciones duodenales en humanos y es considerada como factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma gástrico [114]. Los estudios a nivel enzimático podrían ser aplicados de manera dirigida para el control de bacterias patógenas. Una estrategia a seguir sería inactivar a la enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa para conseguir un efecto bactericida en aquellos organismos que no cuentan con alguna vía alterna para el catabolismo de intermediarios tóxicos como glioxilato y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. Otra manera de lograr este control podría ser mediante la alteración de los diferentes transportadores de carbohidratos y de aquellos procesos enzimáticos que confieren virulencia al microorganismo de manera específica. Tal es el caso de *P. aeruginosa*, en donde se han identificado factores de comunicación intercelular como la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona. Esta señal intercelular controla la expresión de múltiples factores de virulencia [115]. Por último, la bacteria *N. meningitidis*, causante de meningitis, septicemia fulminante y meningococemia, ataca prin-

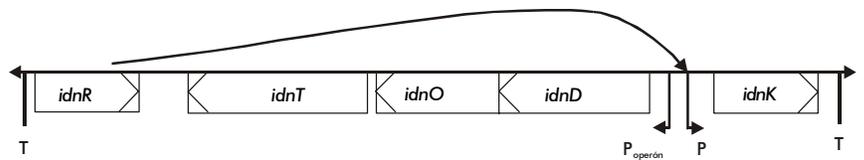


Figura 5. Organización de los genes involucrados en el metabolismo del L-idonato en *E. coli* K-12. El gen *idnR*, codifica para una proteína represora que regula la expresión de los genes *idnD*, *idnO*, *idnT* y del gen *idnK*. Tomado y modificado de Bausch et al. [48].

cipalmente niños y adultos jóvenes. En esta bacteria, ciertos lipopolisacáridos son los responsables de varios de los síntomas desarrollados como choque séptico persistente, falla múltiple de órganos y coagulopatía severa [116].

Conclusiones

La función principal de la vía de Entner-Doudoroff es aportar piruvato, un intermediario metabólico utilizado para la biosíntesis de aminoácidos. Esta vía está ampliamente distribuida en la naturaleza, ya que se encuentra presente en un grupo muy diverso de organismos; escalando desde la división Archea, Bacteria, hasta la Eucariota. La ausencia del proceso normal de glicólisis en Arqueobacterias hipertermófilas, en el que se utilice a la vía Embden-Meyerhof-Parnas, sugiere que la vía de Entner-Doudoroff fue la ruta más utilizada en la degradación de carbohidratos por microorganismos ancestrales. Entre las bacterias de mayor importancia biomédica y biotecnológica que poseen la vía de Entner-Doudoroff y que han servido como modelo de estudio en el metabolismo del carbono se encuentran *E. coli*, *Z. mobilis* y *P. aeruginosa*. Existen diferencias en la manera en la que opera la vía de Entner-Doudoroff en estas tres bacterias, así como en la organización de los genes y su papel fisiológico. Uno de los hallazgos más importantes a nivel fisiológico es el hecho de que *E. coli* sea capaz de colonizar y sobrevivir en el intestino de mamíferos gracias a la presencia de la vía de Entner-Doudoroff. Además del papel que juegan las enzimas de la vía en el catabolismo del gluconato-6-fosfato, la enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa es multifuncional ya que en *E. coli* cataliza diversas reacciones metabólicas y se encuentra involucrada en diversos procesos de respuesta celular. *Z. mobilis* es considerado el mejor organismo productor de etanol en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. mobilis* posee grandes ventajas sobre *S. cerevisiae* con respecto a productividad y a tolerancia al etanol utilizando sacarosa, glucosa y fructosa como única fuente de carbono a través de la vía de Entner-Doudoroff. En lo que respecta al campo biomédico, estrategias como la ingeniería genética pueden utilizarse para la detección y control de microorganismos patógenos como *P. aeruginosa*, entre otros. La capacidad de adaptación que tiene un microorganismo como respuesta a diferentes condiciones bioquímicas y ambientales es reflejo del complejo sistema de regulación a nivel enzimático que posee. Con base en lo anterior, el conocimiento de los genes clave y su papel dentro de las vías metabólicas en microorganismos modelo servirá como punto de referencia para otros menos estudiados.

48. Bausch C, Peekhaus N, Utz C, Blais EM, Lowary T, Conway T. Sequence analysis of the GntII (Subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-Idonic acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1998;180(14):3704-10.

49. García-Ortega AM. Estudio del metabolismo de carbono en cepas carentes del sistema de la fosfotransferasa y de las enzimas piruvato cinasa en *Escherichia coli* [dissertation]. CICESE Ensenada, B. C., México; 2000.

50. Kupor SR, Fraenkel D. Glucose metabolism in 6-phosphogluconolactonase mutants of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1972;247(6):1904-10.

51. Fraenkel DG, Levisohn SR. Glucose and gluconate metabolism in an *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucone isomerase. *J Bacteriol* 1967;93(5):1571-8.

52. Fliege R, Tong S, Shibata A, Nickerson K, Conway T. The Entner-Doudoroff Pathway in *Escherichia coli* is induced for oxidative glucose metabolism via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* 1992;58(12):3826-9.

53. Matsushita K, Arents JC, Bader R, Yamada M, Adachi O, Postma PW. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* 1997;143(Pt 10):3149-56.

54. de Jonge R, Teixeira de Mattos MJ, Stock JB, Neijssel OM. Pyrroloquinoline quinone, a chemotactic attractant for *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178(4):1224-6.

55. Fraenkel DG. Selection of *Escherichia coli* mutants lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase or gluconate-6-phosphate dehydrogenase. *J Bacteriol* 1968;95(4):1267-71.

56. Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Robert-Baudouy J. Isolation of fusions between the *lac* genes and several genes of the *exu* regulon: analysis of their regulation, determination of the transcription direction of the *uxaC-uxaA* operon, in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 1981;182(2):279-87.

57. Klemm P, Tong S, Nielsen H, Conway T. The *gntP* gene of *Escherichia coli* involved in gluconate uptake. *J Bacteriol* 1996;178(1):61-7.

58. Robert-Baudouy J, Portalier R, Stoerber F. Regulation of hexuronate system genes in *Escherichia coli* K-12: multiple regulation of the *uxu* operon by *exuR* and *uxuR* gene products. *J Bacteriol* 1981;145(1):211-20.
59. Faik P, Kornberg HL, McEvoy-Bowe E. Isolation and properties of *Escherichia coli* mutants defective in 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase activity. *FEBS Lett* 1971;19(3):225-8.
60. Fuhrman LK, Wanken A, Nickerson KW, Conway T. Rapid accumulation of intracellular 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate in an Entner-Doudoroff aldolase mutant results in bacteriostasis. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 159(2):261-6.
61. Kornberg HL. Carbohydrate transport by micro-organisms. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1973;183(71):105-23.
62. Blanco C, Ritzenthaler P, Mata-Gilsinger M. Negative dominant mutations of the *uidR* gene in *Escherichia coli*: genetic proof for a cooperative regulation of *uidA* expression. *Genetics* 1986;112(2):173-82.
63. Patil RV, Dekker E. Cloning, nucleotide sequence, overexpression, and inactivation of the *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase gene. *J Bacteriol* 1992;174(1): 102-7.
64. Vlahos CJ, Dekker EE. Active-site residues of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase from *Escherichia coli*. Bromopyruvate inactivation and labeling of glutamate 45. *J Biol Chem* 1990; 265(33):20384-9.
65. VanBogelen R, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt F. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178(15): 4344-66.
66. Cayrol C, Petit C, Raynaud B, Capdevielle J, Guillemont GJ, Defais M. Recovery of respiration following the SOS response of *Escherichia coli* requires RecA mediated induction of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(25):11806-9.
67. Nystrom T. The glucose-starvation stimulation of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. *Mol Microbiol* 1994;12(15):833-43.
68. Rockabrand D, Blum P. Multicopy plasmid suppression of stationary phase chaperone toxicity in *Escherichia coli* by phosphogluconate dehydratase and the N-terminus of DnaK. *Mol Gen Genet* 1995;249(5):498-506.
69. Montenecourt BS. *Zymomonas*, a unique genus of bacteria. In: Demain AL, Solomon, editors. *Biology of Industrial Microorganisms*. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, Inc; 1985. p. 261-89.
70. DiMarco AA, Romano A. D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol* 1985;49:151-7.
71. Ingram LO, Eddy CK, Mackenzie KF, Conway T, Alterthum F. Genetics of *Zymomonas mobilis* and ethanol production. *Dev Ind Microbiol* 1989;30:53-69.
72. Algar EM, Scopes R. Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. *J Biotechnol* 1985; 2:275-87.
73. Osman YA, Ingram LO. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J Bacteriol* 1985;164(1): 173-80.
74. Gibson DT, Hensley M, Yoshioka H, Mabry TJ. Formation of (+)-*cis*, 2,3-hydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 1970;9 (7):1626-30.
75. Collinsworth W L, Chapman PJ, Dagley S. Stereospecific enzymes in the degradation of aromatic compounds by *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 1973;133:922-31.
76. Cunha BA. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Semin Respir Infect* 2002; 17(3):231-9.
77. Speert DP. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Biosci [serial online]* 2002 Oct 1;7:354-61 [35 screens]. Available from: URL: <http://www.bioscience.org/2002/v7/e/speert/list.htm>
78. Lessie T, Phibbs PV Jr. Alternative pathway of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Ann Rev Microbiol* 1984;38:359-87.
79. Iwamoto R, Imanaga Y. Direct Evidence of the Entner-Doudoroff pathway operating in the metabolism of D-glucosamine in bacteria. *J Biochem* 1991;109(1):66-9.
80. Britigan BE, Chai Y, Cohen MS. Effects of human serum on the growth and metabolism of *Neisseria gonorrhoeae*: an alternative view of serum. *Infect Immun* 1985;50(3):738-44.
81. Dušková D, Marounek M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Let Appl Microbiol* 2001;33(2):159-63.
82. Marounek M, Dušková D. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. *Let Appl Microbiol* 1999;29:429-33.
83. Veron M, Le Minor L. Nutrition and taxonomy of "enterobacteriaceae" and related bacteria. III. Nutritional characters and differentiation of the taxonomic groups. *Ann Microbiol* 1975;126(2):111-24.
84. Carter AT, Pearson BM, Dickinson JR, Lancashire, WE. Sequence of the *Escherichia coli* K-12 *edd* and *eda* genes of the Entner-Doudoroff pathway. *Gene* 1993;130(1): 155-6.
85. Conway T, Yi KC, Egan S, Wolf RE Jr, Rowley DL. *E. coli* map: locations of the *zwf*, *edd*, and *eda* genes on the *Escherichia coli* physical map. *J Bacteriol* 1991;173(17):5247-8.
86. Egan S, Fliege R, Tong S, Shibata A, Wolf R Jr, Conway T. Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*: Sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. *J Bacteriol* 1992;174(14):4638-46.
87. Conway T, Fliege R, Jones-Kilpatrick D, Liu J, Barnell WO, Egan SE. Cloning, characterization and expression of the *Zymomonas mobilis eda* gene that encodes 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase of the Entner-Doudoroff pathway. *Mol Microbiol* 1991; 5(12):2901-11.
88. Liu J, Barnell WO, Conway T. The polycistronic mRNA of the *Zymomonas mobilis glf-zwf-edd-glk* operon is subject to complex transcript processing. *J Bacteriol* 1992; 174(9):2824-33.
89. Marger MD, Saier MH Jr. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 1993;18(1):13-20.
90. Barrow KD, Collins JG, Norton RS, Rogers PL, Smith GM. 31P nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. *J Biol Chem* 1984;259(9):5711-6.
91. Petruschka L, Adolf K, Burchhardt G, Denedde J, Jurgensen J, Herrmann H. Analysis of the *zwf-pgl-eda*-operon in *Pseudomonas putida* strains H and KT2440. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215(1):89-95.
92. Tong S, Porco A, Istúriz T, Conway T. Cloning and molecular genetic characterization of the *Escherichia coli gntR*, *gntK*, and *gntU* genes of GntI, the main system for gluconate metabolism. *J Bacteriol* 1996;178(11): 3260-9.
93. Bächli B, Kornberg HL. Genes involved in the uptake and catabolism of gluconate by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1975;90(2): 321-35.
94. Izu H, Kawai T, Yamada Y, Aoshima H, Adachi O, Yamada M. Characterization of the *gntT* gene encoding a high-affinity gluconate permease in *Escherichia coli*. *Gene* 1997; 199(1-2):203-10.
95. Porco A, Alonso G, Istúriz T. The gluconate high affinity transport of GntI in *Escherichia coli* involves a multicomponent complex system. *J Basic Microbiol* 1998;38(5-6):395-404.
96. Peekhaus N, Tong S, Reizer J, Saier MH Jr, Murray E, Conway T. Characterization of a novel transporter family that includes multiple *Escherichia coli* gluconate transporters and their homologues. *FEMS Microbiol Lett* 1997;147(2):233-8.
97. Hogema B, Arents JC, Inada HA, van Dam K, Postma P. Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1997;24 (4):857-67.
98. Peekhaus N, Conway T. Positive and negative transcriptional regulation of the *Escherichia coli* gluconate regulon gene *gntT* by GntR and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J Bacteriol* 1998; 180(7):1777-85.
99. Postma PW, Lengeler, JW, Jacobson GR. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Lin EC, editors. *Escherichia coli and Salmonella*, cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology Press 1996; p. 1149-74.
100. Buchholz SE, Dooley MM, Eveleigh DE. *Zymomonas*: an alcoholic enigma. *TIBTECH* 1987;5:199-204.
101. Parker C, Barnell WO, Snoep JL, Ingram LO, Conway T. Characterization of the *Zymomonas mobilis* glucose facilitator gene product (*glf*) in recombinant *Escherichia coli*: examination of transport mechanism, kinetics and the role of glucokinase in glucose transport. *Mol Microbiol* 1995;15(5):795-802.
102. Barnell, W O., Conway, T. Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of gluconate metabolism. *J Bacteriol* 1990;172 (12):7227-7240.
103. Hunt JC, Phibbs PV Jr. Regulation of alternative peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1983;154(2):793-802.
104. Ciucu A, Patroescu C. Fast spectrometric method of determining the activity of glucose oxidase. *Anal Lett* 1984;17:1417-27.
105. Schleissner C, Reglero A, Luengo J. Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of specific gluconate transport system. *Microbiology* 1997;143:1595-603.
106. Hauge JG. Glucose dehydrogenase-

- particulate. *Methods Enzymol* 1966;9:92-8.
107. Truesdell SJ, Sims JC, Boerman PA, Seymour JL, Lazarus RA. Pathways for metabolism of keto-aldehydic acids in an *Erwinia* sp. *J Bacteriol* 1991;173(21):6651-6.
108. Saito Y, Ishii Y, Hayashi H, Imao Y, Akashi T, Yoshikawa K, *et al.* Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(2):454-60.
109. Malipiero V, Ruffner HP, Rast DM. Ascorbic to tartaric acid conversion in grapevines. *J Plant Physiol* 1987;129:33-40.
110. Yum DY, Lee BY, Hahn DH, Pan JG. The *yiaE* gene, located at 80.1 minutes on the *Escherichia coli* chromosome, encodes a 2-ketoaldonate reductase. *J Bacteriol* 1998;180(22):5984-8.
111. Yum DY, Bae SS, Pan JG. Purification and characterization of the 2-ketoaldonate reductase from *Brevibacterium ketosoreduc-tum* ATCC21914. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62(1):154-6.
112. Makover S, Ramsey GB, Vane FM, Witt CG, Wright RB. New mechanisms for the biosynthesis and metabolism of 2-keto-L-gluconic acid in bacteria. *Biotechnol Bioeng* 1975;17(10):1485-514.
113. Petri W. Pathogenesis of amebiasis. *Curr Opin Microbiol* 2002;5(4):443-7.
114. Polat A, Cinel L, Dusmez D, Aydin O, Egilmez R. Expression of cell-cycle related proteins in *Helicobacter pylori* gastritis and association with gastric carcinoma. *Neoplasma* 2002;49(2):95-100.
115. Collier DN, Anderson L, McKnight SL, Noah TL, Knowles M, Boucher R, *et al.* A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* 2002;215(1):41-6.
116. Brandtzaeg P, Bjerre A, Ovstebo R, Brusletto B, Joo GB, Kierulf P. *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. *J Endotoxin Res* 2001;7(6):401-20.

Recibido en Abril de 2002. Aprobado en Enero de 2003.