

29
179

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



ELEMENTOS METODOLOGICOS PARA LA CLONACION MOLECULAR DEL GENE DE GLUCOSA ISOMERASA DE Bacillus coagulans A Bacillus subtilis

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;
B I O L O G O
P R E S E N T A
ANA MARIA SAN MARTIN TEJEDO

MEXICO, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ABREVIATURAS

A	absorbancia
ADN	ácido desoxiribonucleico
AMP	adenosin monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosin trifosfato
ccc	circulos covalentemente cerrados
D.O.	densidad óptica
EDTA	etilenediaminotetracetato
GI	glucosa isomerasa
GOD	glucosa oxidasa
G ^{+, -}	Gram
Km	constante de Michaelis-Menten
LB	medio Luria
MCP	medio completo de propagación

NAD ⁺	nicotinamido adenin dinucleotido
nm	nanómetros
NRRL	Northern Regional Research Laboratories
NTG	nitrosoguanidina
pb	pares de bases
PEG	polietilenglicol
pg	picogramos
POD	peroxidasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio

INDICE

RESUMEN.....	1
I INTRODUCCION:	
1.- Aspectos generales de ingeniería genética.....	3
a) Enzimas de restricción.....	5
b) ADN ligasa.....	11
c) Vehículos moleculares: Plásmidos.....	14
d) Características de la cepa receptora.....	26
e) Selección y caracterización de recombinantes.....	33
2.- Azúcar y edulcorantes.....	36
a) Jarabes fructosados.....	42
3.- Glucosa isomerasa.....	43
II ANTECEDENTES.....	52
III OBJETIVOS.....	57
IV MATERIAL Y METODOS.....	58
V RESULTADOS Y DISCUSION.....	91
VI CONCLUSIONES.....	142
VII BIBLIOGRAFIA.....	146

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.- Principales pasos en el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante (Lewin, 1985).
- Tabla 2.- Propiedades de las enzimas de restricción (Lathe et al, 1983).
- Tabla 3.- Algunas propiedades fenotípicas acarreadas por plásmidos (Solivar, 1979).
- Tabla 4.- Propiedades de algunos plásmidos naturales (Old, 1981).
- Tabla 5.- Plásmidos de Staphylococcus aureus que se han empleado para transformar Bacillus subtilis (Lofdahl, 1978).
- Tabla 6.- Clasificación de edulcorantes (Inglett, 1981; Dziezak, 1986).
- Tabla 7.- Organismos productores de glucosa isomerasa (Bucke, 1981).
- Tabla 8.- Propiedades de algunas glucosa isomerasas.
- Tabla 9.- Características de la enzima glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660 determinadas en el laboratorio.
- Tabla 10.- Actividad isomerizante de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660 con diferentes concentraciones de xilosa, glucosa y ambas fuentes de carbono juntas en el medio de cultivo.
- Tabla 11.- Propiedades de la enzima glucosa isomerasa de B. subtilis 168 y Bacillus coagulans NRRLB5660.
- Tabla 12.- Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN.
- Tabla 13.- Modificaciones al método de Dubnau.
- Tabla 14.- Establecimiento de condiciones óptimas para el manejo de la técnica de transformación de protoplastos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Experimento típico de clonación. (Rodríguez, 1983).
- Figura 2.- El ADN propio de la célula posee un patrón de metilación que evita su degradación por sus propias enzimas de restricción. El ADN extraño que penetra a esa célula, carece de este patrón y por lo tanto es degradado (Lowin, 1985).
- Figura 3.- Acción de la ADN ligasa. (Lathé et al, 1983).
- Figura 4.- Aplicación del tratamiento con fosfatasa alcalina para prevenir la recircularización del plásmido sin inserción de ADN extranjero (Old, 1981).
- Figura 5.- Mapa de restricción del plásmido pBR 322. Las flechas delgadas muestran la dirección de transcripción de los genes Ap y Tc. La flecha gruesa muestra la dirección de replicación del ADN (Bolívar, 1977).
- Figura 6.- Mapa de restricción del plásmido pC 194 (Horinouchi, 1982).
- Figura 7.- Mapa de restricción del plásmido pHV 33 (Rapaport, 1979).
- Figura 8.- Producción (o) y consumo (x) de azúcar en México (Azúcar, S.A., 1984).
- Figura 9.- Isomerización de glucosa y xilosa por glucosa isomerasa.

Figura 10.- Curva patrón de fructosa.

Figura 11.- Curva patrón de D-ribulosa-o-dinitrofenilhidrazona.

Figura 12.- Curva patrón de albumina sérica bovina.

Figura 13.- Actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660 a diferentes tiempos de incubación de la reacción y a diferentes concentraciones de fructosa como sustrato: 2 M (O), 1 M (Δ) y 0.5 M (O).

Figura 14.- Actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660 con diferentes concentraciones de células.

Figura 15.- Curva de pH óptimo de reacción de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

Figura 16.- Curva de temperatura óptima de reacción de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

Figura 17.- Efecto de la concentración de xilosa como sustrato de reacción sobre la actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

Figura 18.- Curva Lineweaver Burke ajustada por mínimos cuadrados ($r=0.99$, $m=0.52$, $b=0.54$) para afinidad por xilosa de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

- Figura 19.- Efecto de la concentración de fructosa como sustrato de reacción sobre la actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.
- Figura 20.- Curva Lineweaver Burke ajustada por mínimos cuadrados ($r=0.99$, $m=0.092$, $b=0.62$) para afinidad por glucosa de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.
- Figura 21.- Efecto de la concentración de glucosa como sustrato de reacción sobre la actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.
- Figura 22.- Curva Lineweaver Burke ajustada por mínimos cuadrados ($r=0.99$, $m=1.52$, $b=3.01 \times 10^{-3}$) para afinidad por glucosa de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.
- Figura 23.- Curva de termoestabilidad para glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660, en presencia de cofactores (o) y en ausencia (O).
- Figura 24.- Curvas de crecimiento de B. subtilis 168 (A) y su derivada xil (B) en glucosa (x) y xilosa (o). Se uso medio mínimo Spizizen con triptofano 0.001%. La glucosa se añadió al 1% y la xilosa al 2%.
- Figura 25.- Actividad isomerizante de glucosa isomerasa para las posibles cepas receptoras de B. subtilis IA422 y 168, en comparación con la cepa donadora B. coagulans NRRLB5660.

Figura 26.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos pC104 (carril 1) y pSC104 (carril 2); la muestra en cada carril fue de 10 ul de ADN en amortiguador TE. El método de extracción fue el de Kiesselberg (1984).

Figura 27.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de ADN cromosomal de B.coagulans NRRLB5660 extraído por el método de Rodríguez (1983). El carril 3 contiene 1 ul de muestra del ADN disuelto en amortiguador TEN, el carril 2 contiene 5 ul y el 1, 10 ul.

Figura 28.- Transformantes en función de concentración de ADN. Se utilizó plásmido pUB110, se seleccionó en medio de Luria con 7.5 ug/ml de kanamicina y se incubó durante 30'.

Figura 29.- Transformantes en función del tiempo de incubación con ADN. Se usaron las mismas condiciones que la figura anterior.

Figura 30.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pC104 digerido con Hae III. En el carril 2 se encuentra el control sin digerir y en el carril 1 el digerido. La digestión se practicó de acuerdo al método reportado por Bolívar et al (1977).

Figura 31.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de ADN cromosomal de B.coagulans NRRLB5660 digerido con varias enzimas de restricción: carril 1, control sin digerir, carril 2 digerido con Hae III, carril 3 con Eco RI, carril 4 con Pst I, carril 5 con Pst I y carril 6 con Bam HI. La digestión se realizó según el método de Bolívar et al, (1977).

Figura 32.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pHV33 digerido con Pst I, carril 1. El carril 2 muestra el control sin digerir. El método de digestión fue el de Bolívar et al, (1977).

Figura 33.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de ADN cromosomal digerido con Pst I, carril 2. El carril 1 muestra el control sin digerir. El método de digestión fue el de Bolívar et al, (1977).

RESUMEN

La glucosa isomerasa es una enzima intracelular que cataliza la conversión de azúcares de su forma aldo a su forma ceto, incluyendo glucosa y xilosa. Es una enzima producida por una gran cantidad de microorganismos (Bucke, 1983), es generalmente inducible por xilosa, requiere para su actividad de algún metal como cobalto, manganeso o magnesio y es generalmente termoestable dentro de un rango de 40 a 80°C.

La importancia de esta enzima radica en que se emplea industrialmente para la preparación de jarabes fructosados a partir de almidón, los cuales a su vez, tienen importancia en las industrias refresquera, confitera, panadera entre otras.

El gene de glucosa isomerasa así como los genes de otras enzimas de interés industrial, como la amilasa, xilanasas y sacarasa, han sido clonados en E.coli (Cornelis, 1982; Sandhu, 1984; Tsukagoshi, 1984). En B.subtilis se han clonado menor número de genes debido principalmente a que este género carece de plásmidos naturales que confieran alguna característica distinguible, además de que el sistema de clonación en este microorganismo es más reciente y menos conocido aún que el de E.coli. Sin embargo, el interés de clonar en B.subtilis es grande, ya que este es un G⁺, no patógeno, cuyas proteínas pueden purificarse sin contaminación con endotoxina y son excretadas al medio en grandes cantidades (Ehrlich, 1978). Por otro lado, los bacilos son muy importantes en la industria de la fermentación y en la producción de antibióticos y enzimas (Young, 1980).

Este trabajo fue dividido en tres partes. En la primera parte se analizaron las características catalíticas de la enzima proveniente de B.coagulans NRRLB5660, ya que uno de los criterios para el reconocimiento de una cepa recombinante puede ser el encontrar diferencias entre la enzima que se clonó y la del microorganismo receptor. Los resultados se compararon con lo reportado para B.coagulans HN68 (Danno, 1966, 1970) y para B.subtilis 168 (Farres, 1985).

En la segunda parte del proyecto se plantearon las estrategias a seguir en la clonación del gene en B.subtilis. Las estrategias propuestas son dos: La primera involucrará la utilización del plásmido pC104 de S.aureus como vector (Iordanescu, 1975) y a Hae III como enzima de restricción. La cepa receptora será una cepa incapaz de utilizar D-xilosa y con actividad isomerizante reducida.

La segunda estrategia de clonación involucrará el uso de un plásmido bifuncional que permitirá clonar en primera instancia en E.coli para posteriormente ser introducido a B.subtilis. La cepa receptora en E.coli será también una cepa deficiente en su utilización de xilosa y el método de reconocimiento será el mismo que en la estrategia 1.

En la tercera parte del trabajo, se presentan los resultados que permitieron seleccionar el método más adecuado de extracción de plásmidos y ADN cromosomal, determinar la sensibilidad de ambos ADNs a las enzimas restricción necesarias para las estrategias planteadas y finalmente, determinar el método de transformación más adecuado.

El único elemento que falta por adquirir para llevar a cabo la clonación es la cepa receptora.

I INTRODUCCION

1.- ASPECTOS GENERALES DE INGENIERIA GENETICA.

La ingeniería genética, también denominada tecnología de ADN recombinante, es un conjunto de metodologías que permiten trasplantar genes de un sistema vivo a otro, para generar organismos con nuevas propiedades y funciones. Gracias a esta versatilidad, la ingeniería genética ofrece enormes beneficios tanto a las ciencias básicas como a las aplicadas, incluyendo un mejor entendimiento de la biología de los organismos así como avances importantes en áreas de salud, alimentos, energía y contaminación (Braval, 1982).

El surgimiento de la tecnología de ADN recombinante se hizo posible gracias a una serie de descubrimientos independientes que se hicieron a finales de los años sesenta y principios de los setenta como se puede ver en la Tabla 1. A.Chang y S.Cohen, de la Universidad de Stanford, fueron los primeros en hacer un verdadero experimento de clonación (Cohen & Chang, 1973). Ellos usaron el plásmido pSC101 de E.coli que confiere resistencia a tetraciclina como vehículo y otro plásmido de E.coli que confiere resistencia a kanamicina como ADN extranjero y la enzima Eco R1 como enzima de restricción.

Los resultados de sus experimentos hicieron evidente la utilidad de los plásmidos como vehículos. Los trabajos que siguieron a estos, comprobaron que la información genética a clonar podría provenir tanto de bacterias como de hongos, así como de animales y plantas.

Tabla 1

PRINCIPALES PASOS EN EL DESARROLLO DE LA TECNOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE (Lewin, 1985).

1969	Miescher aisló por primera vez el ADN.
1944	Avery provee de la evidencia de que el ADN, más que las proteínas, acarrean la información genética durante la transformación bacteriana.
1953	Watson y Crick proponen el modelo de doble helice del ADN basados en resultados de rayos X de Franklin y Wilkins.
1961	Marmur y Doty descubren la desnaturalización del ADN, estableciendo la especificidad de las reacciones de hibridización de ácidos nucleicos.
1962	Arber provee de la primera evidencia de la existencia de enzimas de restricción del ADN, llevando a su posterior purificación y uso en caracterización de secuencias de ADN por Nathans y Smith.
1967	Gellert descubre la ADN ligasa.
1972-73	Las técnicas de ADN recombinante fueron desarrolladas en los laboratorios de Boyer, Cohen, Berg y colegas en la Universidad de San Francisco y Stanford..
1975-77	Sanger, Barrel, Maxam y Gilbert desarrollaron métodos rápidos para secuenciar ADN.

En resumen, un experimento típico de clonación requiere de (Figura 1):

- 1) ADN de interés llamado ADN extranjero o pasajero.
- 2) Un vehículo de clonación.
- 3) Enzimas de restricción.
- 4) ADN ligasa.
- 5) Un huésped biológico, ya sea procarionte o eucarionte.

Así pues, el primer paso en el experimento es aislar tanto el ADN de interés como el ADN vector. Ambos son tratados con la misma enzima de restricción para que tanto los extremos del ADN vector como los del ADN extranjero sean complementarios y se puedan unir, formando una molécula recombinante. Esta unión se hará gracias a la ADN ligasa. La molécula recombinante se introducirá en el huésped por el proceso de transformación y las cepas recombinantes serán seleccionadas y posteriormente caracterizadas (Bolivar & Backman, 1979).

A continuación analizaremos con más detalle las herramientas empleadas en ingeniería genética.

a) ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan el ADN de doble cadena en lugares específicos (Lathé et al, 1983). Estas enzimas forman parte del sistema de modificación/restricción que poseen muchos microorganismos para proteger su ADN.

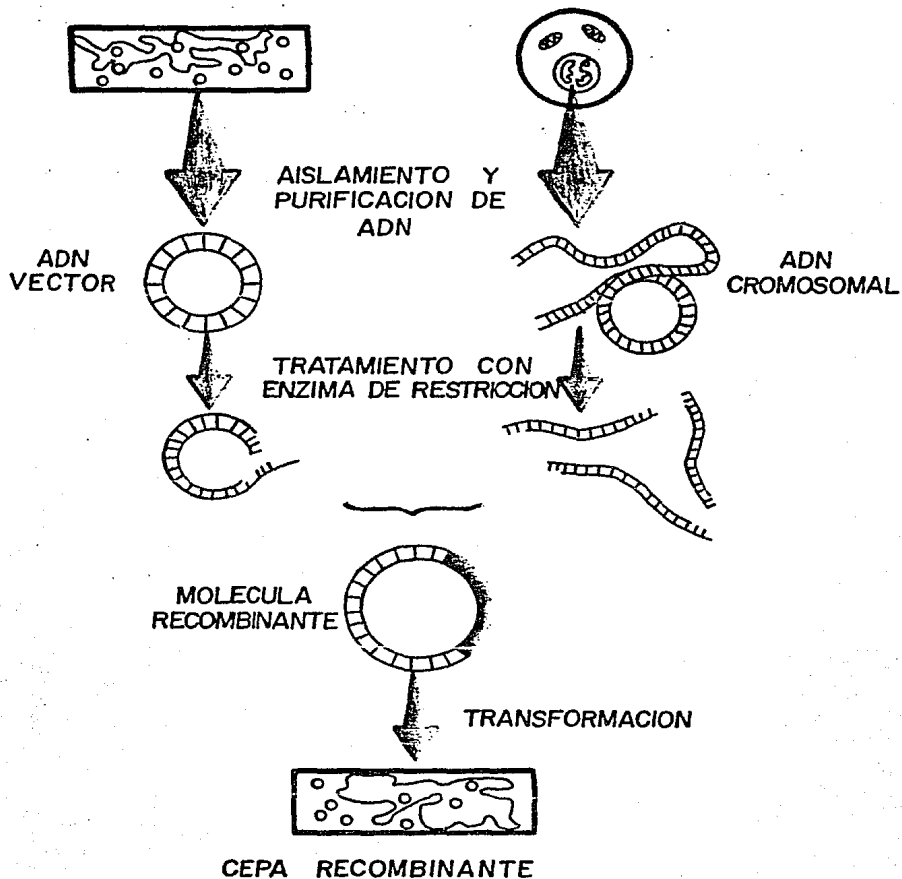


Figura 1.- Experimento tipico de clonación (Rodriguez,1983).

La acción modificadora la contienen ciertas enzimas con actividad de metilasas. Su función es agregar grupos metilo a los residuos de adenina o citosina en la misma secuencia que constituye el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción (Maniatis et al 1985). De esta manera, el ADN residente esta metilado en los sitios adecuados, siendo así inmune al ataque por la actividad de restricción (Figura 2).

Sin embargo, cualquier ADN extraño que entre en la célula, carecerá de dicho patrón de modificación y por lo tanto será cortado y degradado por las enzimas de restricción del huésped. Es así como la combinación del sistema modificación/restricción le permite a la célula distinguir el ADN extraño del propio (Lewin, 1985).

En este contexto, se considera ADN extraño a cualquier ADN que carezca de la misma actividad de modificación y restricción que el huésped. No existe ninguna distinción entre tipo de ADN, esto es, el mismo patrón de modificación tendrá cualquier ADN proveniente de un microorganismo, ya sea este cromosomal o episomal.

Además del sistema de modificación/restricción, las bacterias poseen un sistema de reparación y de recombinación de su ADN. El proceso de recombinación es aquel en el cual grandes segmentos de ADN de doble cadena se mueven de un cromosoma a otro; también se llama recombinación cuando un virus inserta su información genética al cromosoma bacteriano, o bien cuando un elemento transponible hace lo mismo. Otro caso de recombinación ocurre cuando el ADN clonado en un plásmido se integra al cromosoma de la célula receptora.

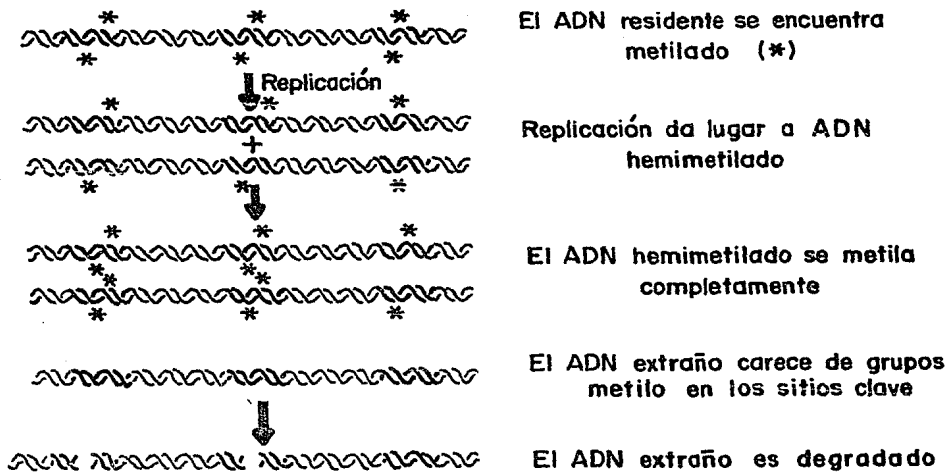


Figura 2.- El ADN propio de la célula posee un patrón de metilación que evita su degradación por sus propias enzimas de restricción. El ADN extraño que penetra a esa célula, carece de este patrón y por lo tanto es degradado (Lewin, 1985).

Existen dos tipos de recombinación: la general y la específica. En la general se necesita que haya homología entre las secuencias que se van a recombinar, mientras que en la recombinación específica, las reacciones de apareamiento dependen de una proteína mediadora que sirva para que las dos secuencias que se van a recombinar se reconozcan. Como resultado, este evento de recombinación usualmente altera el arreglo relativo de secuencias nucleotídicas en los cromosomas. (Lewin, 1985).

Existen tres tipos de enzimas de restricción cuyas características se encuentran resumidas en la Tabla 2 .

Las enzimas del tipo I son las involucradas en el sistema de modificación/restricción. Son moléculas formadas por tres subunidades (R, M, S) cada una encargada de la restricción, la modificación y el reconocimiento de la secuencia respectivamente. Cada subunidad está codificada por un solo gene, denominado hsdR, hsdM y hsdS. Mutantes en el gene hsdR tendrán el fenotipo r₋m₊ y por lo tanto no podrán restringir al ADN, pero sí lo podrán modificar. Las mutantes en el gene hsdS serán r₋m₋ y no podrán ni restringir ni modificar. Las mutantes en el gene hsdM resultan ser r₋m₋, lo cual indica que la subunidad M está involucrada en la función de la subunidad R (Lathe et al, 1983).

Las enzimas del tipo II solo poseen la actividad de restringir. Son moléculas pequeñas, monoméricas que reconocen secuencias pequeñas de 6 a 8 pb que son generalmente palíndromes (la secuencia de nucleótidos se lee igual en ambas cadenas en la dirección 3'-5'). Debido a la especificidad de corte de estas enzimas, se han convertido en herramientas básicas para el manejo del ADN.

Tabla 2

PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (Lathe et al, 1983).

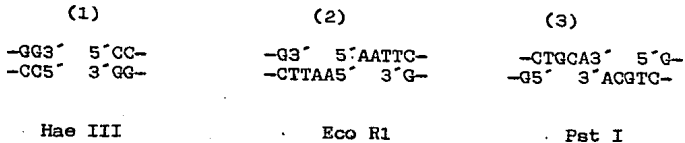
	TIPO I	TIPO II	TIPO III
ESTRUCTURA PROTEICA	Enzima bifuncional de 3 subunidades	Endonucleasa y metilasa separadas	Enzima bifuncional de 2 subunidades
SITIO DE RECONOCIMIENTO	Bipartita y asimétrica.	Secuencia generalmente corta(4-6pb)frecuentemente palíndromes	Secuencia asimétrica de 5-7 pb
SITIO DE CORTE	No es específico > 1000PB del sitio de reconocimiento	El mismo o cerca del sitio de reconocimiento	24-26 pb despues del sitio de reconocimiento
RESTRICCIÓN Y METILACION	Mutualmente excluyentes	Reacciones separadas	Simultaneos
NECESIDAD DE ATP	Si	No	Si

Son tres los tipos de cortes que realizan estas enzimas dentro de la secuencia de reconocimiento (Maniatis et al, 1982):

a) corte en el centro de la secuencia, produciendose extremos "rasurados", como en el caso de la enzima Hae III.

b) a la derecha del centro de la secuencia, formandose extremos "cohesivos" con un residuo 5' fosfato que sobresale, como lo hace la enzima Eco RI.

c) a la derecha del centro para dar lugar a extremos cohesivos con un residuo 3' OH expuesto, como la enzima Pst I.



Las enzimas del tipo III, son al igual que las del tipo I, bifuncionales, aunque en este caso estan formadas por dos subunidades. También existen mutantes que resultan con fenotipos $\underline{r} \underline{m}$, $\underline{r} \underline{m}^+$ y $\underline{r} \underline{m}^-$.

b) ADN LIGASA.

Un paso fundamental en los experimentos de clonación es el unir los fragmentos producidos por las enzimas de restricción para formar una molécula recombinante. Esta unión consiste en juntar un extremo 5' que acarree

un grupo fosfato a un extremo 3' con un grupo hidroxilo reconstituyendose asi el enlace fosfodiester entre dos nucleótidos (Vepdal, 1961).

Las enzimas mas utilizadas in vitro son la ADN ligasa del fago T4 y la de E. coli. Las diferencias entre estas dos enzimas se encuentran básicamente en sus requerimientos. La enzima del fago T4 requiere ATP mientras que la de E. coli requiere NAD^+ . En cada caso, el cofactor se separa y forma un complejo con AMP o NAD^+ . Este complejo se une al pedazo de ADN donde se encuentra el corte y hace una unión fosfodiester, como se muestra en la Figura 3 (Bolivar & Backman, 1979). Otra diferencia entre estas dos enzimas es que la de E. coli solo puede unir extremos cohesivos mientras que la del fago T4 puede unir tanto tanto extremos cohesivos como rasurados (Sgarame-lla et al, 1970).

La reacción catalizada por la ligasa es un proceso que depende de muchos parámetros incluyendo la temperatura, la concentración iónica, el tipo de extremos de ADN (cohesivos o rasurados), la concentración de dichos extremos y la concentración y peso molecular de los fragmentos de ADN.

Para el caso de los extremos cohesivos, la temperatura a la cual la mitad de los extremos se encuentran apareados con sus nucleótidos correspondientes en la otra cadena es de 5°C, mientras que la temperatura óptima para la actividad de la enzima es de 37°C. Sin embargo, a 37°C los puentes de hidrógeno entre los extremos son inestables, de tal forma que la temperatura óptima de reacción es un compromiso entre la temperatura óptima de la ligasa y la temperatura a la cual se unen eficientemente los extremos, generalmente de 22°C.

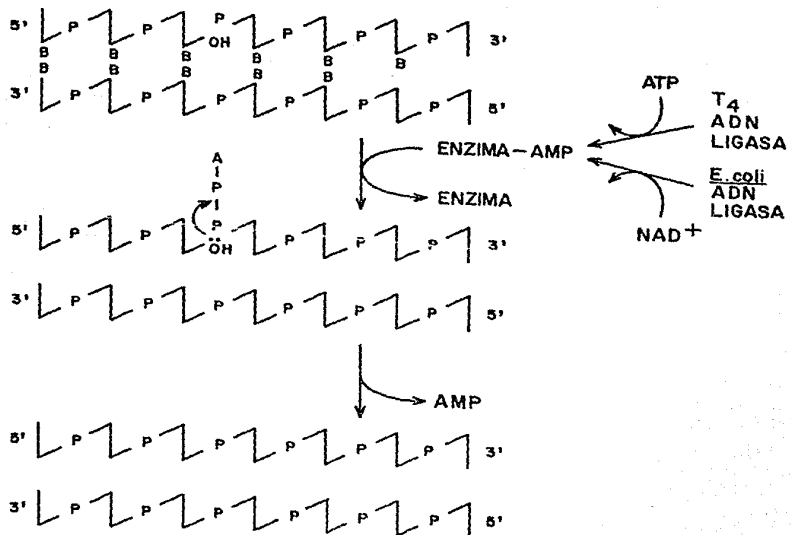


Figura 3.- Acción de la ADN ligasa (Lathé et al, 1983).

La reacción de unión para el caso de los fragmentos de ADN con extremos rasurados es más complicada; esto se debe a que no existe un apareamiento entre bases como en el caso de los extremos cohesivos y por lo tanto, el tiempo en que el grupo 5' fosfato se yuxtapone al 3' hidroxilo es mayor. Además se ha propuesto que en este caso se requieren de dos ADN ligasas, una que sostenga a los extremos en yuxtaposición y otra que catalice la formación del enlace fosfodiéster. Esto hace necesario el elevar grandemente la concentración de ligasa, de 10 a 30 veces, para alcanzar los mismos resultados que en el caso de los extremos cohesivos (Rodríguez, 1983).

La formación de moléculas recombinantes se puede ver favorecida de dos maneras. En primer lugar, la proporción de recombinantes puede aumentarse llevando a cabo la reacción a altas concentraciones de ADN; en segundo lugar, el tratamiento de los vectores linearizados con fosfatasa alcalina para eliminar los grupos fosfato terminales, hace que se prevenga la recircularización y la formación de dímeros de plásmido (Figura 4).

c) VEHICULOS MOLECULARES: PLASMIDOS.

La mayoría de los vectores moleculares que se utilizan hoy en día han sido derivados de replicones extracromosomales tales como plásmidos, bacteriófagos y cósmidos. Analizaremos más a fondo los plásmidos, por ser el vehículo que se empleará para este proyecto.

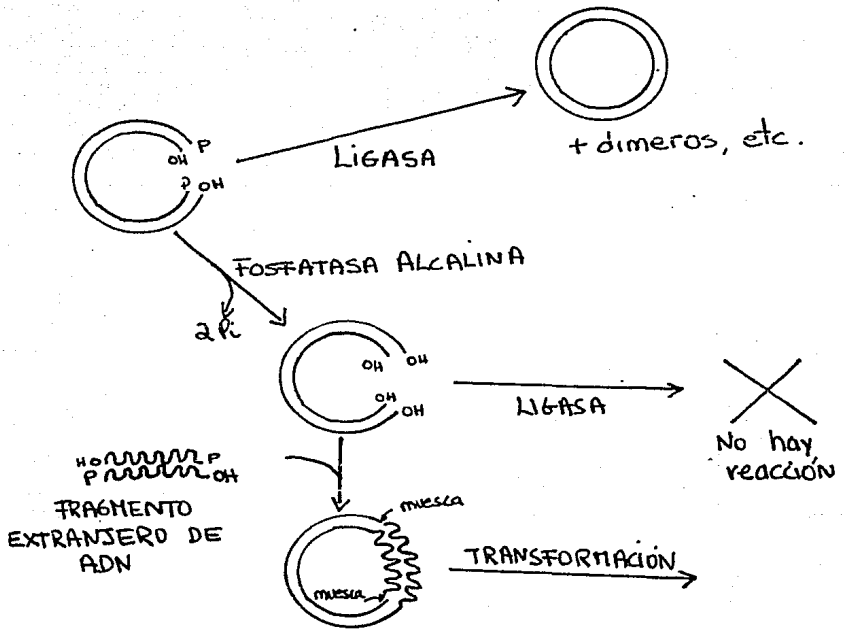


Figura 4.- Aplicación del tratamiento con fosfatasa alcalina para prevenir la recircularización del plásmido sin inserción de ADN extranjero (Old, 1981).

Los plásmidos son moléculas pequeñas de ADN de doble cadena y circulares que son capaces de replicarse en las bacterias independientemente del cromosoma bacteriano (Vepdal, 1981).

Los plásmidos se encuentran ampliamente distribuidos entre los procariontes, varían en tamaño desde menos de 1×10^6 hasta más de 200×10^6 daltones. Algunas de las características fenotípicas que confieren los plásmidos al vector están enlistadas en la Tabla 3. De los plásmidos que no confieren ninguna característica fenotípica a su huésped se dice que son plásmidos crípticos (Old, 1981).

Los plásmidos se pueden clasificar en dos clases: conjugativos y no conjugativos, dependiendo de su carencia o no de los genes llamados "tra" involucrados en la conjugación. También se pueden clasificar en base al número de copias que existan de ellos por célula. Así pues, los plásmidos relajados son los que se encuentran en copias múltiples por célula (30 a 50), mientras que los plásmidos restringidos se encuentran en un número limitado por célula (1 a 5).

Los plásmidos relajados necesitan para su replicación de la actividad de la ADN polimerasa I y se pueden replicar en ausencia de síntesis de proteínas. Los plásmidos restringidos por su parte sí requieren de síntesis de proteínas y de la actividad de la ADN polimerasa III para su replicación (Bolívar & Backman, 1978).

Los primeros experimentos de clonación se hicieron con plásmidos naturales tales como los que se muestran en la Tabla 4 (Chang & Cohen, 1973). Estos plásmidos a pesar de que se podían usar, no contaban con todas las

Tabla 3

ALGUNAS PROPIEDADES FENOTÍPICAS ACARREADAS
POR PLASMIDOS (Bolivar,1979).

Resistencia a antibióticos.
Producción de antibióticos.
Degradación de compuestos aromáticos.
Producción de hemolisina.
Fermentación de azúcares.
Producción de enterotoxina.
Resistencia a metales pesados.
Producción de bacteriocina.
Inducción de tumores en plantas.
Producción de sulfuro de hidrógeno.
Control de modificación y restricción.

Tabla 4

PROPIEDADES DE ALGUNOS PLÁSMIDOS "NATURALES" (Old, 1981).

Plásmido	Tamaño (Mdal.)	Principales Sitios para Endonucleasas	Marcador para selección de transformantes	Inactivación Insercional de
PSC101	5.6	ECORI	Resistencia a Tetraciclina	—
COLE1	4.2	ECORI	Inmunidad a Colicina E1	Producción de Colicina E1
RSF2124	7.4	ECORI	Resistencia a Ampicilina	Producción de Colicina E1
		Bam HI	Resistencia a Ampicilina	Producción de Colicina E1

propiedades deseables en un vector molecular. Por ejemplo, el uso del plásmido pSC 101 se veía limitado por no existir un buen método para reconocer a las recombinantes, a menos que el inserto confiriera una nueva característica fenotípica (Morrow et al, 1971). Por otro lado, el método para reconocer a las transformantes por adquisición de inmunidad a la colicina E1 conferida por el plásmido ColE1 y sus derivados, no era técnicamente nada fácil (Armstrong et al, 1972).

Fue así como se hizo necesaria la construcción in vitro de nuevos vectores tomando como material a los plásmidos naturales. Sin duda alguna, el plásmido artificial más versátil y más ampliamente utilizado ha sido el pBR 322. Este contiene los genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap^r) y a tetraciclina (Tc^r) provenientes de los plásmidos RSF 2124 y pSC 101, respectivamente, combinado con elementos de replicación del pMB1, un plásmido parecido a ColE1. Este plásmido tiene 4362 pb y es cortado por varias enzimas de restricción en ambos genes de resistencia. El mapa de este plásmido de muestra en la Figura 5 (Bolivar et al, 1977).

A partir del pBR322 se siguieron construyendo otros plásmidos, introduciendo en estos un sitio para corte con Eco RI para identificar a las transformantes por inactivación insercional. Esto se logró incorporando al pBR 322 el gene de producción de colicina E1 del plásmido pM31 para dar lugar al plásmido pBR 324 y el gene de resistencia a cloramfenicol del bacteriófago P1 para formar el plásmido pBR 325 (Bolivar, 1978).

Además de los plásmidos de la serie del pBR322 existen otros muchos vectores, que pueden ser utilizados para una variedad enorme de propósitos

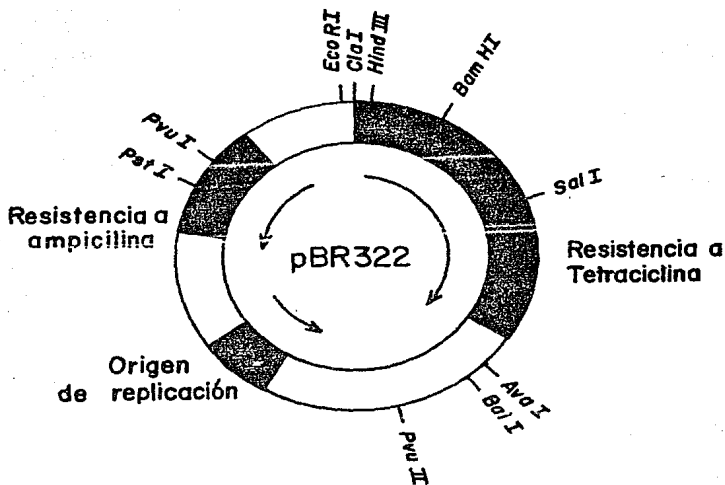


Figura 5.- Mapa de restricción del plásmido pBR 322. Las flechas delgadas muestran la dirección de transcripción de los genes Ap y Tc. La flecha gruesa muestra la dirección de replicación del ADN (Bolívar, 1977).

de clonación. Algunos de estos vectores están diseñados para extender la tecnología de clonación a otros organismos que no sean E. coli. Por ejemplo, existen vectores que funcionan tanto en una variedad de bacterias como en eucariotes, tales como levaduras y células de cultivo de tejido de mamíferos.

B. subtilis posee varios plásmidos crípticos que no han podido ser ampliamente utilizados como vectores por su falta de un fenotipo detectable (Le Hegarat, 1977). Iordanescu (1975) ha encontrado una serie de plásmidos naturales en cepas de Staphylococcus aureus y Ehrlich (1977) ha mostrado que muchos de estos plásmidos son capaces de transformar a Bacillus subtilis. Entre estos plásmidos se encuentra el pC 194 que, como se muestra en la Tabla 5, es un plásmido pequeño que confiere resistencia a cloranfenicol. Esta resistencia es inducida y mediada por la enzima cloranfenicol transferasa (CAT), una enzima que inactiva al cloranfenicol convirtiéndolo en el derivado 3 acetil o 1,3 diacetil cloranfenicol.

Este plásmido es de especial interés debido a:

- a) puede replicarse en un amplio rango de huéspedes bacterianos, incluyendo B. thuringiensis y E. coli.
- b) puede ser usado para clonación analítica de determinantes de resistencia inducible y orígenes de replicación.
- c) puede servir como un sistema útil para estudios de mecanismos de control de la expresión genética, dado que la síntesis de CAT parece estar bajo control autógeno (Horinuchi, 1982). El mapa de este vector se muestra en la Figura 6.

Tabla 5

PLASMIDOS DE Staphylococcus aureus QUE SE HAN EMPLEADO PARA
TRANSFORMAR Bacillus subtilis (Lofdahl, 1978).

PLASMIDO	FENOTIPO CONFERIDO EN EL HUESPED	PESO MOLECULAR (daltones)
pC 194	Resistencia a cloranfenicol	1.6×10^6
pE 194	Resistencia a eritromicina	2.3×10^6
pSA0501	Resistencia a estreptomycinina	2.7×10^6
pUB110	Resistencia a kanamicina	3.0×10^6
pT127	Resistencia a tetraciclina	2.9×10^6

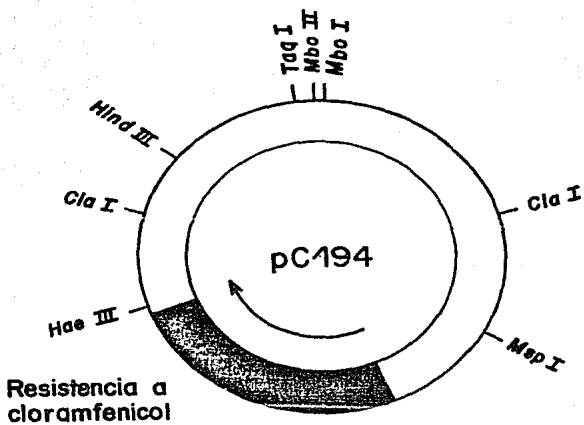


Figura 6.- Mapa de restricción del plásmido pC 194 (Horinouchi,1982).

Al igual que en el caso de los plásmidos de E.coli, los plásmidos para clonar en B.subtilis no poseen todas las características deseables para un vector. Es así como en los últimos años se han venido diseñando plásmidos híbridos formados por partes de dos o más vectores distintos, con las características deseadas en cuanto a sitios únicos de corte, presencia de genes de resistencia a antibióticos fácilmente detectables, etc (Gryzcan et al, 1980; Keggins et al, 1979). Entre estos plásmidos híbridos destacan los que se han construido para clonar tanto en E.coli como en B.subtilis. Esto se logró aprovechando el sitio de corte para Hind III del pC 194 y el mismo sitio de corte en el pBR 322. Ambos plásmidos fueron digeridos con esa misma enzima y ligados, obteniéndose dos plásmidos híbridos, pHV 14 y 15, cuya diferencia se encuentra únicamente en la orientación del pedazo del pC 194 con respecto a del pBR 322. Estos plásmidos fueron capaces de transformar E.coli expresando su resistencia a ampicilina y a cloranfenicol (Old, 1981). También estos replicones transformaron B.subtilis expresándose en este caso solo la resistencia a cloranfenicol. La resistencia a tetraciclina tampoco se expresa en ninguno de los dos huéspedes, debido a que la continuidad del promotor del gene de resistencia a tetraciclina se destruye por la inserción del pC 194 en el sitio de Hind III en el pBR 322. A pesar de esto, se han aislado plásmidos que contienen una mutación puntual, como es el pHV33, o con una delección pequeña, como el pHV 32, las cuales reestablecen al gene de tetraciclina y por lo tanto su expresión. La importancia de estos plásmidos híbridos es grande, ya que se hace posible el estudio de la expresión de un cierto gene en ambos huéspedes. El mapa del plásmido pHV 33 se esquematisa en la Figura 7 (Rapoport et al, 1979).

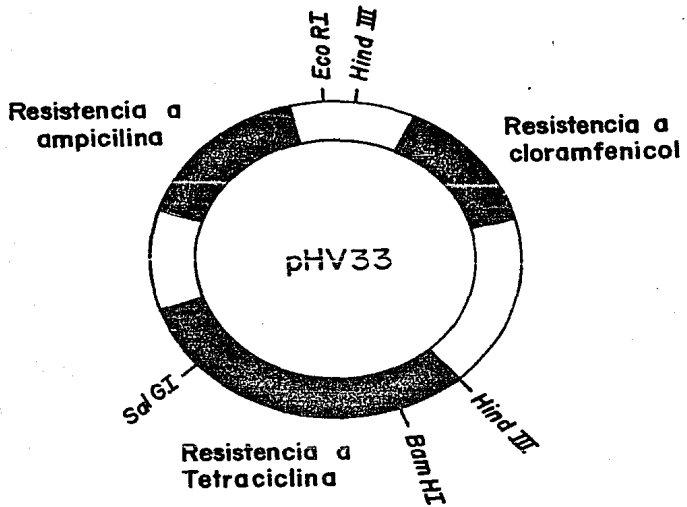


Figura 7.- Mapa de restricción del plásmido pHV 33 (Rapaport,1978).

d) CARACTERISTICAS DE LA CEPA RECEPTORA.

La cepa receptora debe de poseer las siguientes características:

- 1.- Debe de tener un crecimiento rápido en un medio que sea barato para que sea una cepa atractiva para su explotación industrial.
- 2.- No debe ser dañino ni patógeno, por el mismo hecho de que pueda ser explotada comercialmente.
- 3.- Debe ser transformable por ADN. Este punto se tratara profundamente más adelante.
- 4.- La cepa tendrá que ser estable en cultivo, es decir, no mutar ni de-letar con facilidad para que las características adquiridas al transformar no se pierdan.
- 5.- Fenotipo de preferencia r m rec, de esta manera se asegura que el ADN que vaya a entrar a la célula huésped no vaya a ser destruido por las enzimas de restricción propias de esta célula. También es recomendable que la cepa tenga deficiencias en su sistema de recombinación para que el ADN que se clone no se integre al cromosoma y se pierda su control.

Resulta importante ahondar un poco mas sobre el punto 3, el proceso de transformación.

Transformación.

El fenómeno de transformación fue descubierto en bacterias por Griffith en 1928, en el famoso experimento que llevo al descubrimiento del ADN

como molécula de la herencia. Se puede definir como la sustitución de un segmento del cromosoma bacteriano por un segmento de ADN libre presente en el medio ambiente (Venema,1978). Para que esta sustitución ocurra, la molécula de ADN debe entrar a la célula. La condición fisiológica en la cual la célula es capaz de unir y tomar ADN se denomina competencia. Después de haber entrado a la célula, el ADN interactúa con el cromosoma de tal forma que parte del ADN residente es sustituido por parte del de la molécula que ha entrado. Así pues, la transformación bacteriana representa, en principio, uno de los sistemas más simples de recombinación. Es importante hacer notar que el fenómeno de transformación es un fenómeno natural que no está restringido al laboratorio. Durante el crecimiento de los microorganismos, una fuente de material genético para la recombinación, son los fragmentos de ADN liberados a la muerte o a la lisis celular. Desde su descubrimiento en la bacteria Pneumococcus la transformación ha sido observada en una variedad de microorganismos incluyendo Haemophilus pneumoniae, Bacillus subtilis, E. stearothermophilus, H. influenzae y Acinetobacter (Venema,1978).

Transformación en E.coli.

El método para clonar en E. coli es un método artificial, debido a que este microorganismo carece de un mecanismo natural de transformación. La competencia se tiene que inducir tratando especialmente a las células antes de ponerlas en contacto con el ADN (Oishi & Cosloy,1979). El procedimiento involucra la exposición de las bacterias en crecimiento a una solución hi-

potónica de cloruro de calcio a 0°C, ocasionando que la células se hinchen (formación de esferoplastos). El ADN se agrega a esta mezcla, formandose un complejo calcio-ADN resistente a la ADNasa en la superficie celular. Este complejo puede ser tomado por la célula durante un breve pulso de calor a 42°C. Después de unas cuantas horas de crecimiento en medio completo, los esferoplastos se recuperan y los genes transformados se expresan, pudiendose aislar las transformantes plateando en un medio selectivo.

Transformación en E.subtilis.

Existen dos métodos de transformación en E.subtilis: el de células competentes y el de protoplastos. El primero consiste en llevar a las células al estado de competencia en el que serán capaces de tomar ADN del medio. La eficiencia de transformación encontrada por este método es de 1 transformante por 10^3 o 10^4 moléculas de plásmido. Esta baja eficiencia ha sido explicada por Canosi et al (1978), quienes encontraron que la actividad específica de los plásmidos en la transformación en E.subtilis era dependiente del grado de oligomerización del genoma del plásmido, de tal forma que únicamente las formas multiméricas del plásmido son las que transforman mientras que las formas monoméricas lo hacen menos eficientemente.

La razón por la cual los multímeros transforman mejor que los monómeros ha sido dada por de Voss y Venema (1982) en sus investigaciones. Ellos encontraron que las formas monoméricas del plásmido entran a la célula competente en forma de cadena sencilla. Aparentemente esta linearización ocurre por la presencia de una nucleasa en la envoltura celular. La cadena sencilla

que queda dentro de la célula es posteriormente degradada a pedazos más pequeños, aparentemente por otra actividad de nucleasa dentro de la célula. Por otra parte, los plásmidos multiméricos también entran a la célula en forma lineal, sin embargo, estos dan lugar a intermediarios de doble cadena como consecuencia de la recircularización de hebras complementarias derivadas de la misma molécula. Esto trae como consecuencia que estas moléculas de doble cadena no sean degradadas dentro de la célula.

Una consecuencia del requerimiento de plásmidos multiméricos, es el hecho de que se haya tenido muy poco éxito en la obtención de muchas clonas usando a *B. subtilis* competentes como recipiente. El potencial para generar multímeros durante el ligamiento del vector con el ADN extranjero es muy limitada. Si la proporción de ADN extranjero se eleva para aumentar la proporción de recombinantes generadas, la producción de transformantes disminuiría rápidamente por un problema de competencia entre el ligamiento vector-vector y vector-ADN extranjero (Old, 1981).

El segundo método corresponde al uso de polietilén glicol (PEG) para inducir la entrada de ADN en protoplastos, obtenidos por la destrucción de la pared celular con lisozima, y la subsecuente regeneración de la misma (Chang & Cohen, 1979). El procedimiento es altamente eficiente y produce hasta 80% de transformantes. Este método difiere en dos hechos del método de células competentes:

1) se pueden introducir tanto plásmidos lineales como plásmidos circulares no superenrollados construidos por ligamiento *in vitro*, con una frecuencia 10^{-1} - 10^{-3} menor que con plásmidos circulares covalentemente cerrados.

2) mientras que en el método de competencia se puede transformar fácilmente con determinantes genéticos localizados en el cromosoma de B. subtilis, en el método de protoplastos se han obtenido éxitos usando plásmidos.

La alta eficiencia de este método, también ha sido explicada por de Voss y Venema (1979). Según sus estudios, los plásmidos entran a los protoplastos en forma circular de doble cadena, sin haber sufrido ningún daño previo a su entrada. La explicación que dan es que el tratamiento con PEG altera la membrana celular, de tal forma que el plásmido circular covalentemente cerrado puede pasar a través de ella sin sufrir ningún cambio estructural.

Un tercer método de transformación, propuesto por Gryzcan et al (1980) y tendiente a resolver los problemas de la transformación en células competentes, es el denominado "rescate de marcadores". Esta es una alternativa para sobrepasar los problemas de requerimiento de multímeros. Si un plásmido es linealizado por el tratamiento con una enzima de restricción en un sitio único, no se detectan transformantes si la células recipientes están libres de plásmido (Gryzcan et al, 1980). Sin embargo, si el recipiente acarrea un plásmido parcialmente homólogo y si el corte con la enzima ocurre dentro de la zona de homogeneidad, entonces el mismo marcador transforma eficientemente. Este rescate de marcadores del plásmido donador por un plásmido residente homólogo requiere del producto del gene recE y esto se debe a la recombinación entre el ADN lineal donador y el plásmido residente (Contente & Dubnau, 1979). Este método es análogo al método clásico de

transformación en el que los marcadores cromosomales son rescatados por recombinación con el cromosoma residente.

Dado que un ADN linearizado por una enzima de restricción en un sitio único es un monómero, este sistema de rescate sobrepasa el requerimiento de un vector multimérico. Con este método se aumenta la frecuencia de transformación y esto probablemente se deba al rescate del ADN, el cual es dañado por su entrada a la célula. Gracias a este método Gryzcan et al (1980) fueron capaces de clonar varios genes de B.licheniformis en B.subtilis.

e) CEPAS RECEPTORAS.

Los huéspedes que más se han usado son microorganismos que crecen bien y de los cuales se tiene mucha información sobre su genética, como las bacterias E. coli, B. subtilis o la levadura Sacharomyces cerevisiae.

La bacteria E. coli ha sido el microorganismo más empleado para estudios de clonación debido a que se conoce perfectamente su cromosoma, además de que se tienen una gran cantidad de plásmidos disponibles para clonar en ella. Han sido muchos los genes que se han logrado clonar en E.coli, incluyendo, entre otros, los genes de la somatostatina, insulina humana, endorfina, ovalbumina (Itakura et al,1977;Goeddel et al,1979;Shine et al,1980; Mercerau-Puijalón,1979).

Varios huéspedes más se han desarrollado para la expresión de diferentes genes de interés. Especial énfasis se le ha dado al sistema de clonación en B.subtilis, principalmente porque es un organismo no patógeno, G⁺,

que no produce endotoxinas, además de que muchas cepas de Bacillus tienen importancia industrial y muchas secretan grandes cantidades de proteínas extracelulares (Ehrlich, 1978; Young, 1980). Sin embargo, hasta ahora, existen pocos reportes de clonaciones exitosas, sobretodo de genes eucarióticos, a pesar de que la clonación en este organismo este bien establecida.

Uno de los problemas de la clonación en B. subtilis ha sido, además de la falta de plásmidos, la falta de una cepa receptora que tenga fenotipo r⁻ m⁻. Se ha venido empleando una cepa de B. subtilis 168 que posee niveles bajos de restricción, y se están desarrollando cepas con este fenotipo deseado. En el laboratorio contamos con una cepa de B. subtilis Ia422 con fenotipo r⁻ m⁻ rec⁻; se está trabajando sobre ella para convertirla en una cepa deficiente en su utilización de xilosa. Esto se explicará en los resultados de este trabajo.

También existe un esfuerzo considerable por lograr la clonación en organismos usados normalmente en fermentaciones a gran escala como Streptomyces (Suarez et al, 1980) y la levadura Sacharomyces cerevisiae (Struhl et al, 1979). Existen reportes de la clonación de enzimas procarioticas en S. cerevisiae, así como de genes provenientes de esta misma especie. En Streptomyces se ha introducido, entre otros, el gene de albumina (Gray et al, 1984), el de tirosinasa (Katz et al, 1983) así como algunos genes para la producción de antibióticos (Hopwood et al, 1983).

Finalmente, hay un gran interés por usar células eucarióticas para la expresión de proteínas eucarióticas. Esto se está alcanzando utilizando cultivo de células y desarrollando vectores eficientes, principalmente a partir de replicones de virus.

f) SELECCION Y CARACTERIZACION DE RECOMBINANTES.

El siguiente paso despues de haber transformado es el reconocer a las moléculas recombinantes de las no recombinantes. La identificación de plásmidos recombinantes se puede alcanzar usando métodos indirectos o directos.

Los métodos indirectos involucran la búsqueda de transformantes con un fenotipo alterado o un nuevo fenotipo que haya sido conferido por el plásmido recombinante. Los métodos directos involucran:

1) el aislamiento físico y la caracterización del plásmido por enzimas de restricción.

2) la hibridización in vivo o in situ del ADN del plásmido con un sonda complementaria marcada radioactivamente.

3) ensayos inmunológicos.

Usualmente se combinan varios métodos tanto directos como indirectos para reconocer positivamente a una recombinante (Old, 1981).

· Caracterización Fenotípica.

Una vez que se ha transformado con el ADN ligado, se toman alicuotas de la mezcla de transformación y se platican en un medio selectivo con el fin de detectar el crecimiento de células transformadas. Sin embargo, el solo hecho de que una colonia crezca en el medio de selección, no implica que esta contenga el plásmido recombinante. Es por ello que las transformantes iniciales deben ser caracterizadas fenotípicamente y el ADN del plásmido debe de ser extraído de cada una de las transformantes para confirmar la presencia de las moléculas recombinantes. Finalmente, se deberá

transformar de nuevo a la cepa auxotrófica original para mostrar que el marcador fenotípico seleccionado coincide con los marcadores del plásmido (Rodríguez, 1983). Es común encontrarse con más de un fenotipo después del paso de retransformación. Esto puede ser explicado de varias maneras. El plásmido en la transformante original puede ser inestable y recombinar o deletar varias regiones para generar la variación en el fenotipo; la transformante original puede contener más de un plásmido recombinante o pudo haberse dado una mutación espontánea en el cromosoma de la transformante original para dar lugar al fenotipo observado (Vepdal, 1981).

Tomando en cuenta que solo una pequeña fracción de las colonias encontradas en el medio de selección provienen del crecimiento de una sola célula, es importante en el paso de la caracterización el obtener colonias puras. Esto se puede hacer plateando por estría las transformantes para obtener colonias aisladas.

Muchos vectores contienen dos marcadores lo cual permite seleccionar a las recombinantes por inactivación insercional de uno de ellos. Las transformantes se obtienen inicialmente por un marcador que no haya sido afectado por el proceso de clonación. De esas transformantes, las recombinantes serán seleccionadas por su fenotipo en cuanto al marcador que sí ha sido afectado por el proceso de clonación.

Un ejemplo de este tipo de selección lo representa el plásmido pBR322, el cual al ser cortado con la enzima PstI pierde su resistencia a ampíicilina pero no a tetraciclina. Las colonias que hayan crecido en tetraciclina como medio de selección, deberán ser probadas por su sensibilidad a ampíicilina, para reconocer así a las recombinantes.

Caracterización Física:

Aislamiento del plásmido y transformación.

La detección de un plásmido recombinante en una transformante con el fenotipo deseado no es prueba concluyente de que el gene de interés haya sido clonado. Para probarlo, es necesario aislar el plásmido de la transformante recombinante y volver a transformar la cepa original. El cultivo de transformación deberá ser plateado al mismo medio de selección. Así pues, si cada transformante nueva tiene el mismo fenotipo que la transformante de la cual fue purificado el plásmido, es muy probable que el plásmido recombinante sea el responsable de ese fenotipo seleccionado. De todas maneras, aunque tampoco el paso de retransformación sea una prueba directa de que los genes deseados estén contenidos en el plásmido recombinante, si demuestra que el fenotipo deseado está asociado con la presencia del plásmido (Maniatis et al, 1982).

El análisis por enzimas de restricción es otra ayuda para reconocer a las recombinantes. Con la construcción de un mapa de restricción se puede confirmar que los plásmidos contenidos en las transformantes son de hecho moléculas que contienen ADN inserto en los lugares esperados y además puede servir para posteriores caracterizaciones y manipulaciones de las moléculas híbridas.

La identificación de moléculas recombinantes también se puede llevar a cabo por técnicas de hibridización in situ y ensayos inmunológicos.

Uno de los criterios que ayuda al reconocimiento de cepas recombinantes que hayan adquirido el gene de una enzima de interés, es el comparar las características de la cepa donadora, respecto a las de la cepa receptora transformada y sin transformar. Un ejemplo del uso de este criterio de selección ha sido la clonación de la α amilasa de B.licheniformis en E.coli y B.subtilis. Comparando las termoestabilidades de la enzima de la cepa donadora respecto a las de las cepas receptoras tanto en E.coli como en B. subtilis, se pudo asegurar la presencia del gene de B.licheniformis en estas cepas, debido a la similitud que se encontró entre las actividades de las cepas recombinantes y las de la donadora y la diferencia con la receptora.

2.- AZUCAR Y EDULCORANTES.

Son varias las razones que han llevado al hombre a buscar sustitutos del azúcar. En primer lugar, el incremento en la demanda del dulce principalmente por el sector industrial para la producción de refrescos, confitería, repostería, productos farmacéuticos y alimentos enlatados. En segundo lugar, el incremento en su consumo, el cual se calcula que en Estados Unidos ha sido de 118.1 a 126.8 libras por persona en los últimos años (Newsweek, 26 Agosto 1985). En nuestro país, el azúcar es altamente consumido en varias formas principalmente como refrescos. México produce 700 millones de refrescos y se calcula que cada mexicano consume entre 65 y 70 lbs al año (Novedades, 26 Marzo 1985).

La producción azucarera del país tuvo una baja en 1981, pero a partir de ese año ha ido aumentando. Por su parte, el consumo del carbohidrato, también se ha ido incrementando a pesar de que en 1982 hubo un descenso en el consumo (Figura 8). México fue un país exportador hasta 1976 en que hubo necesidad de importar. Sin embargo, parece ser que actualmente se ha llegado a un equilibrio y ya no exportamos pero tampoco necesitamos importar.

Las variaciones en los precios internacionales han sido también decisivas, habiendo subido en 1974 de 10 c/lb a 64 c/lb (precios en dls). En 1981-1982 los precios bajaron a 15 c/lb y se han mantenido, provocado esto, entre otras cosas, por la introducción al mercado de muchos sustitutos (Farres et al, 1982).

Por último, el azúcar se ha estado asociando en los últimos años a enfermedades o trastornos en el hombre, lo que también ha influido para la búsqueda de otras fuentes de dulce. Así pues, existen expertos que afirman que el azúcar puede producir alergias que conduzcan a severos problemas mentales incluyendo el comportamiento violento. Esto no está totalmente comprobado, lo que sí lo está es que el azúcar causa caries. Esta interactúa con las bacterias de la boca y produce ácidos que eventualmente ocasionan agujeros en el esmalte de los dientes (Alfano, 1980). También es bien conocido lo peligroso que es para los diabéticos el consumir azúcar, ya que simplemente no son capaces de metabolizar la glucosa de la dieta.

En general, los edulcorantes pueden dividirse en naturales y sintéticos según su origen (Tabla 6).

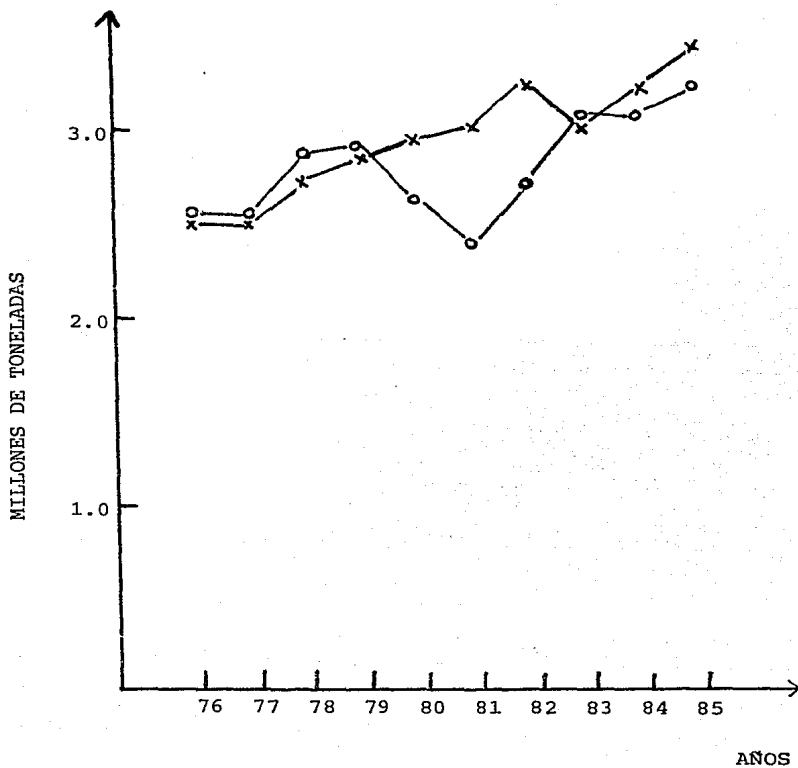


Figura 8.- Producción (o) y consumo (x) de azúcar en México (Azúcar, S.A.,1984).

Tabla 6

CLASIFICACION DE EDULCORANTES (Inglett, 1981; Dziezak, 1986)

Los edulcorantes se clasifican en: NATURALES y SINTETICOS. Los NATURALES son los siguientes:

Edulcorante	Propiedad	Poder Edulcorante
SACAROSA	Carbohidrato compuesto por una unidad de glucosa y una de fructosa. Se obtiene a partir de remolacha y cana de azucar. Tiene aplicaciones en la manufactura de alimentos y su poder edulcorante se toma como patron de comparacion con otros compuestos.	1.0
AZUCAR INVERTIDO	Jarabe obtenido por la hidrólisis de sacarosa. Se emplea en la manufactura de algunos alimentos procesados.	0.7-0.9
GLUCOSA	Monosacarido y hexosa ampliamente empleada. Obtenida por hidrólisis completa de almidón. Provee a los alimentos de ciertas propiedades como ser fermentables, incremento en sabor, aporte nutritivo, dulzor, presión osmótica, viscosidad e higroscopia.	0.7
FRUCTOSA	Monosacarido, hexosa, presente en frutas, vegetales, verduras y miel. Es el carbohidrato mas dulce que se conoce. Se obtiene en forma de cristales y es higroscopica.	1.1
JARABES FRUCTOSADOS	Obtenidos por hidrólisis de almidón. Su aplicacion se encuentra en la fabricacion de refrescos, en panaderia, postres congelados, frutas enlatadas, mermeladas, jarabes y confiteria.	1.0

Tabla 6 (sigue)

CLASIFICACION DE EDULCORANTES.

LACTOSA	Azúcar de la leche formada por glucosa y galactosa. Se emplea en la industria farmacéutica, en la formulación de leches infantiles, y en panadería. No posee sabor propio, incrementa el contenido de sólidos, la textura y la viscosidad, además de acentuar los sabores.	0.4
MONELINA	Proteína de 11,000 daltones formada por dos cadenas polipeptídicas.	2500
TAUMATINA	Proteína de una cadena polipeptídica de 193 a.a. Se extrae de una fruta africana.	1600
SORBITOL	Alcohol hexahídrico, soluble en agua, con sabor dulce que se sintetiza a partir de la hidrogenación a presión de dextrosa. Se utiliza para suavizar los dulces y como aditivo en alimentos dietéticos.	0.5

Los edulcorantes SINTETICOS son:

SACARINA . Es un derivado del petróleo, el anhídrido del ácido sulfimido ortobenzóico, sintetizado químicamente como un polvo cristalino

Tabla 6 (sigue)

CLASIFICACION DE EDULCORANTES.

	blanco muy dulce. Es un edulcorante no nutritivo que se utiliza principalmente como sustituto del azúcar en la fabricación de jarabes, bebidas refrescantes, alimentos dietéticos y en farmacia. Se le asocia con producción de cancer aunque no esta totalmente comprobado.	200-700
CICLAMATOS	Edulcorante sintético no nutritivo como ciclamato de sodio, calcio y potasio. Se obtienen del cicloexilamino. En E.U. su uso se prohibió porque se comprobó que ocasiona trastornos genéticos y cancer en embriones de pollo y rata.	30-60
ASPARTAMO	Obtenido por la unión de fenilalanina y ácido aspártico, en 1981 fue aprobado en E.U. para su uso comercial. Su aplicación se ve limitada porque no se puede calentar.	100-120
ACESULFAMO K	Sal de potasio sintética cristalina y blanca, estructuralmente reminiscente de la sacarina. No es metabolizable ni calórica, no se acumula y se usa típicamente en edulcorantes de mesa, bebidas y productos alimenticios.	200 que una solución 3% de sacarosa

En la actualidad, los edulcorantes nuevos o no convencionales, principalmente los derivados de almidón, tienen una gran aplicación industrial y su consumo se ve aumentado año con año (Inglett, 1981). En Estados Unidos y muchos países de Europa se produce almidón de maíz más barato que la sacarosa de caña de azúcar o remolacha. Los jarabes de glucosa pueden ser producidos económicamente a partir de almidón, pero no rivalizan con la sacarosa en la mayoría de las aplicaciones en alimentos y bebidas, por su inferior dulzor.

a) JARABES FRUCTOSADOS.

En tiempos recientes se han podido producir enzimas a partir de microorganismos usados para convertir glucosa a una mezcla de glucosa y fructosa, lo cual ha aumentado enormemente el interés comercial de la fructosa monomérica.

La principal atracción de la fructosa es su dulzor, 1.2 a 1.8 veces más que la sacarosa en cuanto a peso. El dulzor es muy parecido al de la sacarosa, de tal forma que, sin tomar en cuenta los costos, la fructosa cristalina es una alternativa de bajas calorías para la sacarosa. En la práctica, la fructosa es muy difícil de cristalizar a partir de una solución acuosa y se usan solventes orgánicos lo que aumenta considerablemente los costos de su producción. Así pues, la fructosa cristalina no es competitiva con la sacarosa en cuanto a costos. Sin embargo, la fructosa en solución como un jarabe que contenga glucosa es muy competitivo con la sacarosa (Bucke, 1981). La glucosa isomerasa permite convertir a la glucosa

en una mezcla de glucosa y fructosa resultando esto en un jarabe altamente fructosado, muy barato, que ha tenido mucho éxito al capturar la mayoría del mercado de edulcorantes. Practicamente, el crecimiento en el consumo de edulcorantes en E.U. se debe a un aumento en el consumo de bebidas, principalmente refrescos. En 1965, el consumo de refrescos era de 19.2 galones per capita, mientras que en 1984 se estima que creció a 40.5 galones. En los últimos diez años, los jarabes altamente fructosados se han convertido en el edulcorante dominante de los refrescos, con una producción que se espera que alcance 5 millones de toneladas. Considerando que en 1975 la producción de estos jarabes fue de 500,000 toneladas, se puede apreciar como han mostrado un éxito excepcional y devastador en la industria azucarera estadounidense (Verbanic, 1986).

Entre las ventajas que poseen los jarabes altamente fructosados se encuentran las siguientes (Barker, 1976):

- 1) Son más baratos que la sacarosa.
- 2) El alto contenido de fructosa que poseen los hace similares a los jarabes de sacarosa en dulzor.
- 3) El contenido de monosacáridos (fructosa + glucosa) provee de una presión osmótica alta que evita el crecimiento microbiano.
- 4) Baja viscosidad.
- 5) Transparencia.
- 6) Amplias aplicaciones (ver Tabla 6).

3.- GLUCOSA ISOMERASA.

La glucosa isomerasa es una enzima intracelular producida por mu-

chos microorganismos (Tabla 7) bajo ciertas condiciones de cultivo. Estrictamente hablando la GI es una D-xilosa cetol isomerasa (EC.5.3.1.5) que cataliza la reacción reversible de varios azúcares simples de su forma aldo a su forma ceto, incluyendo glucosa y xilosa (Figura 9). Esta enzima es generalmente inducible por xilosa (Bucke,1981).

La D-xilosa cetol isomerasa participa en la vía metabólica de las pentosas, la cual involucra la isomerización de una aldopentosa a una cetopentosa, su fosforilación y su epimerización a D-xilulosa-5-fosfato. Los pentitales son utilizados por deshidrogenación a una cetopentosa y posteriormente son convertidos de la misma forma a D-xilulosa-5-fosfato. Las reacciones individuales para la utilización de las pentosas y pentitoles es la siguiente (Mortlock & Wood,1964):

METABOLISMO DE LAS ALDOPENTOSAS Y PENTITOLES

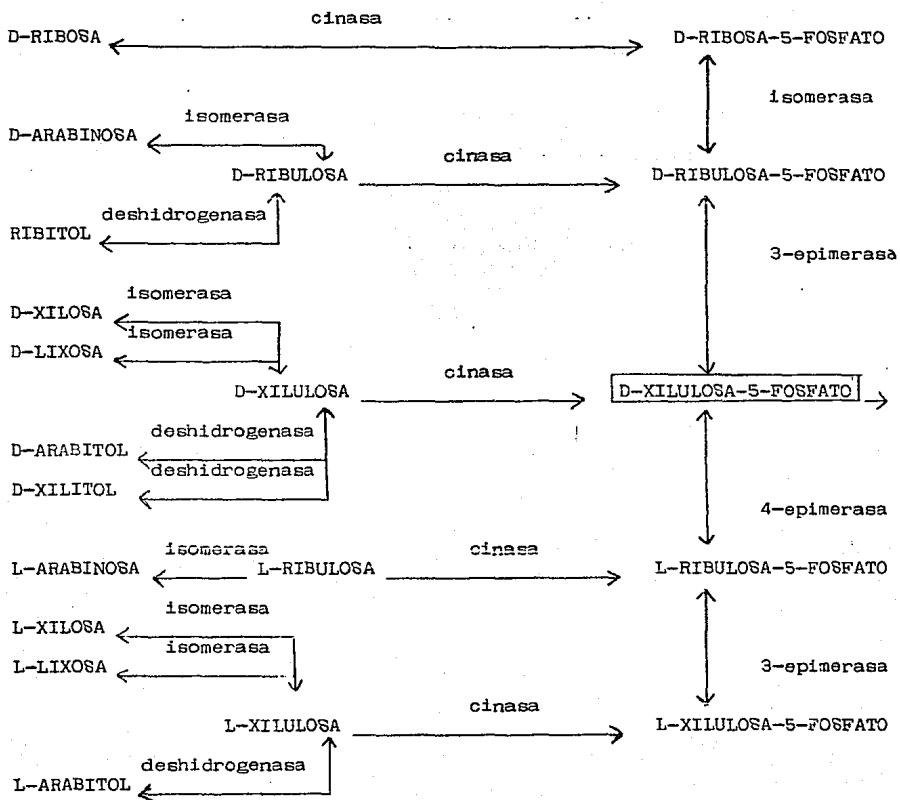


Tabla 7

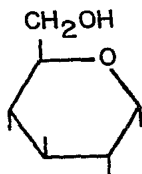
ORGANISMOS PRODUCTORES DE GLUCOSA ISOMERASA (Bucke, 1961).

GENERO	ESPECIE
<u>Streptomyces</u>	<u>bobilai</u> , <u>flavovirens</u> , <u>echinatus</u> , <u>achromogenes</u> , <u>phaeochromogenes</u> , <u>fradiae</u> , <u>roseochromogenes</u> , <u>oli-</u> <u>vaceus</u> , <u>californicas</u> , <u>venuceus</u> , <u>virginal</u> , <u>olivochromogenes</u> , <u>ve-</u> <u>nezulae</u> , <u>wedmorensis</u> , <u>griseolus</u> , <u>glaucescens</u> , <u>bikiniensis</u> , <u>albus</u> , <u>rubiginosus</u>
<u>Lactobacillus</u>	<u>brevis</u> , <u>mannitopeus</u> , <u>pentoace-</u> <u>ticus</u> , <u>gayonii</u> , <u>plantarum</u>
<u>Brevibacterium</u>	<u>pentoso-aminoacidium</u> , <u>imperiale</u> , <u>incertum</u>
<u>Micrococcus</u>	<u>agilis</u>
<u>Pseudomonas</u>	<u>hydrophila</u>
<u>Leuconostoc</u>	<u>mesenteroides</u>
<u>Aereobacter</u>	<u>aerogenes</u> y <u>levanicum</u>
<u>Bacillus</u>	<u>coagulans</u> y <u>stearothermophilus</u>

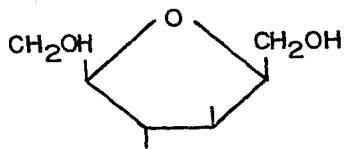
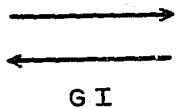
Tabla 7 (sigue)

ORGANISMOS PRODUCTORES DE GLUCOSA ISOMERASA (Bucke, 1981).

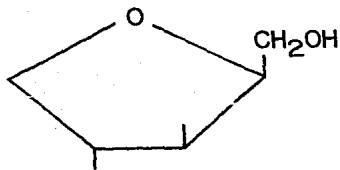
<u>GENERO</u>	<u>ESPECIE</u>
<u>Escherichia</u>	<u>coli</u>
<u>Aspergillus</u>	<u>oryzae</u>
<u>Mycobacterium</u>	
<u>Nocardia</u>	<u>asteroides, dassonvillei, coralia</u>
<u>Micromonospora</u>	<u>rosea, rosea monnitrogenes</u>
<u>Microcellobospora</u>	<u>flavea</u>
<u>Arthrobacter</u>	<u>novo</u>
<u>Actinoplanes</u>	<u>missouriensis</u>



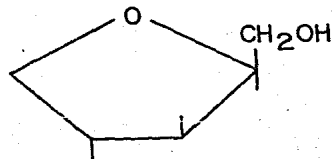
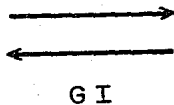
D-glucosa



D-fructosa



D-xilosa



D-xilulosa

Figura 9.- Isomerización de glucosa y xilosa por glucosa isomerasa.

La pentosa L-arabinosa es isomerizada a L-ribulosa, la cual es posteriormente fosforilada a L-ribulosa-5-fosfato. Este fosfato ester es epimerizado en el carbon cuatro para formar D-xilulosa-5-fosfato, el sustrato de la transcetolasa. Similarmente, la L-xilosa y lixosa son isomerizadas a L-xilulosa, la cual es fosforilada a L-xilulosa-5-fosfato. Por epimerización en los carbonos tres y cuatro, este ester es también convertido a D-xilulosa-5-fosfato. Por lo tanto, todos estos isómeros son convertidos a D-xilulosa-5-fosfato por epimerasas.

Han sido varias las GI purificadas cuyas propiedades moleculares y catalíticas se han analizado. En la Tabla 8 se encuentra un resumen de las propiedades de algunas de estas enzimas, incluyendo B.coagulans HN68 (Yoshimura & Danno, 1966; Danno, 1970), lo cual servirá como punto de comparación para los resultados de este trabajo.

En general, la D-xilosa cetol isomerasa es una enzima con un peso molecular entre 117,000 y 191,000, compuesta por lo común por cuatro subunidades. La enzima requiere de un ion divalente como magnesio, manganeso o cobalto para su actividad (Antrim et al, 1979).

La especificidad de la enzima por los distintos azúcares varía según el microorganismo. Tanto L.brevis como B.coagulans HN68 pueden isomerizar D-ribosa (Yamanaka, 1968; Yoshimura & Danno, 1966); Actinoplanes missouriensis isomeriza, además de ribosa, galactosa (Gong, 1960), mientras que el género Streptomyces es generalmente específico para D-xilosa o D-glucosa aunque S.albus es una excepción ya que también isomeriza ribosa, ramosa y arabinosa (Sanchez et al, 1975).

Tabla 8

PROPIEDADES DE ALGUNAS GLUCOSA ISOMERASAS.

PROPIEDAD	MICROORGANISMO			
	<u>L. brevis</u> ¹	<u>S. phaeochromogenus</u> ²	<u>A. missouriensis</u> ³	<u>B. coagulans</u> ⁴
pH optimo	6-6.5	9.3-9.5	7.0	8-8.5
Temperatura optima (°C)	45	90 con Cobalto 60 sin Cobalto	90	60
Requerimiento de metal	Mn ⁺⁺	Mg y Co ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺
Km				
D-xilosa	0.005 M	-	-	0.011 M
D-glucosa	0.92 M	0.3 M	1.33 M	0.09 M
D-ribosa	0.87 M	-	-	0.089 M
D-fructosa	-	-	1.87 M	-
Inhibidores	D-xilitol D-arabitol L-arabitol	Tris Arsenato	-	D-xilitol D-sorbitol
Termoestabilidad	-	60 - 80	-	40 - 80
Peso Mol.	191,000	-	80,000	167,000
Subunidades	4	-	2	4

Fuente: 1 Yamanaka, 1969.
 2 Tsumura, 1985.
 3 Gong, 1980.
 4 Danno, 1962;1970.

La enzima es inhibida, en ciertos casos, por varios azucres como la D-galactosa o la D-arabinosa. Tambien es comun la inhibición por azucres alcohólicos como el D-xilitol, el D-arabitol o D-manitol. A su vez, algunos compuestos como el trisaminometano y ciertos metales, producen dicha inhibición (Bucke,1981).

La GI se considera una enzima estable a la temperatura con un rango bastante amplio, que abarca desde 40°C hasta 80°C aproximadamente. El rango de la estabilidad al pH también es bastante amplio (Bucke,1981;Antrim et al, 1979).

II. ANTECEDENTES

La explotación comercial de enzimas microbianas comenzó bastante antes de que se entendieran su naturaleza y propiedades. Ejemplos de estas antiguas aplicaciones son el uso de extractos de plantas para la hidrólisis de materiales poliméricos, la utilización de extractos de malta para la fabricación de cerveza, así como el uso de estiercol en la manufactura de pieles (Rose, 1980).

Conforme se fueron conociendo más las propiedades de las reacciones catalizadas por enzimas, fueron surgiendo nuevos usos, entre los que podemos mencionar las preparaciones crudas de tejidos animales, como páncreas o mucosa estomacal como fuentes de enzimas aminolíticas y extractos de papaya para obtener actividad proteolítica. Sin embargo, estas fuentes de enzima eran inestables y poco económicas por lo que se intensificó la búsqueda de nuevas fuentes (Research and education association, 1982).

La utilización de bacterias como fuentes de enzima comercialmente importantes comenzó desde principios de siglo. En 1917 se expidieron varias patentes que describían el uso de cepas de *B. subtilis* y *B. mesentericus* para producir amilasas y diastasas. En los años 1950s ya se producían comercialmente diez enzimas: las amilasas con sus aplicaciones en el horneado de pan y fabricación de cerveza, en la producción de jugos de frutas, jarabes de almidón y curativos estomacales; las proteasas, empleadas para la fabricación de cerveza y manufactura de pieles, y otras enzimas con menores aplicaciones como son la pectinasa, lactasa, β -galactosidasa, invertasa, lipasa, celulasa, glucosa oxidasa y catalasa (Miller, 1976).

Otras aplicaciones importantes que estimularon el campo de la producción de enzimas fueron la introducción de las proteasas a los detergentes domésticos principalmente, así como la fabricación de equipos de prueba para diagnósticos clínicos (Wiseman, 1983).

El uso industrial de las enzimas ha encontrado su mayor apoyo en la misma industria de la fermentación, en donde las enzimas tanto intra como extracelulares son empleadas para llevar a cabo una serie de transformaciones. Las ventajas que presentan las enzimas en la fermentación son:

- a) una producción independiente de restricciones geográficas y estacionales.
- b) la posibilidad de utilización de materias primas de fácil adquisición.
- c) los rendimientos de la producción se pueden incrementar en proporción importante al mejorar las cepas microbianas y aplicar las óptimas condiciones de fermentación (Scriban, 1984).

Las principales producciones de enzima son (Scriban, 1984):

Toneladas de enzima pura/año

Proteasas (<u>Bacillus</u>)	500
Glucoamilasa	300
Amilasa (<u>Bacillus</u>)	300
Glucosa Isomerasa	50
Amilasa fungica	10
Pectinasas	10
Proteasa Fungica	10
Renina Microbiana	10

La ingeniería genética tiene hoy en día un papel importante en la producción de enzimas y en la Biotecnología en general, sobre todo si tomamos en cuenta el punto antes mencionado sobre mejoramiento de cepas microbianas (Dale,1983).

De esta manera, la ingeniería genética es empleada por los biotecnólogos para incrementar el repertorio natural de los microorganismos. La meta es usualmente donar un gene para una enzima (o una hormona) de tal forma que el producto de ese gene sea sintetizado desde ese momento por el microorganismo. El papel particular de la tecnología de ADN recombinante es construir o modificar microorganismos para que sirvan como eficientes "fábricas" industriales (Quintero,1983). La manera como se logra aumentar la producción de las enzimas es empleando plásmidos multicopia de tal forma que el gene clonado en uno de estos plásmidos este presente varias veces en la célula y por lo tanto, es de esperarse, que también lo este su producto (Carrier,1983).

Muchos han sido los genes de enzimas comercialmente importantes que se han clonado. Entre estos se encuentra el de xilanasa, α amilasa, sacarasa y B-glucanasa (Sandhu,1984;Cornelis,1982;Tsukagoshi,1984; Cantwell,1983; Fouet, et al,1982). La mayoría se han clonado en E.coli empleando el plásmido pBR 322, el fago λ , o algún cósmido.

Entre los genes que se han logrado clonar en B.subtilis, además de todos los genes que dan resistencia a antibióticos en los plásmidos transformables, se encuentran los genes de α amilasa (amyR2 y amyE+) de B.subtilis (Yamazaki,1983), α amilasa de B.licheniformis (Joyet et al,1984) y de B.

amyloliquefaciens (Palva,1982). El gene de interferón (Palva et al,1983), los genes mal (amilomaltasa) de S.pneumoniae (Espinosa et al,1984) y el gene de resistencia a sulfanilamida de B.subtilis (Orzech,1982) entre otros.

El gene de glucosa isomerasa de E.coli se ha clonado complementando mutantes de D-xilosa negativas tanto de E.coli como de Salmonella typhimurium (Maleza et al,1982). También se ha podido clonar un fragmento de ADN de E.coli que contiene los genes de glucosa isomerasa y de xilulosa quinaasa en el pBR322 (Lawlis et al,1984). Con el uso de un plásmido bifuncional entre E.coli y la levadura Schizosaccaromyces pombe, se logró clonar el gene en ambos huéspedes (Ueng et al,1985). En nuestro laboratorio se clonó el gene de glucosa isomerasa de Actinoplanes missouriensis en una cepa de E.coli incapaz de crecer en xilosa (Farres et al,1988).

Una estrategia ampliamente empleada ha sido la de construir plásmidos bifuncionales que sean capaces de expresarse en dos huéspedes, por ejemplo, E.coli y B.subtilis. Lo que generalmente se ha observado es que los genes de B.subtilis acarreados en estos plásmidos bifuncionales, no son capaces de expresarse en E.coli, mientras que los genes de E.coli si se expresan en ambos huéspedes. También se ha visto que los plásmidos de E.coli son más estables que los de B.subtilis (Rapoport et al,1979).

Estos plásmidos bifuncionales han resultado ser muy utiles para el estudio de la expresión de un determinado gene en ambos huéspedes. La estrategia es primero clonar a E.coli, lo que permite la formación y ampliación de plásmidos circulares covalentemente cerrados estables, y posteriormente subclonar a B.subtilis (Kreft,1979).

La clonación del gene de glucosa isomerasa en B.subtilis, seria de gran importancia ya que este microorganismo es un G⁺, aeróbico, esporulativo filogeneticamente muy distante de E.coli. Un sistema de clonación paralelo al desarrollado en E.coli, permitiría estudios de la clonación del mismo gene en dos, posiblemente muy diferentes ambientes celulares, que podrían ofrecer un mayor entendimiento de los procesos que convierten la información genética en el fenotipo correspondiente (Ehrlich, 1978). Además, B.subtilis es una bacteria no patógena cuyas proteínas pueden purificarse sin miedo a contaminación con endotoxinas y son excretadas en grandes cantidades. Aún más, los bacilos son esenciales en la industria de la fermentación y en la producción de antibióticos y enzimas (Lovett, 1979; Young, 1980).

III OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.-

Establecer la metodología que permitirá clonar el gene de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans a Bacillus subtilis.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1er OBJETIVO.-

Determinar las características catalíticas de la enzima glucosa isomerasa de B.coagulans NRRL B5660.

2- OBJETIVO.-

Establecer las estrategias a seguir para la clonación del gene de glucosa isomerasa de B.coagulans NRRLB5660 en B.subtilis.

3er OBJETIVO.-

Adquirir elementos que permitan la clonación de gene como son:

- a) Establecer metodos de purificación de plásmidos.
- b) Seleccionar métodos de extracción de ADN cromosomal.
- c) Determinar la sensibilidad a enzimas de restricción.
- d) Seleccionar métodos de transformación.

IV MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

- a.- B.coagulans NRRLB5660 fue obtenido de NRRL (Northern Regional Research Laboratories).
- b.- B.subtilis 168 fue proporcionada por W.Burke, de la Universidad de Arizona, en Estados Unidos.
- c.- E.coli RR1 fue proporcionada por el Dr. Fernando Bastarrachea del Centro de Fisiología Celular de la UNAM.
- d.- B.subtilis HVS58 y B.subtilis SB202(HVS58) fueron proporcionadas por S.D.Ehrlich del Instituto Pasteur, Francia.
- e.- E.coli SK1592 fue proporcionada por G.Rapoport, de la Universidad de Paris.
- f.- El plásmido pUB110 empleado en las pruebas de transformación, fue proporcionado por Amelia Farres del mismo laboratorio.

MEDIOS DE ALMACENAMIENTO Y CRECIMIENTO.

- a.- B.coagulans se conservó en placas con el medio de propagación (MCP) cuya composición es la siguiente:

MCP

Bactopeptona	1 %
Extracto de carne	0.5 %
Extracto de Levadura	0.5 %
NaCl	0.25 %
Agar	0.18 %

El medio de crecimiento fue el reportado por Danno (1966) cuya composición es la siguiente:

a.- Extracto de levadura	0.3 %
NH_4Cl	0.3 %
K_2HPO_4	0.1 %
Agua	700 ml

b.- D- xilosa o D- glucosa	1 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 %
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 %
Agua	300 ml

c.- CaCO_3 disuelto en agua al 0.2 %.

a, b y c se esterilizan por separado y se mezclan justo antes de usarse.

b.- B.subtilis 168 se conservó en placas con medio de Luria (LB) y se creció también en este medio.

LB

Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	1 %
Triptona	1 %
Agar	1.5 %

c.- E.coli RR1 se conservó y se creció en medio LB.

d.- Los medios para la transformacion en B.subtilis son:

1) Medio Penassay

Extracto de levadura	0.15 %
Extracto de carne	0.15 %
Peptona	0.6 %
Agar	1.5 %

2) Medio SMMP = Penassay 4X + SMM 2X

Medio SMM

Sacarosa	0.5 M
Maleatos	0.2 M pH 6.5
MgCl ₂	0.02 M

3) Medio SFI

1.- Sales:	(NH) SO	0.2 %
	₄ ₄	
	K HPO	1.4 %
	₂ ₄	
	KHPO	0.6 %
	₄	
	Citrato Sodio (2H O)	0.1%
	₂	
	MgSO (7H O)	0.02 %
	₄ ₂	
2.- casaminoacidos		0.02 %
3.- Extracto de levadura		0.1 %
4.- Glucosa		0.5 %
5.- Requerimientos.		

4) Medio SFI.

Medio SFI + CaCl 5×10^{-4} M y MgCl 2.5×10^{-3} M.
₂ ₂

e.- Las recombinantes se seleccionaron en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente a las siguientes concentraciones:

Ampicilina:	100 ug/ml
Tetraciclina:	10 ug/ml
Cloranfenicol:	50 ug/ml

Los medios se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión por 15 minutos. Los antibióticos y requerimientos por filtración a través de membrana Millipore 0.45 u.

SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES

a.- Amortiguador TE: Tris 10 mM
EDTA 1 mM pH 8

SET: Sacarosa 20%
Tris-HCl 50 mM pH 7.6
EDTA 50 mM

TEN: Tris-HCl 10 mM pH 7.6
EDTA 1 mM
NaCl 10 mM

b.- Amortiguador Tris-Boratos 10X: Tris 0.9 M
EDTA 0.025 M
Ac.borico 0.88 M

c.- Amortiguador Maleatos: Ac.Maleico 0.2 M pH 6.8

d.- Amortiguador Dowex: NaCl 1 M
Tris 50 mM pH 8
EDTA 1 mM

e.- Amortiguador Ligasa BRL 10X: Tris 0.66 M pH 7.6
MgCl 66 mM
DTT 100 mM
ATP 4 mM

Guardar en la oscuridad porque el ATP se hidroliza espontaneamente.

f.- Amortiguador RNAsa: Ribonucleasa pancreática (Merck) A 10 mg/ml en acetato de sodio 0.1M, EDTA 0.3 M pH 4.8 precalentado a 80°C por 10".

g.- Pronasa (Sigma): 2 mg/ml en amortiguador TEN, precalentada a 37°C por 15".

h.- Amortiguador de Lisozima: Sacarosa 25%
NaCl 0.1 M
Tris 0.05 M pH 7.5

i.- Mezcla para detener reacción: Urea 4 M
Sacarosa 50 mM
Azul de bromofenol 0.1%

j.- Mezcla lítica de tritón: Tritón 10% 3 ml
EDTA 0.25M 75 ml
Tris 1M pH 8 15 ml
Agua 7 ml

100 ml

k.- Amortiguador Saturado de Fenol: Mezcla 1 a 1 de fenol y 50 mM
Tris-HCl, NaCl 10 mM pH 7.5. Equilibrado toda la noche a 4°C con agi-
tación.

l.- Enzimas de Restricción de Sigma Chemical Co.:

Hae III (proveniente de Haemophilus aegyptius)

Amortiguador de Almacenamiento: Fosfato (K+) 20 mM
KCl 100 mM
Ditiotreitol 0.5 mM

Amortiguador de Reacción: Tris HCl 50 mM
MgCl 5 mM
Ditiotreitol 0.5 mM

APARATOS

Espectrofotómetro Bausch and Lomb Modelo Spectronic 21

Potenciómetro Beckman Modelo 3500 digital

Lámpara de Luz UV Modelo SL-25

Balanza Analítica Sartorius Modelo 2432

Balanza Granataria Dial o Gram de OHAUS

Centrifuga Sorvall Modelo RC5C; Rotores GSA, HS4 y SS34

Centrifuga Beckman Modelo L5-50B Ultracentrifuge: Rotor SW50.1

Microcentrifuga Eppendorf

Incubadora Modelo G76 (Gyratory Water Bath Shaker) New Brunswick Scientific.

Incubadora Psychrotherm (Controlled environment Incubator Shaker)

Agitadora Corning Stirrer FC-353

Vortex super mixer de Line Lab Instrument Inc

Cámara de Electroforésis Bio Rad Modelo 220

Fuente de Poder E-C Apparatus Modelo 45F

Microscópio Reichert, Austria Nr 64 923

Pipetas automáticas Gilson Modelos: P20D (0-20 ul), P200D (20-200 ul),

P1000D (200-1000 ul) y P5000D (500-5000 ul)

a) DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE GLUCOSA ISOMERASA.

Con el fin de medir la actividad enzimática es necesario poner en contacto a la enzima con el sustrato y los cofactores de la reacción. En el laboratorio hemos medido la actividad de la enzima tanto en células rotas como en células enteras y no hemos encontrado diferencia significativa entre las dos para el caso de Bacillus. Suponemos que el sustrato y los cofactores penetran a la célula entera llevando a cabo la reacción normalmente.

El microorganismo se creció en el medio reportado por Danno (ver medios de cultivo), en matraces de 1 l con 200 ml de medio, a 45°C por 16 hrs. Las células se concentraron por centrifugación (Sorvall RC5C) a 8,000 rpm por 10 minutos, se lavaban con amortiguador maleatos dos veces y se resuspendían en el volumen adecuado de maleatos, según los requerimientos del experimento.

El sistema de reacción se preparó de la siguiente forma:

Sistema de reacción:

Tubo # 1 = Blanco maleatos:

0.5 ml cofactores (MgSO 0.06 M, CoCl 0.006 M)

4.5 ml amortiguador maleatos (Acido maleico 0.2 M, pH 6.8)

Tubo # 2 = Blanco de Sustrato

0.5 ml cofactores

2.5 ml de fructosa 2M o glucosa 2M

2.0 ml de amortiguador maleatos

Tubo # 3 etc = Tubos problema

0.5 ml cofactores

2.5 ml de fructosa 2M o glucosa 2M

2.0 ml de solución de células

El carbohidrato a usar dependerá de que lado de la reacción se vaya a medir: glucosa a fructosa o viceversa. Las soluciones de fructosa y glucosa se hacen en amortiguador maleatos.

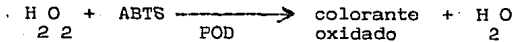
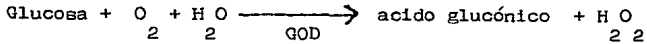
Se tomó una muestra tiempo cero de cada tubo, tomando 1 ml del tubo correspondiente y parando la reacción sumergiendo el tubo en etanol y hielo seco. Los otros tubos se incubaron una hora a 60°C (temperatura óptima de reacción) y transcurrida esta se congelaron rápidamente para detener la reacción.

En todos los casos se corrió la reacción a pH 6.8, excepto en la determinación de pH óptimo. La temperatura de reacción siempre fue 60°C, excepto en la determinación de temperatura óptima. Se usó fructosa 2M como sustrato, menos en los experimentos en los que se analizó la afinidad por este sustrato o por glucosa y xilosa.

Para determinar la isomerización de fructosa a glucosa se emplea la prueba de color del equipo Glucosa GOD Period de Lakeside. Este equipo consta de una solución estándar que contiene 9.1 mg/100 ml de glucosa, un amortiguador enzimas/cromógeno que contiene: amortiguador fosfato 100 mmol/lit pH 7, las enzimas POD (peroxidasa), > 0.8 U/ml, GOD (glucosa oxidasa), > 10

U/ml y ABTS (2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina-acido sulfonico-(6))-sal diamónica.

El fundamento de esta prueba se basa en las siguientes reacciones:



El colorante resultante de la segunda reacción es de color verde y por lo tanto los tubos se pueden leer a 595 nm de densidad óptica en un espectrofotómetro.

El procedimiento consistió en tomar 100 ul de cada tubo del sistema. Se debe poner un tubo con solución estandar y otro con un blanco con agua.

A todos los tubos se les agregan 2.5 ml de la solución de amortiguador enzimas/cromogeno (el polvo se disuelve en 1000 ml de agua y se guarda en un frasco ambar). Se espera 30 min a que el color se estabilice y se lee a 595 nm.

Se hace una curva patrón D.O / mg de glucosa y se determina mg glucosa/ mg de proteína para calcular la actividad específica.

La proteína se determina por el método de Lowry que se describirá más adelante.

Si se va a medir la actividad de la reacción en sentido contrario, es decir, de glucosa a fructosa, se utiliza el metodo de cisteina-carbazol-ácido sulfúrico (Dische et al, 1951).

Esta técnica requiere de las siguientes soluciones:

A.- cisteína: 2.5 %

B.- carbazol: 0.4 % disuelto en etanol concentrado.

C.- H₂SO₄ : 80 %

D.- Carbazol en sulfúrico : H₂SO₄ 200 ml
Carbazol 0.4 % 2 ml

Nota.- Las soluciones de cisteína se preparan inmediatamente antes de usarse.

La técnica se lleva a cabo poniendo una alícuota de 100 ul del tubo problema y aforando a 1ml con agua. Se añade 0.1 ml de solución de cisteína 2.5 % y se preincuba a 30°C 2'. Se agregan 3 ml del reactivo carbazol-sulfúrico e incubar a 30°C 30' y se leen exactamente en ese momento la D.O a 560 nm. Se hace una curva patrón (Figura 10) y se grafica D.O / conc de fructosa. Se determina mg fructosa / mg proteína.

Para determinar afinidad por xilosa se usa este mismo método de cisteína-carbazol y se hace una curva patrón con un análogo de xilulosa (Figura 11), la D-ribulosa-o-dinitrofenilhidrazona.

b) DETERMINACION DE PROTEINA. (Lowry el al,1951).

El método de Lowry ampliamente empleado, tiene como base la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico de la tirosina de las proteínas (o el grupo aromático en el caso de triptofano, fenilalanina e his-

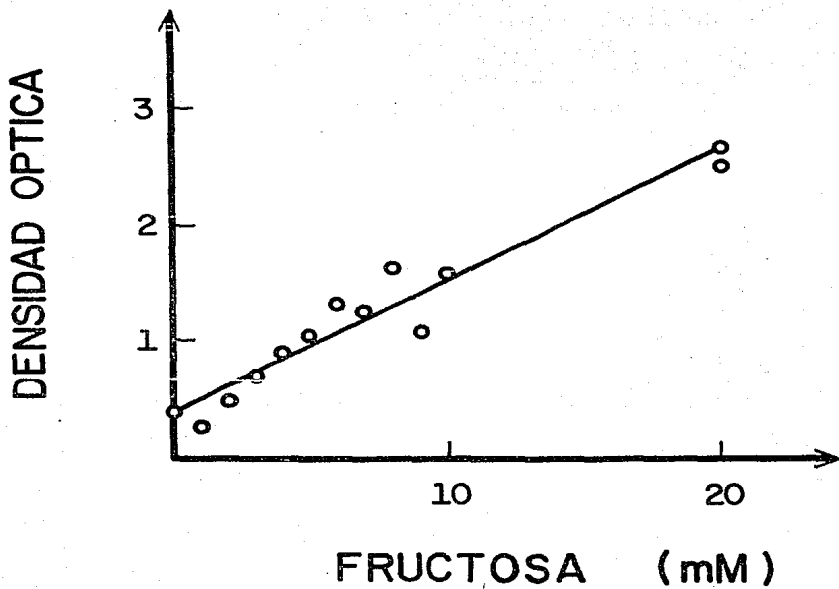


Figura 10.- Curva patrón de fructosa.

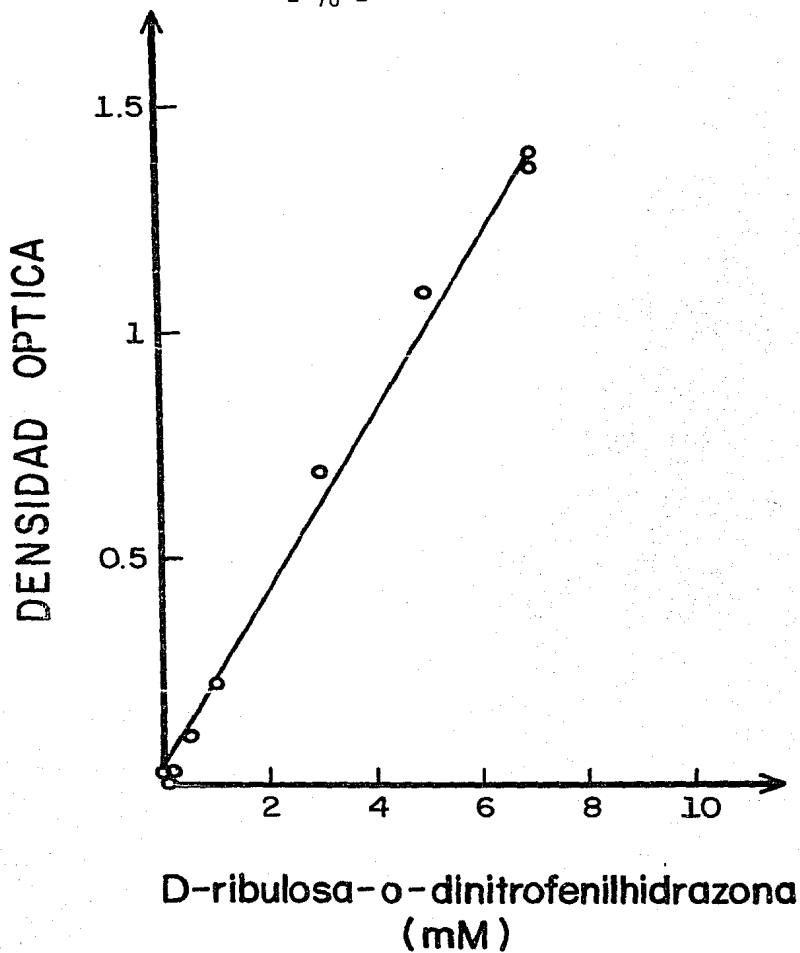


Figura 11.- Curva patrón de D-ribulosa-o-dinitrofenilhidrazona.

tidina) y el ácido fosfomolibdínico (color oro) que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas. Esto resulta en la formación de un color azul intenso que se puede medir a 595 nm de absorbancia. La concentración de proteína se determina por comparación con una curva patrón de albumina sérica bovina, (Figura 12).

Se requieren de las siguientes soluciones:

- A.- Na_2CO_3 20 g/lit llevado con NaOH 0.1N
- B.- Tartato de Na y K 1 % en agua
- C.- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 % en agua
- D.- Solución de proteína: 0.6 ml de A + 0.1 ml de B + 0.1 ml de C
- E.- Reactivo Folin-Cicalteau: 1 a 3 (fenol-agua).
- F.- Patrón de Albumina: 5 a 100 ul/ml.

- 1.- Tomar una alícuota del problema (100ul) y llevarlo a 1 ml con agua. Poner una muestra del patrón de albumina y un blanco sin proteína.
- 2.- Adicionar 5 ml de la solución D, agitar y dejar reposar 10'.
- 3.- Adicionar 0.5 ml de la solución E, agitar rápidamente y dejar reposar 30'.
- 4.- Leer a 595 nm en un espectrofotómetro.
- 5.- Se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Proteína}([\text{l/ml}]) = \frac{\text{patrón}([\text{l/ml}]) \times \text{D.O proteína}}{\text{D.O patrón}}$$

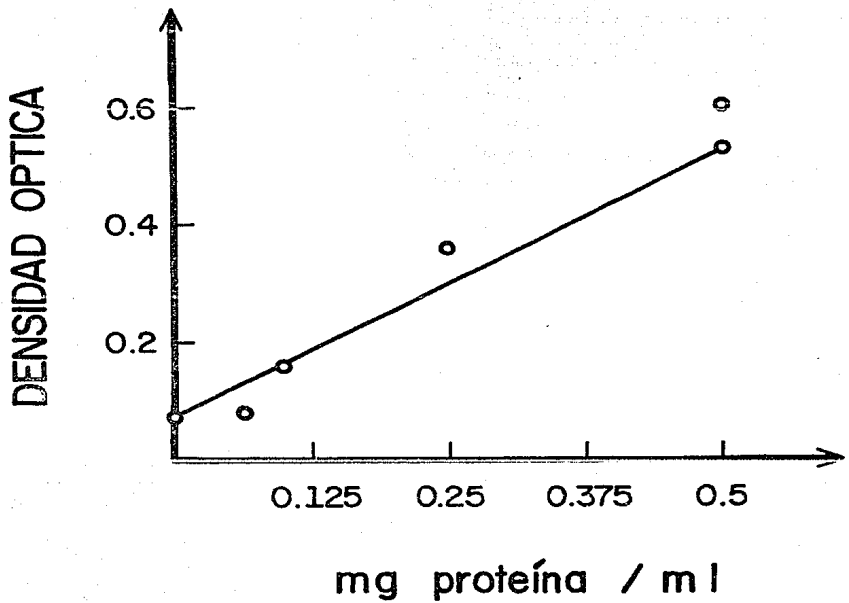


Figura 12.- Curva patrón de albumina sérica bovina.

c). PURIFICACION DE ADN CROMOSOMAL (Rodriguez, 1983).

El ADN cromosomal se purifica debilitando la pared celular por enfriamiento o por tratamiento con lisozima y el agente quelante etilenediaminotetracético (EDTA). La lisis celular se logra por la adición de un detergente como SDS (sodio dodecil sulfato) en un amortiguador salino. La solución es tratada con ribonucleasa para hidrolizar el ARN y proteasa para degradar las proteínas. Las proteínas y oligonucleótidos residuales se eliminan con un solvente orgánico como fenol o una mezcla de fenol y cloroformo. La fase acuosa que contiene al ADN se guarda y se le adiciona etanol para que este precipite. El ADN se evidencia como un material fibroso blanco que se puede sacar con un tubo de vidrio; también la precipitación del ADN se puede alcanzar si la mezcla con etanol se pone en frío con hielo seco y luego se centrifuga. Esta precipitación sirve para concentrar al ADN de alto peso molecular a la vez que se remueven los oligonucleótidos pequeños de ADN y ARN, el detergente y el solvente orgánico utilizados anteriormente.

Si el ADN contiene aún detergente y sales, este puede dializarse re-suspendido en un amortiguador. Una mayor purificación se puede lograr empleando técnicas cromatográficas o gradientes del cloruro de cesio.

Protocolo.

DÍA 1.

1.- Poner a crecer las células en medio Luria a 37°C con aeración, hasta fase log de crecimiento (aproximadamente $A_{600} = 1.0$)

- 2.- Centrifugar el cultivo a 8000 rpm a 4°C y lavar el pellet celular con 20 ml de amortiguador TEN; volver a centrifugar.
- 3.- Resuspender el pellet en 10 ml de amortiguador SET y agregar 1ml de lisozima 5 mg/ml en amortiguador TEN. Incubar a 37°C por 30 minutos. Monitorear la formación de esferoplastos usando un microscópio de contraste de fase.
- 4.- Dividir la suspensión de células en 2 tubos estériles con tapón de 25 ml. Agregar 5ml de amortiguador TEN y 0.5ml de SDS 25%. Poner el tapón e invertir suavemente el tubo hasta que la solución se haya mezclado completamente y las células se hayan lisado.
- 5.- A cada tubo agregar 1ml de NaCl 5M y un volumen igual de fenol saturado (aprox 10 ml). (Usar guantes de plástico para trabajar con fenol). Invertir los tubos hasta que las mezclas se hayan emulsificado (5 min).
- 6.- Separar las fases por centrifugación a 6500 RPM por 5 minutos a 4°C.
- 7.- Empleando una pipeta de punta ancha, transferir la fase de arriba (acuosa) a otro tubo estéril. Tratar de no llevarse la película de proteína entre las dos fases.
- 8.- Agregar una parte igual de cloroformo isoamílico y extraer la proteína residual como en el paso 5.
- 9.- Después de mezclar 5 minutos, separar las fases como en el paso 6 y transferir las fases de arriba de los dos tubos a un vaso de precipitado de 100 ml. Ponerlo en hielo.
- 10.- Precipitar el ADN agregando dos volúmenes de etanol 95% frío. Mezclar las soluciones y dejar 5 minutos para que el ADN precipite.

- 11.- Introducir un tubo de vidrio y mover para que el ADN se pegue a el.
- 12.- Transferir ese ADN a un tubo y agregar 10 ml de amortiguador TEN.
Dejar toda la noche a 4°C para que se disuelva.

DIA 2.

- 1.- Agregar 0.05 ml de amortiguador de RNasa e incubar a 37°C por 2 hrs.
A continuación, agregar 0.5ml de Pronasa (Soluciones y Amortiguadores) y continuar la incubación por otra hora más.
- 2.- Agregar 5ml de fenol saturado y 5ml de cloroformo isoamflico, mezclar suavemente por 5 minutos. Separar las fases como en el paso 6 del Dia 1.
- 3.- Repetir la extracción con 10ml de cloroformo isoamflico solo. Separar las fases como en el paso 6 del Dia 1.
- 4.- Transferir la fase acuosa a un vaso pp de 50 ml y agregar 2 volúmenes de etanol frio. Mezclar y sacar el ADN como se hizo en el paso 10 del Dia 1.
Resuspenderlo en 2 a 4ml de amortiguador TEN.
- 5.- Determinar pureza y concentración.

d) PURIFICACION DE ADN CROMOSOMAL (Bolivar,1977).

DIA 1

- 1.- Crecer 1 o 2 litros de cepa en medio de Luria a 37°C por 16 a 18 hrs.
- 2.- Centrifugar GSA o GS3 a 7,000 rpm por 15 min.
- 3.- Congelar los paquetes celulares en 10 ml de cultivo de sacarosa:
25% Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0. Mantener en hielo. Los agregados celulares se separan agitando sin lisar las células.
- 5) Añadir por litro de cultivo, en el orden dado, en hielo:

a) 3 ml 0.3 EDTA pH 8.0.

b) 1 ml de lisozima 5 mg/ml en Tris 0.025 M pH 8.0.

c) agitar suavemente dejando reposar en hielo 15 min.

d) Añadir 3 ml mezcla lítica de tritón 3X (Soluciones y amortiguadores).

e) Agitar suavemente dejando reposar en hielo 15 min.

6.- Centrifugar en tubos de propileno de 50 ml en rotor SS34 a 17,000 rpm por 30 min.

7.- Decantar el sobrenadante, disolver el paquete celular en aproximadamente 10 ml de amortiguador A 1X (Tris 0.5 M, EDTA 20 mM, SDS 5% pH 7.5).

8.- Agregar 1 / 10 volumen de pronasa (5 mg/ml en amortiguador A, previamente incubada 30 minutos a 37°C). Puede agregarse la decima parte y dejar más tiempo. Incubar una hora a 37°C con agitación muy leve.

9.- Extraer a temperatura ambiente con dos volúmenes de fenol-cloroformo isoamílico (25:25:1).

10.- Centrifugar 10 min. a 7,000 rpm en rotor HS4. Tomar la fase acuosa con pipeta Pasteur de boca ancha y repetir la extracción del paso anterior.

11.- Centrifugar 10 min. a 7,000 rpm en rotor HS4 y extraer la fase acuosa con dos volúmenes de cloroformo.

12.- Centrifugar igual, tomar la fase acuosa y precipitar en dos volúmenes de etanol frío (-20°C) y 1/25 de NaCl 5M. Dejar a -20°C toda la noche.

DIA 2

1.- Sacar el ADN con una varilla de vidrio o centrifugar 10 min. en rotor SS34 a 10,000.

2.- Resuspender en 5 ml de amortiguador B (Tris 50 mM, EDTA 0.2 M pH 7.5).

- 3.- Agregar RNasa (5mg/ml) en amortiguador B prehevido en baño Maria 10 min. ajustando la concentración final a 0.1-0.5 mg/ml.
- 4.- Incubar una hora a 37°C.
- 5.- Extraer dos veces con fenol-cloroformo isocámilico (25:25:1) y una vez con cloroformo. Precipitar con etanol-NaCl 5M.
- 6.- Recuperar el ADN como en el paso 1.
- 7.- Resuspender en amortiguador TE y dializar 24 hrs contra TE.
- 8.- Leer 260/280 y hacer una electroforésis.

e) PURIFICACION DE ADN CROMOSOMAL (Burke,1977).

- 1.- Crecer las células a fase log tardía en medio de antibiósisis #3 (Difco). (100 ml).
- 2.- Centrifugar y lavar con 20 ml de Tris 10 mM.pH 7.5, EDTA 10 mM. Resuspender en esto mismo.
- 3.- Incubar 30 min. a 37°C con 100 ug/ml de lisoziima.
- 4.- Incubar 10 min. a 37°C con RNasa. 100 ug/ml.
- 5.- Incubar una hora a 37°C con Pronasa, 100 ug/ml y SDS 0.1%.
- 6.- Hacer dos extracciones fenólicas.
- 7.- Dializar extensivamente contra TE.

f) EXTRACCION DE PLASMIDO.

Para lograr la purificación de ADN extracromosomal como son los plásmidos, se requiere minimizar la cantidad de ADN cromosomal.

La técnica general es muy parecida a la del ADN cromosomal, solo que una vez que se ha purificado el ADN, este se pasa por un gradiente de cloruro de cesio para separar completamente al plásmido del ADN cromosomal.

I) Protocolo de extracción para E. subtilis (Kielsselburg et al, 1984).

- 1.- Crecer las células que contienen el plasmido en 500 ml de Luria.
- 2.- Centrifugar a 8000 rpm 10' 4°C y lavar con Tris 10mM EDTA 1mM pH7.5.
- 3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 25ml de amortiguador de lisozima, añadir inmediatamente la lisozima en polvo, 3 mg/ml. La formación de protoplastos toma 30' a 37°C.
- 4.- Añadir mezclando cuidadosamente 6ml de acetato de sodio 5M, 1.5ml de EDTA 50mM pH8.5 y 37.5ml de SDS 2% disuelto en NaCl 0.7M. Colocar la mezcla a 0°C 30'.
- 5.- Centrifugar en tubos a 18,000 rpm 45' a 4°C y recuperar el sobrenadante.
- 6.- Añadir 1ml de amortiguador RNAsa e incubar 30' a 37°C.
- 7.- Añadir 1ml de pronasa e incubar 50' a 45°C.
- 8.- Precipitar con 6ml de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol frío. Colocar en hielo seco a -20°C 30'.
- 9.- Recuperar el ADN por centrifugación a 0°C, 30' a 12,000 rpm. Secar el

pellet y resuspender en 4ml de amortiguador TES.

10.- Checar concentración y pureza.

11.- Pasar por gradiente de cloruro de cesio.

II) Protocolo para extracción de plásmido de E.coli (Guerry et al,1973).

DIA 1

1.- Crecer de 5 a 10 ml de medio de LB con la cepa que contiene al plásmido durante toda la noche.

2.- Agregar 2 o 3 ml de ese cultivo, a un litro de medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos.

3.- Incubar a 37°C hasta que la densidad óptica llegue a 0.2 al leer ajustando contra agua. En este momento se agrega el antibiótico (Cloranfenicol o Espectinomicina(Trobicin)) 300 mg/lt. Continuar la incubación a 37°C por 16 hrs.

4.- En este punto, las células se pueden congelar si se necesita.

5.- Centrifugar en rotor GSA a 5,000 rpm 10' a 4°C.

6.- Congelar el paquete celular (puede usarse etanol y hielo seco para un congelamiento más rápido).

7.- Resuspender en un total de 10 ml de la siguiente solución: sacarosa 25%, Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8. Mantener en hielo.

8.- Agregar lo siguiente, por litro, en el orden dado (en hielo): 2 ml de EDTA 0.25 M, 1 ml de lisozima (5mg/ml en Tris 0.025 M pH8), 0.1 ml de RNasa (ver soluciones y amortiguadores).

9.- Mezclar suavemente y dejar 15' en hielo.

10.- Agregar 3 ml de Tryton Lytic Mix (soluciones y amortiguadores), mezclar suavemente y dejar en hielo 15'.

11.- Centrifugar en tubos de polipropileno de 50ml en un rotor 8634 a

17,000 rpm por 40' a 4°C.

12.- Decantar el sobrenadante en una probeta estéril, medir el volumen y pasarlo a una botella de plástico de 250ml (el ADN se pega al vidrio).

13.- Agregar 2/3 de volumen de agua dd (hace a la sacarosa menos densa que el fenol).

14.- Agregar 2/3 del nuevo volumen de fenol saturado (soluciones y amortiguadores).

15.- Agregar un volumen de cloroformo igual que el de fenol. Mezclar y centrifugar en rotor HS-4 a 6,500 rpm por 15' a 4°C.

16.- Remover la fase de arriba (acuosa) y colocarla en una botella de 250 ml.

17.- Agregar 1/25 volumen de NaCl 5M a la fase acuosa. Agregar dos volúmenes de etanol frío y dejar a -20°C toda la noche.

DIA 2

1.- Centrifugar en rotor HS-4 a 6,500 rpm por 60'. Descartar el sobrenadante y poner a secar el pellet.

2.- Resuspender el pellet en 5 ml de agua o TE. Es posible agregar 1 ml de glicerol estéril al 80%. Esto hace que la solución sea más densa y que el ADN se posa sobre la superficie.

3.- Pasar por una columna A-50 (Bio-Rad) de 2 x 35 cm. Correr en amortiguador A50 (Tris 50mM, NaCl 500mM pH 8, Na₃N 1mM). Colectar en fracciones de 4ml.

4.- Determinar la densidad óptica a 260 nm de cada fracción. El ADN se de-

be encontrar en los primeros 40 tubos, usualmente entre en tubo 15 y 25.

5.- Agregar 2 volúmenes de etanol frío a los tubos correspondientes al pico de ADN y congelar 8 hrs o más. Centrifugar en rotor HS-4 a 6,500 rpm, 60°.

6.- Pasar por gradiente de cloruro de cesio (2.2 gr. en ultracentrifuga 16 hrs a 35,000 rpm, a 20°C con yoduro de propidio (2mg/ml) para visualizar el ADN).

g) TECNICA DE GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO PARA PURIFICACION DE PLASMIDO.

(Guerry et al 1973).

El principio del gradiente de cloruro de cesio es el siguiente:

El plásmido es ADN superenrollado mientras que el ADN cromosomal es lineal. Estos dos tipos de ADNs tienen habilidad de intercalar colorantes entre las dos bandas como el bromuro de etidio o el yoduro de propidio.

Estos colorantes se insertan entre las bases púricas y pirimídicas del ADN de doble cadena.

La densidad del ADN tiende a disminuir mientras más colorante se le une. Debido a que los plásmidos son moléculas circulares superenrolladas, estos solo pueden unir colorante hasta que la molécula lo permita sin que se pierda su tensión. Las moléculas lineales del ADN cromosomal al tener libre rotación, permiten que se una mayor cantidad de colorante. Es por esto que el ADN lineal tendrá una menor densidad que el plásmido y por lo tanto al visualizar con luz ultravioleta (UV) las bandas en el gradiente, se espera que la de arriba sea la del cromosomal y la de abajo la del plásmido.

do. La banda que se quiera, en este caso la del plásmido, se recupera del gradiente pinchando el tubo de plástico y apartando las gotas fluorescentes correspondientes a la banda.

El colorante se elimina con solventes como el n-butanol o con el uso de una resina Dowex AG50 W-X8 la cual tiene más afinidad por el colorante que por el ADN. El cloruro de cesio se elimina por diálisis y el ADN se concentra por precipitación con etanol. Muchas veces es necesario pasar la mezcla por una columna de Sephadex GT o Biogel A50 con el fin de eliminar contaminantes de bajo peso molecular. Alrededor de la fracción 20 se encontrará el plásmido mientras que los contaminantes saldrán más tarde (fracción 40 a 60).

Protocolo

DIA 1

- 1.- Se llenan los tubos de polialomero (# 326819 de 1/2" X 2") con 2.2g de cloruro de cesio (SIGMA).
- 2.- Se agrega a cada tubo el plásmido disuelto en amortiguador TES a un volumen de 2.1 ml; se recomienda no poner más de 500ug por tubo.
- 3.- Se agregan 150ul de yoduro de propidio (2mg/ml) y se llena el tubo al tope con aceite de parafina (aproximadamente 2.3ml).
- 4.- Se balancean los tubos y se integran al rotor (sw50.1 para ultracentrifuga Beckman L5-503).
- 5.- Se centrifugan a 35,000 rpm durante 20 hrs a 20°C.

DIA 2

Se sacan los tubos de la centrifuga y se procede a aislar la banda y a eliminar el colorante.

- 1.- Se traslada el material a un cuarto oscuro y con luz UV se visualizan los tubos y se localizan las bandas.
- 2.- Se escoge la banda correspondiente al plásmido y con un alfiler o algo similar se pincha el tubo por abajo.
- 3.- Se vacia lo que vaya saliendo en un vaso y cuando llegue la banda fluorescente se apartan las gotas en un tubo estéril. Esto se hace con todos los tubos y se juntan todas las gotas de las bandas en un solo tubo.
- 4.- Con el fin de eliminar el colorante, la muestra fluorescente se pasa por una columna empacada con resina Dowex (50wx8).
- 5.- Una vez que ha pasado la mezcla se agrega 1ml de amortiguador Dowex para limpiar lo que se haya quedado en la columna.
el siguiente paso es poner la muestra a dializar para eliminar las sales:
- 6.- En un matraz de 4 lt se ponen 3.6 lts de agua estéril y 400ml de amortiguador TE 10X.
- 7.- La muestra con el plásmido se coloca en una bolsa de diálisis, se cierra perfectamente y se echa en el vaso de pp con el agua. Se agita en el cuarto frio durante 20 hrs haciendo uno o dos cambios del agua.
- 8.- Al término de la diálisis se saca la muestra con una pipeta pasteur y se precipita con etanol y NaCl 5M.
- 9.- El plásmido se recupera centrifugando a 0°C a 12,000 rpm 30"; se checa concentración y pureza y se hace un gel de agarosa.

h) ENSAYO ESPECTROFOTOMETRICO DE LA CONCENTRACION Y PUREZA DEL ADN (Rodriguez et al, 1983).

Una vez que el ADN esta libre de contaminantes, se puede medir su concentración. Para esto se utiliza la espectrofotometría con luz ultravioleta, debido a que las bases nitrogenadas del ADN absorben fuertemente a 260 nm.

Existe un coeficiente de extinción que es igual a 20, lo que quiere decir que el ADN a una concentración de 1mg/ml tendra una absorbancia a 260nm de 20. Asi pues, el coeficiente de conversión es de $50 \text{ ug/ml} = 1$ de Absorbancia a 260nm.

Para conocer la pureza se toma el coeficiente entre la absorbancia a 260 nm del ADN y la absorbancia de las proteínas a 280nm. Se sabe que el ADN puro de E.coli tiene una $A_{260}/A_{280} = 1.95$. De esta manera, mientras menor sea el valor de la absorbancia a 280nm respecto a la de 260, más puro se encontrará el ADN.

1) ELECTROFORESIS.

La electroforésis se basa en el hecho de que las moléculas cargadas al ser colocadas en un campo eléctrico, migran hacia uno u otro electrodo a una velocidad proporcional a la fuerza del campo y a la carga neta de la molécula.

Los grupos fosfato del ADN y ARN estan ionizados y por lo tanto migran al electrodo positivo en un campo eléctrico. Dada la repetitividad del esqueleto fosfoazucar, los ácidos nucleicos tienen más o menos la misma carga neta en relación a su masa y migran hacia el ánodo a velocidades iguales. Ajustando la viscosidad del medio, sin embargo, los efectos de la fricción y de la forma molecular se pueden enfatizar para separar a los ácidos nucleicos electroforéticamente en base a su tamaño. Esta viscosidad del medio de soporte se puede determinar ajustando el grado de entrecruzamiento en la matriz porosa de los geles ya sean de poliacrilamida o de agarosa. Dado que las moléculas de ADN deben de moverse a traves de los poros de la matriz conforme migran hacia el ánodo, su velocidad esta profundamente influenciada tanto por el tamaño de la molécula como por el del poro (Aaij, 1972).

La técnica de electroforésis empleada en este trabajo fue la de de placa utilizando un gel de agarosa al 0.8% con amortiguador Tris-Boratos 1X (ver soluciones y amortiguadores), a un voltaje de 150 volts (Bolivar & Betlach, 1977).

j) DIGESTION DE PLASMIDO Y ADN CROMOSOMAL CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN
(Bolivar et al, 1977).

Los sistemas de digestión se montan de la siguiente forma, agregando en orden ascendiente desde el agua hasta el ADN.

Sistema de reacción

	ul
enzima de restricción	2
ADN (cromosomal o plasmido)	10
amortiguador de reacción	2
agua	6
	<hr/>
	20

La concentración del ADN esta calculada de 1 ug/10ul.

Incubar a 37°C por 16 hrs.

Nota.- Este sistema estandar puede variar dependiendo del experimento y de resultados previos. Sin embargo, la cantidad de enzima siempre se calcula como el 10% del sistema debido a que el glicerol que contiene la enzima debe estar diluido al 5% para que este no inhiba a la enzima.

Las puntas de pipeta deberán estar esterilizadas y se deberá de usar una punta por transferencia. Todos los reactivos y tubos de reacción se deberán mantener en hielo.

Una vez que se ha establecido que tanto el plásmido como el ADN cromosomal han sido digeridos por completo, es necesario eliminar la enzima para que esta no siga actuando. Esto se logra haciendo una extracción normal con fenol-cloroformo y precipitando con etanol y NaCl 5M. La enzima puede inactivarse calentando 10 minutos a 65°C.

k) LIGAMIENTO DE FRAGMENTOS DIGERIDOS DE PLASMIDO Y ADN CROMOSOMAL

(Bolivar et al,1977).

El sistema se prepara de la siguiente manera:

ADN	5 ul
ATP1X	1 ul
amortiguador ligasa	1 ul
agua	2 ul
	<hr/>
	10 ul

Incubar a 12°C toda la noche o 3 hrs a 22°C.

1) TRANSFORMACION en Bacillus subtilis POR EL METODO DE PROTOPLASTOS (Chang & Cohen,1979).

- 1.- Crecer las células en medio Penassay hasta fase midlog₈ (10^8 a 10^9 cfu/ml).
- 2.- Centrifugar 8,000 rpm 10' y resuspender pellet en 1/10 volumen de SMMP.
- 3.- Añadir lisozima a una concentración final de 2mg/ml. Incubar a 37°C con agitación suave. Tomar control de viabilidad y checar aspecto al microscópio antes y después, 30'-120'.
- 4.- Centrifugar HS4 o HB4 a 6500 rpm por 15'.
- 5.- Lavar con SMMP.
- 6.- Llevarlo a 1/10- 1/15 volumen con SMMP. Se puede mantener a temperatura

ambiente hasta 5 hrs (la viabilidad baja 15 a 20%).

7.- Se mezcla 1 μ g-5 μ g de ADN en 50 μ l o menos de amortiguador TE con un volumen igual de la mezcla de protoplastos. Inmediatamente se añade 1.5 ml de PEG 40% (40 grs PEG 600 + 50 ml SMM2X en 100 ml) y se incuba 2'.

8.- Se añaden 5ml de SMM2 y se centrifuga a 6,500 RPM 10'.

9.- Se resuspende en SMM2 1 ml y se incuba 1 1/2 hrs a 30°C en baño con agitación suave para permitir la expresión fenotípica de caracteres del plásmido.

10.- Platear tomando 0.2 ml del tubo en medio de selección e incubar toda la noche a 37°C.

m) TRANSFORMACION en Bacillus subtilis POR EL METODO DE CELULAS COMPETENTES (Dubnau,1971).

1.- Inocular con asada un pequeño número de medio SPI (medios de cultivo) e incubar toda la noche a 30°C.

2.- Inocular un medio SPI fresco, con el medio anterior, hasta que llegue a una densidad óptica de 0.01 a 540 nm. Agitar vigorosamente a 37°C. Tomar lecturas periódicas y cuando empiece a partir de la fase exponencial, diluirlo 10X en medio SPII (medios de cultivo).

3.- Agitar suavemente por 90 min. a 37°C, tiempo en que la competencia esta cercana al máximo.

4.- Centrifugar en frío y resuspender en 1/10 volumen original del mismo sobrenadante al que se le había añadido 10% glicerol v/v. Si se van a usar

inmediatamente, no es necesario congelar. Los rendimientos mejoran si se agrega EGTA 1 mM.

5.- Distribuir en volúmenes adecuados y congelar rápidamente en baño de etanol-hielo seco. Si las muestras se van a almacenar, guardarlas en Revco -70°C.

6.- Para su uso las células fueron descongeladas rápidamente por agitación en un baño a 45°C.

7.- La transformación se lleva a cabo a 37°C, 30-60 minutos, con agitación.

n) TRANSFORMACION EN Escherichia coli (M.Mandel et al,1970).

1.- Inocular 0.5 ml de E.coli receptora a un tubo de ensaye con 10 ml de LB e incubar a 37°C toda la noche.

2.- Tomar del medio 0.3 ml e inocular 30 ml de LB estéril. Incubar con agitación a 37°C hasta que la lectura de absorbancia sea 0.2 - 0.3 a 540 nm contra medio de Luria (2 hrs aprox).

3.- Vaciar todo el cultivo a un tubo de centrifuga estéril con tapa. Centrifugar a 4°C, 10,000 RPM 5' para quedarse con el paquete celular.

4.- Mantener el paquete celular en hielo para evitar destrucción, además de que a bajas temperaturas se sensibilizan más la paredes celulares y esto permite la entrada del plásmido con mayor facilidad.

5.- Resuspender el paquete celular agitando en 15 ml de NaCl 10 mM estéril y frio, para lavar las células además de que el NaCl actua como un medio absorbente. Centrifugar en frio a 10,000 RPM 5'.

6.- Decantar y resuspender las células en 15 ml de CaCl₂ 30mM frío y estéril. Este actua para permeabilizar la pared celular. Dejar las células asi en hielo de 30 a 50°.

7.- Centrifugar a 10,000 RPM 10° en frío y el paquete celular debe tener una forma como de corazón, lo que indicará que la acción del CaCl₂ ha sido correcta.

8.- Resuspender el paquete obtenido en 3 ml de CaCl₂ 30mM. El contacto entre las células y el CaCl₂ no debe ser demasiado prolongado (20 a 30°) para evitar la excesiva sensibilización de la pared celular.

9.- Agregar el plásmido (100 ul) a 0.2 ml de células resuspendidas en CaCl₂.

Los 100 ul pueden tener diferentes concentraciones de plásmido. No es recomendable más alta de 200 ug. Poner un control de 0.2 ml de células mas 100 ul de CaCl₂.

10.- Dejar en hielo una hora.

11.- Dar un choque térmico a 42°C 75°. Debe ser en las condiciones exactas para evitar la destrucción de las células. Lo que el choque térmico hace es dilatar los poros para que penetre el plásmido que no haya podido entrar.

12.- Poner en hielo 5° para cerrar los poros dilatados con el choque térmico y evitar la posible salida.

13.- Agregar a cada tubo 3 ml de LB estéril.

14.- Incubar con agitación a 37°C 2 hrs.

15.- Platear con 0.2 ml de este tubo en medio de selección.

16.- Incubar toda la noche a 37°C.

V RESULTADOS Y DISCUSION

En primera instancia, se hicieron algunos experimentos para comprobar que las condiciones de reacción que se usan en el laboratorio para otros sistemas, eran adecuadas para B.coagulans.

En el primer experimento se midió la actividad isomerizante a diferentes tiempos de incubación. Son varios los reportes en los que se mide la actividad de esta enzima durante una hora, a la temperatura óptima de reacción (Chen,1970;Glovenco,1973). Esto se debe a que a una hora de incubación, la actividad de la enzima es bastante alta y aun se encuentra en fase de velocidad inicial.

Con el fin de conocer la curva de actividad a diferentes tiempos de incubación, se montaron varios sistemas con 2.5 ml de fructosa 2M, 2ml de células y 0.5ml de cofactores, y se mantuvieron en incubación desde 15 minutos hasta 4 horas.

Los resultados de la Figura 13 muestran que la actividad de la enzima se incrementa hasta aproximadamente 3 horas de incubación. Se comprueba que a una hora de incubación la actividad es bastante alta y se encuentra en fase de velocidad inicial.

El segundo experimento consistió en medir la actividad usando tres concentraciones distintas de fructosa como sustrato: 2M, 1M y 0.5M. Los resultados se pueden ver también en la Figura 13, de donde se intrapolaron los siguientes valores de actividad específica a una hora de incubación:

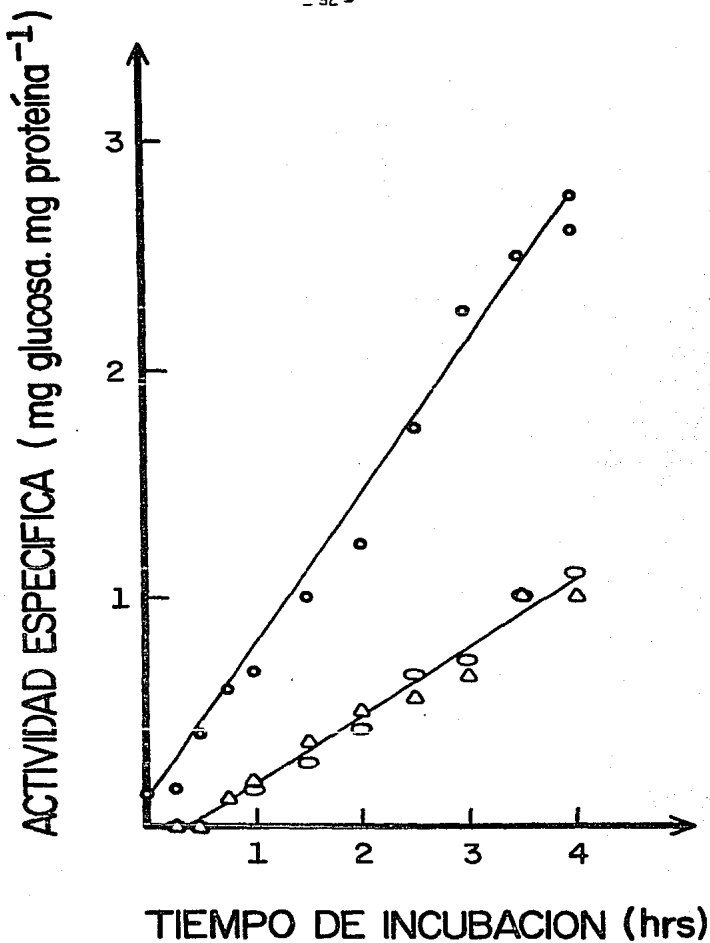


Figura 13.- Actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660 a diferentes tiempos de incubación de la reacción y a diferentes concentraciones de fructosa como sustrato: 2 M (●), 1 M (▲) y 0.5 M (○).

Fructosa 0.5 M = 0.163 mg glucosa/mg proteína

Fructosa 1.0 M = 0.190 mg glucosa/mg proteína

Fructosa 2.0 M = 0.67 mg glucosa/mg proteína

Como puede verse, la concentración de fructosa 2M dio aproximadamente 4 veces más actividad que con fructosa 0.5M y aproximadamente 3.5 veces más que para fructosa 1M. Este patrón se conserva aún para tiempos de incubación mayores a una hora, si bien las curvas de 1M y 0.5M son muy parecidas. Se concluye que una concentración 2M de fructosa como sustrato es adecuada para obtener una buena actividad de la enzima.

El tercer experimento fue variar la concentración de enzima representada por la cantidad de células en el sistema de reacción. Se pusieron desde 0.25ml hasta los 2ml que normalmente se emplean (Figura 14).

Como era de esperarse, la actividad aumenta conforme se incrementa la concentración de enzima. La gráfica que resultó de este experimento fue ajustada por el método de mínimos cuadrados ($r=0.99, m=0.51, b=-0.012$). Con este resultado nos aseguramos que usando 2ml de células aun estamos en velocidad inicial y no se ha llegado a la saturación, además de que se obtiene una actividad bastante alta.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de reacción, se procedió a la caracterización de la enzima de *B.coagulans* NRRLB5660.

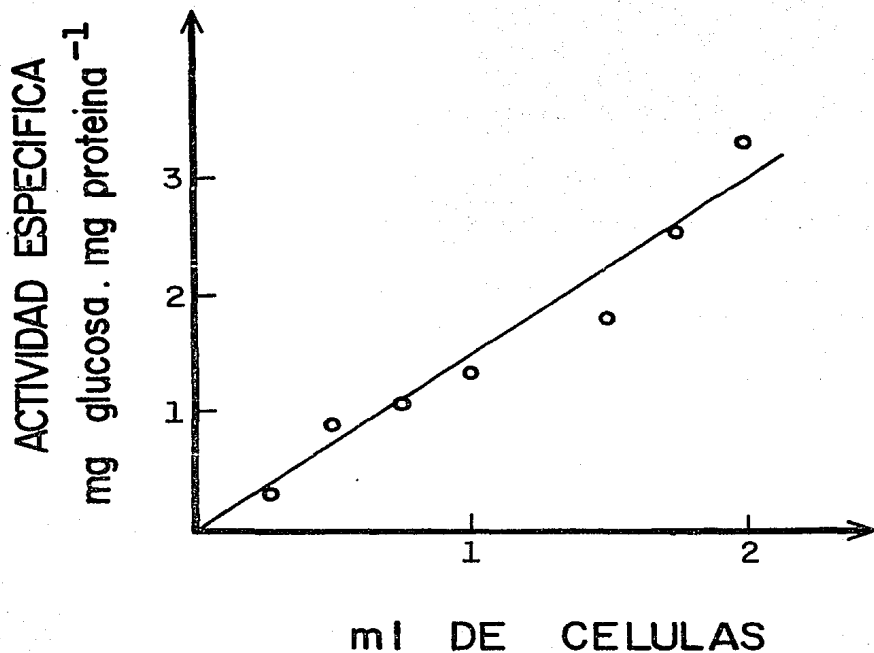


Figura 14.- Actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660 con diferentes concentraciones de células.

A.- CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA.

Es importante conocer las características de la enzima de la cepa donadora, debido a que, como ya se mencionó anteriormente, uno de los criterios de selección de las recombinantes es el comparar las características de la enzima proveniente de la cepa donadora respecto a las de la cepa receptora transformada y sin transformar. Esto se ha hecho en muchos casos, sobretodo en la clonación de α amilasas en las que el patrón de termoestabilidad ha sido un factor determinante en el reconocimiento de recombinantes (Tsukagoshi, 1984).

En la Tabla 9 se encuentran resumidas las características de la enzima glucosa isomerasa de B.coagulans NRRLB5660.

a) pH óptimo de reacción.

La Figura 15 muestra los resultados de la actividad isomerizante de glucosa isomerasa a distintos pHs de reacción a una hora de incubación a 60°C. Como se puede ver en la gráfica, la enzima es bastante estable a cambios de pH ya que aunque el óptimo se encuentra en pH 8.0, entre 7.6 y 9.2, se mantiene un 93% a 95% de la actividad total mientras que por debajo de pH 7.5 solo se pierde un 30%.

Estos resultados concuerdan por lo reportado para la glucosa isomerasa de B.coagulans HN68 estudiada por Danno (1966), cuyo óptimo esta entre 8.0 y 8.5, además de que esta enzima también es estable a cambios de pH entre pH 5.0 y 7.0 con solo un 20% de pérdida de actividad entre pH 4.5 y 9.0. Sin embargo, hay que aclarar que Danno empleó en sus experimentos amortiguador veronal 0.025M pH7.0, además de que utilizó como sustrato glu-

Tabla 9

CARACTERISTICAS DE LA ENZIMA GLUCOSA ISOMERASA DE B.coagulans NRRLB5660.
DETERMINADAS EN EL LABORATORIO.

pH óptimo	8.0			
Temperatura óptima	60°C			
Termoestabilidad	35 - 75°C			
Km y Vmax	Km	Vmax		
		@	*	
Glucosa	0.5 M	0.037	332.2	A.e.
Fructosa	0.14 M	0.018	161.2	A.e.
Xilosa	1.0 M	1.0	184.5	A.e.
Constitutiva o Inducible	Inducible por xilosa			

@ = mg carbohidrato/min

* A.e.= Actividad específica (mg carbohidrato/mg proteína/hora)

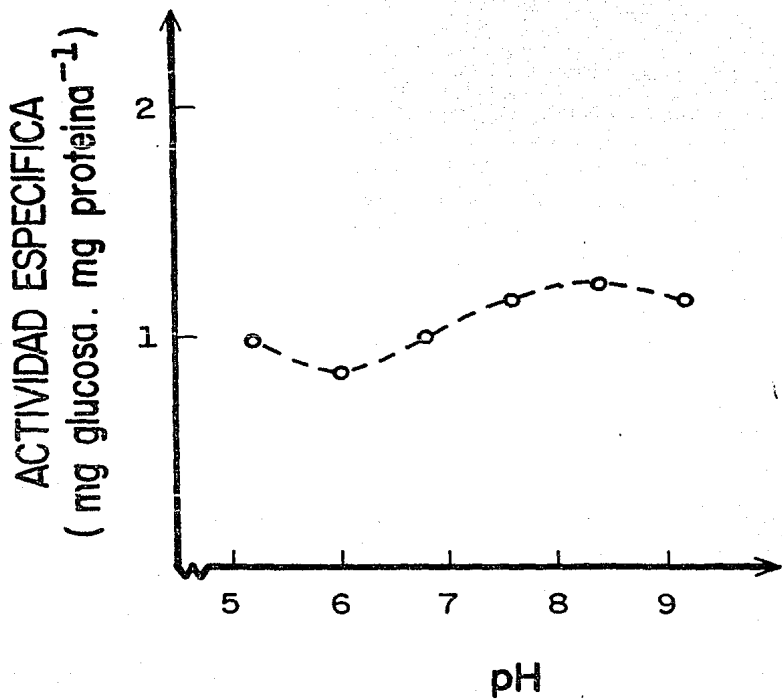


Figura 15.- Curva de pH óptimo de reacción de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans. NRRLB5660.

cosa 0.5M y CoCl_2 0.025M, determinando conversión a fructosa con el método
2
de cisteína carbazol.

b) Temperatura óptima de reacción.

La reacción se corrió a distintas temperaturas durante una hora, encontrándose el óptimo en 60°C como se puede ver en la Figura 16. A 50°C se mantiene un 81% de la actividad total y a 70°C se mantiene el 70%.

Estos resultados también coinciden con lo reportado para B.coagulans HN68. Cabe destacar la alta temperatura óptima que muestran en general las glucosa isomerasas del género Streptomyces (80°C) así como la de A.mis-souriensis con un óptimo de 90°C, comparado con 60°C para Bacillus coagu-lans y otras especies de Bacillus.

Para que una molécula de sustrato pueda convertirse en una molécula de producto, es necesario que esta posea una cierta energía mínima para poder pasar al estado de transición. El término energía de activación se refiere a la cantidad de energía que se requiere para poner a todas las moléculas en un mol de sustancia, a una cierta temperatura, en el estado de transición, en la punta de la curva de activación.

Existen dos maneras de acelerar las reacciones químicas, elevando la temperatura, porque así se aumenta el movimiento térmico, la energía y el número de moléculas capaces de entrar al estado de transición. En muchas reacciones, la velocidad de reacción se dobla por un aumento de 10°C en la temperatura. El efecto de la temperatura se expresa en términos del coefi-

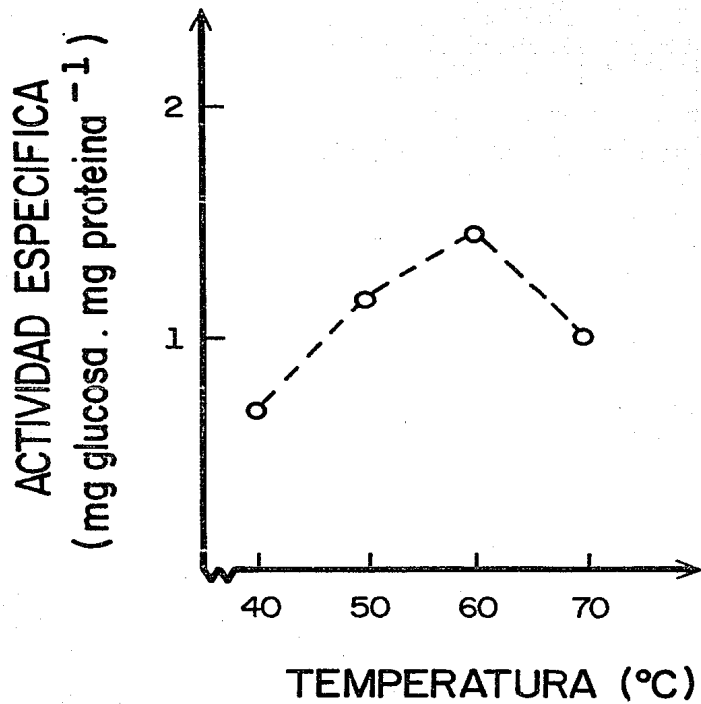


Figura 16.- Curva de temperatura óptima de reacción de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

ciente Q_{10} , que es el factor por el cual la velocidad se incrementa al aumentar la temperatura 10°C .

A partir de los datos de la curva de temperatura óptima, se puede calcular el coeficiente Q_{10} . Escogemos dos temperaturas: 50°C y 60°C , con una velocidad de 0.019 y 0.024 mg glucosa/mg proteína/min, respectivamente.

$$Q_{10} = 0.019/0.024$$

$$Q_{10} = 0.79$$

Entre 50 y 60°C la velocidad de reacción de fructosa a glucosa por glucosa isomerasa aumenta en un factor de 0.79 .

Esto es de esperarse ya que, como se mencionó anteriormente, en 50°C se mantiene un 81% de la actividad total y en 70°C solo se pierde el 30% , por lo tanto la velocidad de reacción no se dobla entre estas temperaturas.

La otra manera de aumentar la velocidad de las reacciones químicas es bajando la energía de activación. Las enzimas tienen este papel, de tal forma que una reacción catalizada a 25°C , puede llevarse a cabo 10^6 a 10^{15} veces más rápido que una reacción no catalizada (Segel, 1976).

La energía de activación también se puede calcular a partir de la curva de temperatura y con ayuda de la siguiente fórmula:

$$E_a = \frac{2.3R T_2 T_1 \log Q}{10}$$

donde E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases, T_2 y T_1 son dos temperaturas expresadas en grados Kelvin.

Tomando 50 y 60°C que equivalen a 323 y 333 Kelvin sustituimos en la ecuación anterior:

$$E_a = \frac{2.3(1.98)(333)(323) \log 0.70}{10}$$

$$E_a = \frac{(489823.68)(-0.1023)}{10}$$

$$E_a = -5014.46 \text{ cal/mol}$$

Un Q_{10} de 2 es equivalente a una E_a de 12,600 cal/mol en la región de 25 a 35°C. Como en este caso no se está doblando la velocidad de la reacción entre estas dos temperaturas, sino que solo por un factor de 0.70, es obvio que se requiere de menor energía.

c) Actividad isomerizante a diferentes concentraciones de xilosa.

Se sabe que la enzima de B.coagulans, así como la de otros microorganismos, además de isomerizar glucosa a fructosa reversiblemente, isomeriza otros sustratos tales como la xilosa, la cual es también reversiblemente convertida a xilulosa.

Este experimento se realizó empleando como sustrato diferentes concentraciones de xilosa. Los resultados se encuentran en la Figura 17. La velocidad de reacción aumenta poco conforme se incrementa la concentración de xilosa. Para conocer la afinidad de la enzima por el sustrato, se hizo

una curva Lineweaver Burke graficando $1/V$ contra $1/[S]$. Los resultados se muestran en la Figura 18. La recta se ajustó por mínimos cuadrados ($r=0.99$, $m=0.52$, $b=0.54$). Los valores obtenidos fueron: $K_m = 1 \text{ M}$ y $V_{max} = 184.5 \text{ mg xilulosa/ml/hr}$. También se hizo la curva de Eadie-Hofstee y se encontró una K_m de 1.11M . Hay que aclarar que tanto las K_m s obtenidas anteriormente como las que se reportan más adelante, son K_m s aparentes, ya que se obtuvieron a partir de células enteras y no con la enzima purificada.

d) Actividad isomerizante a diferentes concentraciones de fructosa.

En la Figura 19 se observa el efecto de la concentración de fructosa como sustrato sobre la velocidad de reacción catalizada por glucosa isomerasa. A diferencia de las gráficas anteriores, la actividad en este caso aumenta mucho al incrementarse la concentración de sustrato, llegando a la saturación a partir de 0.6M de fructosa. La curva Lineweaver Burke (Figura 20) ajustada por mínimos cuadrados ($r=0.99$, $m=0.092$, $b=0.62$) nos dio una $K_m = 0.14\text{M}$ y una V_{max} de $161.2 \text{ mg glucosa/ml/hr}$.

e) Actividad isomerizante a diferentes concentraciones de glucosa.

Las Figuras 21 y 22 muestran los resultados para glucosa ($r=0.99$, $m=1.52$, $b=3.01 \times 10^{-3}$). La K_m fue de 0.5M y la V_{max} de $332.2 \text{ mg fructosa/ml/hr}$.

Si se comparan los tres valores de K_m encontrados en estos experimentos, se podrá ver que la enzima posee una mayor afinidad por fructosa, luego por glucosa y por último por xilosa. Estos resultados varían considerablemente con los encontrados por Danno (1970), ya que él encontró K_m s muy

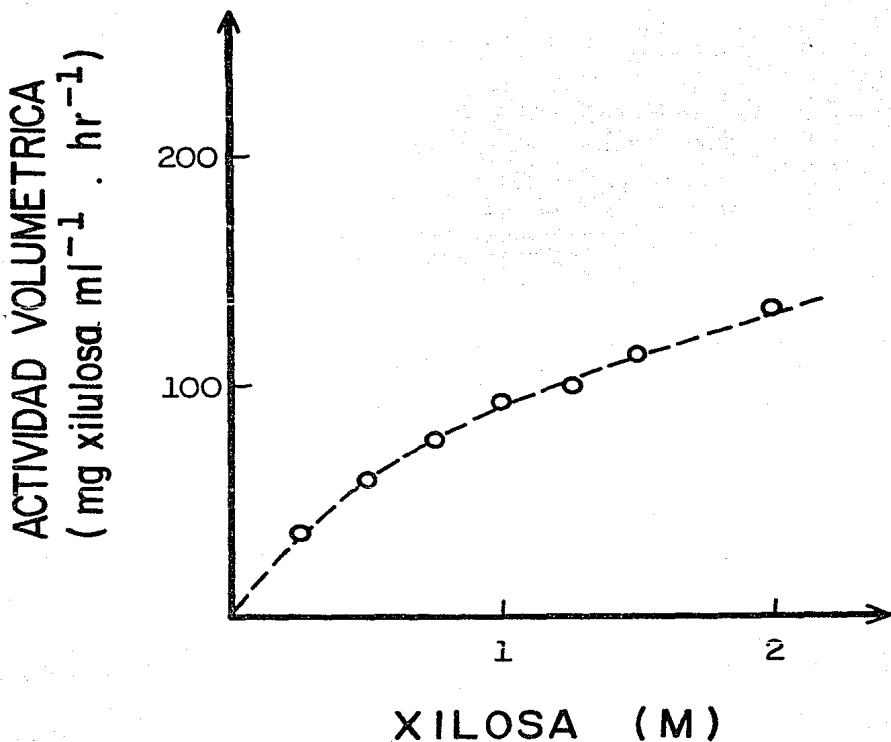


Figura 17.- Efecto de la concentración de xilosa como sustrato de reacción sobre la actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

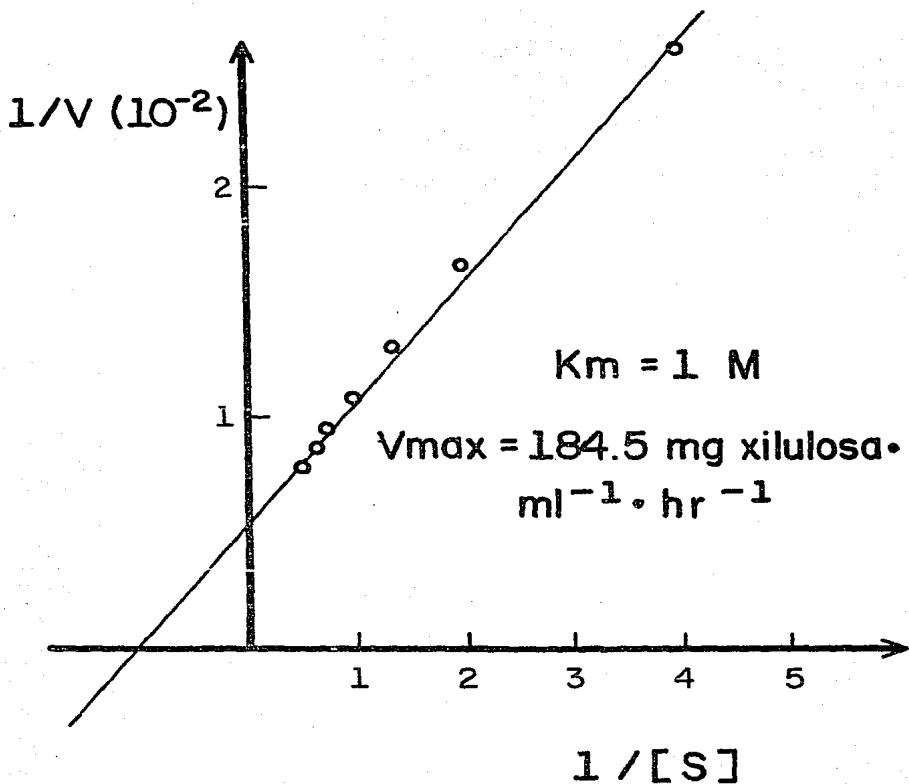


Figura 18.- Curva Lineweaver Burke ajustada por mínimos cuadrados ($r=0.99$, $m=0.52$, $b=0.54$) para afinidad por xilulosa de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

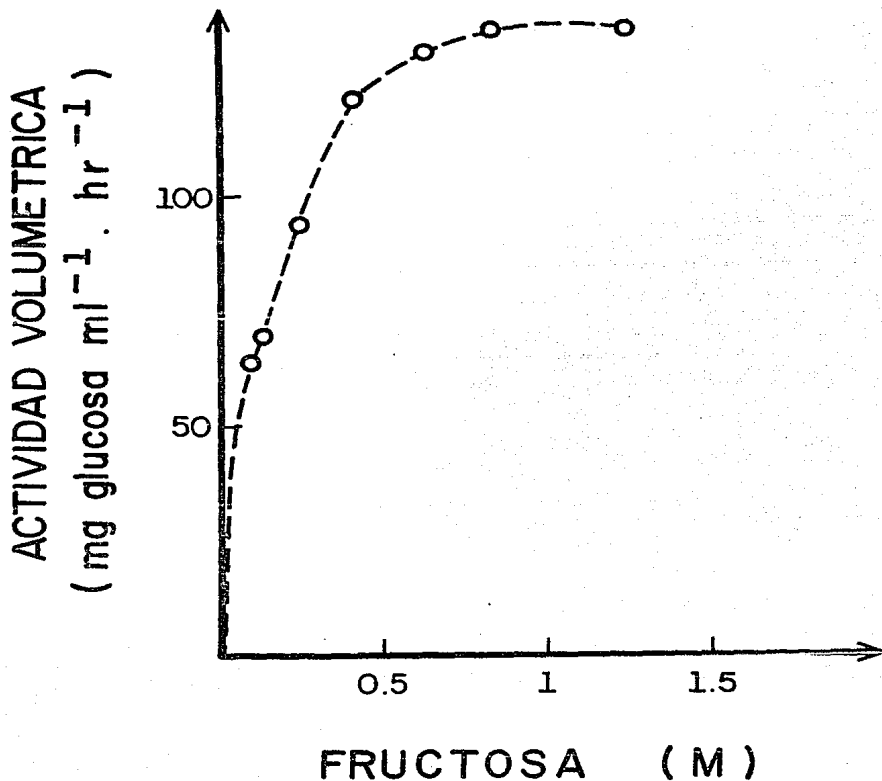


Figura 19.- Efecto de la concentración de fructosa como sustrato de reacción sobre la actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

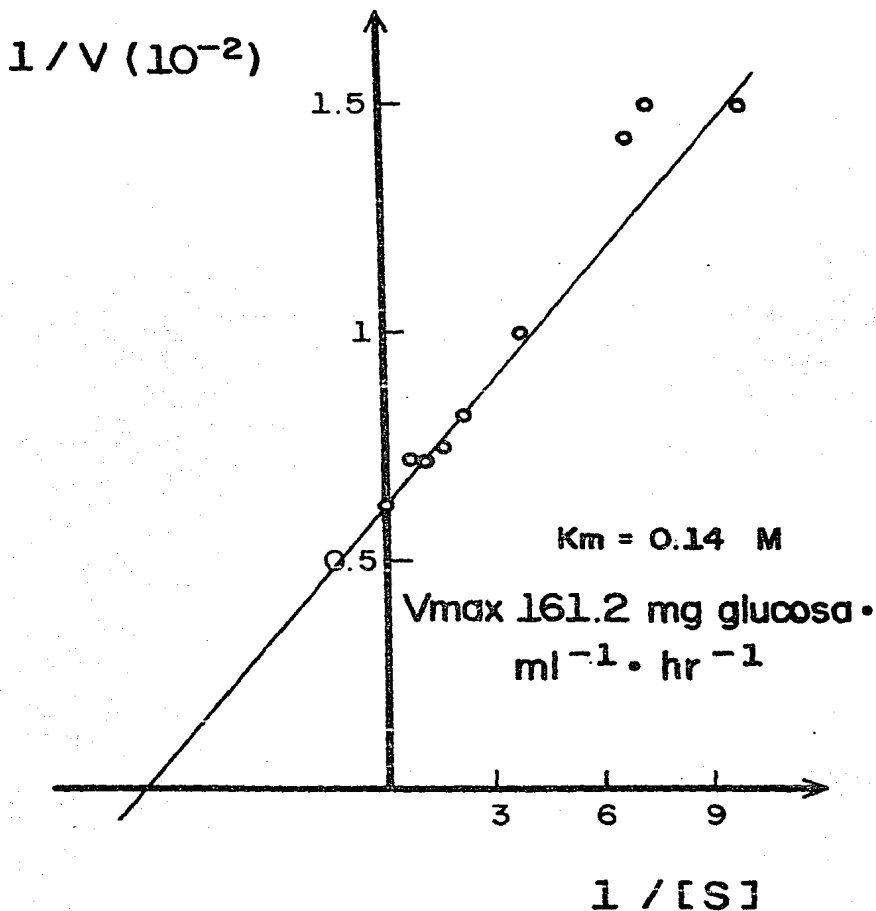


Figura 20.- Curva Lineweaver Burke ajustada por mínimos cuadrados ($r=0.99$, $m=0.092$, $b=0.62$) para afinidad por fructosa de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

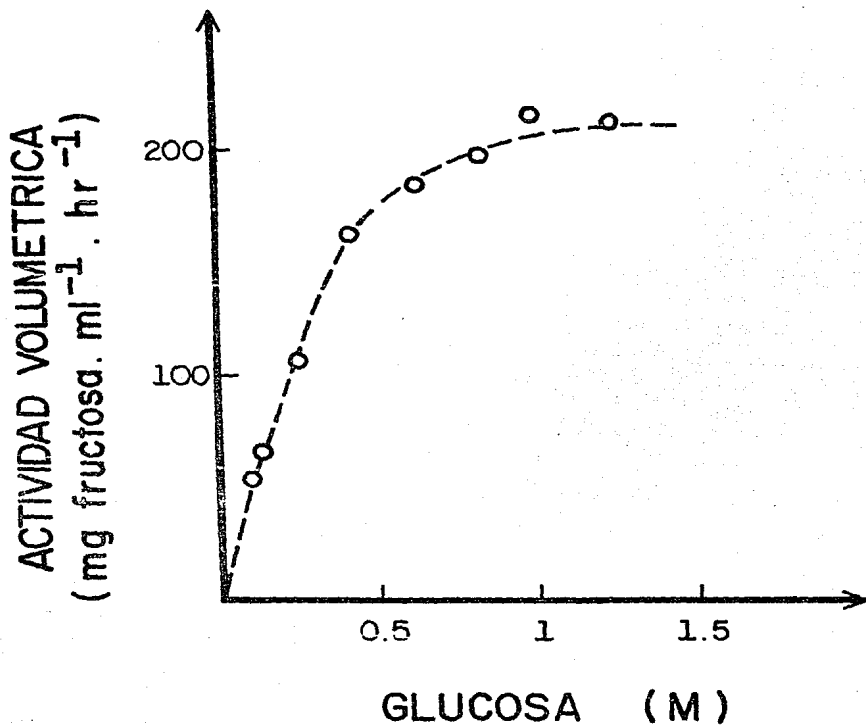


Figura 21.- Efecto de la concentración de glucosa como sustrato de reacción sobre la actividad de glucosa isomerasa de Bacillus coagulans NRRLB5660.

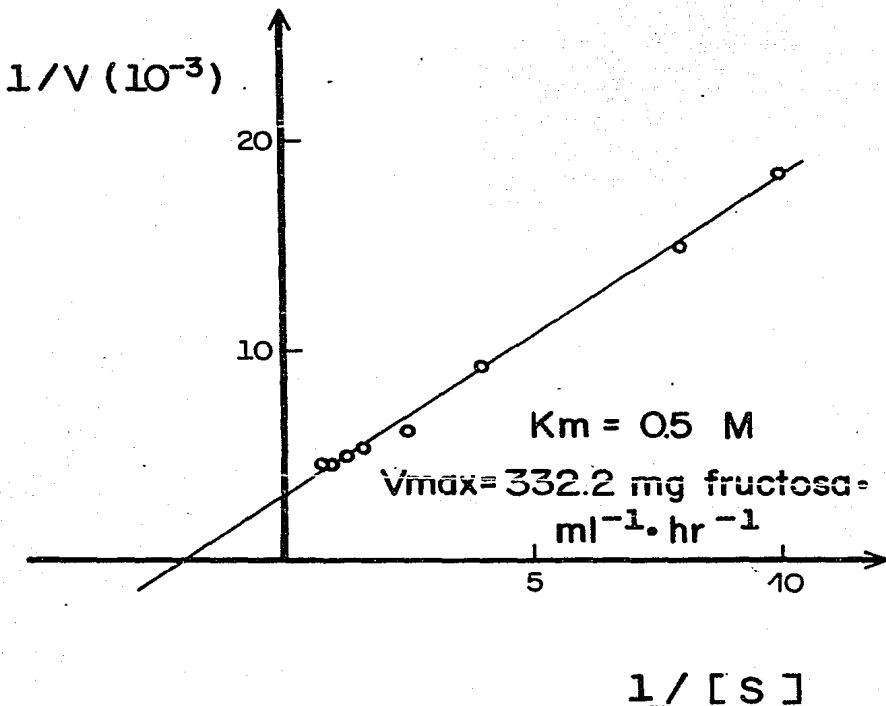


Figura 22.- Curva Lineweaver Burke ajustada por mínimos cuadrados ($r=0.99$,
 $m=1.52, b=3.01 \times 10^{-3}$ para afinidad por glucosa de glucosa isomerasa
de Bacillus coagulans NRRLB5660.

pequeñas para xilosa y glucosa: 0.011 M y 0.009 M, respectivamente, aunque las condiciones de determinación fueron distintas.

En general, las Kms para glucosa isomerasa en otras especies son altas para glucosa y fructosa: 0.92 M la de glucosa en L.brevis, 1.33 M para glucosa y 1.67 M para fructosa en el caso de A.missouriensis. Sin embargo, en general, la Km de xilosa es menor a las demás Kms para el caso de las que se encuentran reportadas: 0.011 M para B.coagulans HN68, 0.005 M para L.brevis, 0.12 M en S.flavogriseus (Chen et al, 1979), 0.022 M en S.olivochromogenes (Suekane et al, 1978).

Una posible explicación de que se haya obtenido una Km tan alta para xilosa, es que los iones no se optimizaron para cada reacción ni tampoco la temperatura y el pH. Esto puede ser un factor importante en las diferencias encontradas ya que Danno (1971) reportó que la actividad isomerizante de D-glucosa y D-ribosa se ven estimuladas por cobalto, mientras que la actividad de D-xilosa se estimula por manganeso. Otra explicación es que se trabajó con células enteras y no con células rotas. También podrían haber existido problemas en el transporte del carbohidrato ya que se sabe que este requiere de una permeasa para entrar a la célula.

En cuanto a las velocidades máximas vemos que las obtenidas con xilosa y fructosa son bastante similares, mientras que la de glucosa es más o menos el doble. Los valores de Vmax reportados para B.coagulans HN68 son: para xilosa de 1.1 y para glucosa 0.52 mg/min. Si convertimos a estas unidades las Vmax obtenidas, se encuentran valores muy bajos: 0.0205 para xilosa y 0.037 para glucosa.

Considerando que esta cepa de B.coagulans NRRLB5660 forma parte de la colección de la agencia NRRL, es posible que esta haya sido seleccionada por su mayor afinidad hacia fructosa y glucosa que hacia xilosa ya que esto podría tener importancia industrial para la fabricación de jarabes fructosados.

f) Termoeestabilidad.

Para conocer la estabilidad de la enzima a la temperatura, propiedad importante en enzimas inmovilizadas que se usan en reactores, se calentaron los 2 ml de células a diferentes temperaturas, desde 35 hasta 85°C, antes de agregar los demás constituyentes del sistema (cofactores y sustrato) y correr la reacción normalmente por una hora a 60°C. También se metió un control con los 2 ml de células más los 0.5 ml de cofactores, ya que se sabe que los cofactores estabilizan a la enzima y la protegen de la desnaturalización (Huitrón & Limon, 1978).

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 23. Estos indican que la enzima es estable entre los 35 y los 75°C. No se aprecia ninguna diferencia significativa entre la curva en la que se usaron cofactores en la incubación y en la que no se usaron. Tal vez si se hubieran utilizado células rotas en lugar de células enteras se habría visto mejor el efecto de los cofactores, pues las células enteras deben de contener un nivel de iones que permita esta estabilidad. Sin embargo, se puede concluir que aún sin cofactores, la enzima es estable entre 35 y 75°C.

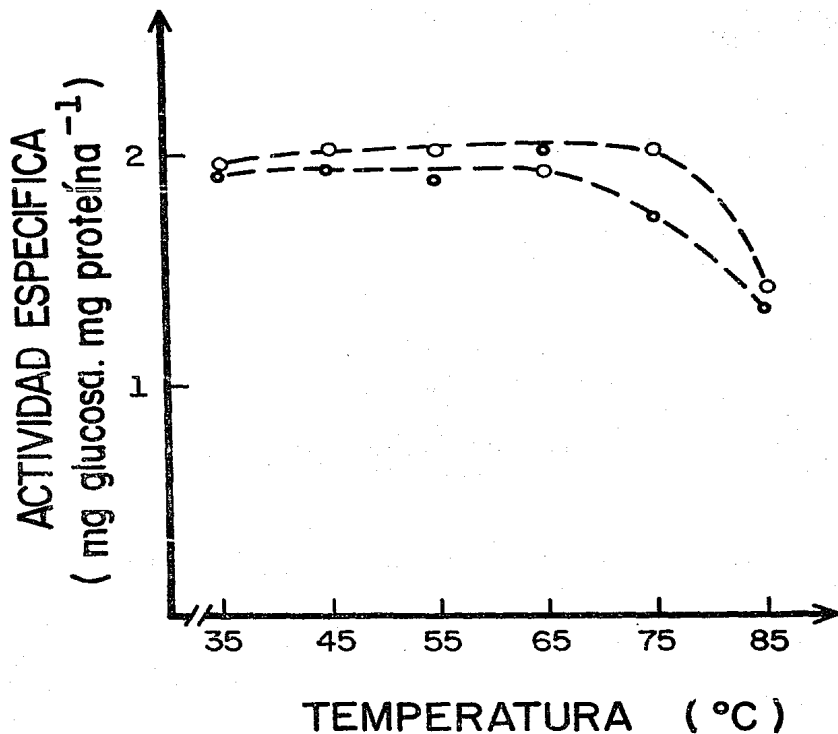


Figura 23.- Curva de termoestabilidad para glucosa isomerasa de *Bacillus coagulans* NNRL55660, en presencia de cofactores (○) y en ausencia (◻). Se calentaron los 2 ml de células del sistema de reacción, a las diferentes temperaturas, antes de agregar los cofactores y la fructosa y correr la reacción a 60°C por 1 hr.

g) Inducción de la enzima por xilosa.

Muchos autores han reportado que la glucosa isomerasa es una enzima inducible por xilosa (Chen,1970). Con el fin de comprobar esto se creció al microorganismo en el medio completo reportado por Danno (1966) con distintas concentraciones de xilosa, de glucosa, de ambas fuentes juntas y sin ninguna fuente. El microorganismo creció en todos los medios y la actividad de la enzima se midió por el método de glucosa oxidasa.

Los resultados se muestran en la tabla 10. Como se puede ver, únicamente los microorganismos crecidos en xilosa presentaron actividad isomerizante. La máxima actividad isomerizante fue obtenida cuando se emplearon entre 6.6 y 66 mM, con mayores concentraciones del carbohidrato se observó una disminución de aproximadamente un 25% de la actividad total.

El hecho de que solo en xilosa se presente actividad y no en glucosa, nos esta hablando de que la enzima es inducible por xilosa desde concentraciones tan bajas como 6.6 mM. Sin embargo, por arriba del 66 mM la xilosa parece de alguna manera afectar negativamente la actividad de la enzima. La xilosa podría estar reprimiendo la síntesis de las enzimas que la metabolizan o podría ser una inhibición por sustrato o algún problema de pH.

De los medios crecidos en ambas fuentes de carbono, únicamente el que tenía mayor concentración de xilosa presento actividad, aunque solo el 25%. Ninguno de los otros la tuvo. Esto podría deberse a que la glucosa afecte negativamente la síntesis de la enzima y por ello no se presente isomerización. El microorganismo al tener ambas fuentes disponibles, utiliza prefe-

TABLA 10

- ACTIVIDAD ISOMERIZANTE DE Bacillus coagulans NRRLB5660
- A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE XILOSA, GLUCOSA Y AMBAS
- FUENTES DE CARBONO EN EL MEDIO DE CULTIVO.

FUENTE DE CARBONO	CONCENTRACION (mM)	ACTIVIDAD RELATIVA (%)
xilosa	100.8	13.8
"	133.2	12.6
"	66.2	100
"	16.6	100
"	6.6	100
glucosa	27.7	0
"	55.4	0
glucosa 1+	27.7	
xilosa 1	33.3	0
glucosa 2+	55.4	
xilosa 1	33.3	0
glucosa 3+	110.9	
xilosa 1	33.3	0
ninguna	-	0
glucosa 1+	55.4	
xilosa 2	133.2	25.0

* La actividad obtenida con xilosa 6.6 mM fue tomada como el 100 %.

rentemente la glucosa y deja intacta la xilosa. Este sería un caso parecido al de la enzima B-galactosidasa inducible por lactosa; si las células se crecen en lactosa y glucosa, la actividad de B-galactosidasa se reprime (Jacob & Monod, 1961). Sin embargo, en la misma tabla se puede ver que al encontrarse mayor concentración de xilosa que de glucosa, la enzima parece desprenderse un poco de la represión por glucosa y es por esto que se detecta un poco de actividad.

Las características de la enzima de B.subtilis 168 han sido determinadas en el laboratorio y se presentan en la Tabla 11 comparadas con las de B.coagulans NRRLB5660. La actividad de ambas enzimas, así como su temperatura y pH óptimos, son bastante parecidos. Las diferencias más significativas se encuentran en las afinidades por fructosa y xilosa. B.subtilis tiene más afinidad por xilosa que por fructosa, y B.coagulans es lo contrario. También la diferencia en la termoestabilidad es importante, ya que B.subtilis pierde su actividad al incubar la enzima a 60°C y B.coagulans la mantiene entre 35 y 75°C. Por lo tanto se puede afirmar que se cuenta con parámetros que en un momento dado podrán permitir distinguir entre la enzima donadora y receptora (si B.subtilis 168 se usa como receptora) como en el caso de la α amilasa.

TABLA 11

PROPIEDADES DE LA ENZIMA GLUCOSA ISOMERASA DE Bacillus subtilis 168 y Bacillus coagulans NRRLB5660

CARACTERISTICA	<u>B.subtilis</u>	<u>B.coagulans</u>
Actividad promedio	0.8 mg glucosa mg proteína ⁻¹	1.0 mg glucosa mg proteína ⁻¹
Temperatura óptima	60°C	60°C
pH optimo	7.6	8.0
Km glucosa	0.78 M	0.5 M
Km fructosa	1.04 M	0.14 M
Km xilosa	0.21 M	1.0 M
Inducción	xilosa	xilosa
Temperatura de crecimiento	37°C	45°C
Localización	100% intracelular	100% intracelular
Termoestabilidad	Pierde 60% actividad después de incubar a 60°C	Retiene actividad tras incubación a 35-75°C

B.- ESTRATEGIAS DE CLONACION DEL GENE DE GLUCOSA ISOMERASA DE Bacillus coagulans NRRLB5660 en Bacillus subtilis.

Hemos propuesto dos posibles estrategias de clonación del gene en B. subtilis:

En la primera estrategia se pretende emplear como vector el plásmido pC194 (Figura 6) de S.aureus que confiere resistencia a cloranfenicol y como enzima de restricción a Hae III o Hind III. Este plásmido no contiene sitios de corte para estas enzimas en el gene de resistencia por lo que no se presentará inactivación insercional. Los fragmentos de ADN cromosomal y del vector se unirán mediante la ADN ligasa del fago T4.

La cepa receptora de la molécula recombinante sera una cepa mutante de B.subtilis incapaz de utilizar D-xilosa y con actividad isomerizante reducida. Uno de los objetivos generales del proyecto es el obtener esta cepa mutante xil por mutagénesis, con el fin de que sirva como cepa receptora no solo para la información de B.coagulans, sino de cualquier otra cepa.

En un principio se obtuvo una mutante de B.subtilis 168 por mutagénesis con NTG (4mg/ml en amortiguador Tris 0.1M pH7.0, durante 40' a 37°C) con las siguientes características:

- 1) Actividad isomerizante de una tercera parte que la cepa padre.
- 2) Problemas de crecimiento en medio mínimo aun con glucosa.
- 3) Sin crecimiento en xilosa como única fuente de carbono tras 96 hrs incubación en medio líquido.
- 4) Indicios de crecimiento en medio sólido tras incubación prolongada.

Esta nueva cepa resulto ser adecuada en cuanto a su incapacidad de utilizar xilosa, pero el crecimiento deficiente en glucosa, podría indicar la presencia de otros trastornos que pudieran obstaculizar el reconocimiento de las colonias deseadas. El comportamiento subsecuente de esta cepa mostró que el tiempo en el que aparecia crecimiento era cada vez más corto y la curva de crecimiento en liquido demostraba que, aunque existía un retardo considerable en el crecimiento en xilosa con respecto a glucosa, finalmente se alcanzaba el mismo nivel (Figura 24).

Otro hecho en contra de esta cepa o de cualquier derivada de B.subtilis 168 es que posee sistema de recombinación que le permitirían integrar información al cromosoma (Ehrlich,1977;Canosi,1976), así como sistemas de restricción y modificación que le permitirían alterar el ADN heterólogo, si bien los niveles de estas enzimas son bajos (Ganesan,1992).

Debido a estos inconvenientes para usar a esta mutante como receptora, se decidió pedir otra cepa que tuviera fenotipo $\underline{r} \underline{m}$ y proceder a mutagenizarla buscando un método óptimo de mutagénesis. Así pues, llegó al laboratorio una cepa de B.subtilis IA422 con fenotipo $\underline{leu} \underline{r} \underline{m}$ recE4. Esta posee baja actividad isomerizante (Figura 25). Respecto a la cepa B.coagulans NRRLB5660 esta tiene una decima parte de su actividad, y respecto a B.subtilis 168, tiene una tercera parte. Sin embargo, su crecimiento tanto en sólido como en líquido en xilosa es perfecto. Se continuará trabajando con esta cepa para convertirla en \underline{xil} .

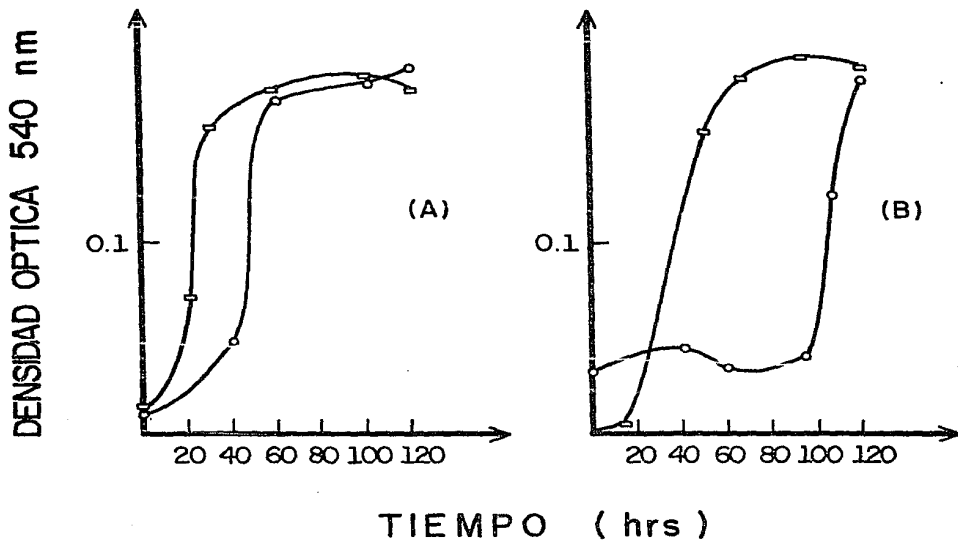


Figura 24.- Curvas de crecimiento de *B. subtilis* 168 (A) y su derivada xil (B) en glucosa (x) y xilosa (o). Se usó medio mínimo Spizizen con triptofano 0.001%. La glucosa se añadió al 1% y la xilosa al 2%.

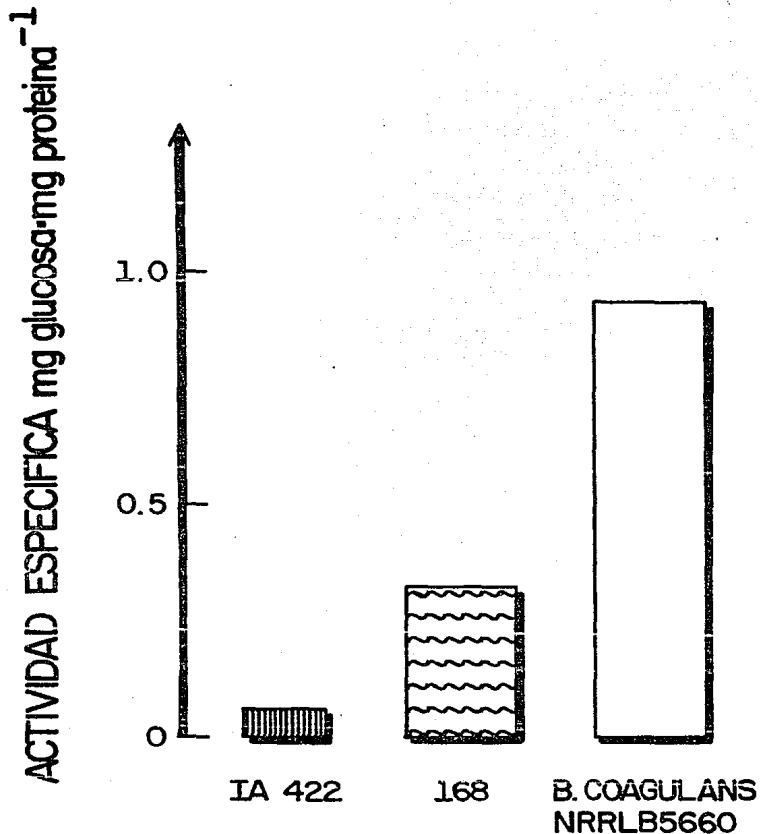


Figura 25.- Actividad isomerizante de glucosa isomerasa para las posibles cepas receptoras de B.subtilis IA422 y 168, en comparación con la cepa donadora B.coagulans NRRLB5660.

Se espera reconocer a las colonias que hayan adquirido el gene de glucosa isomerasa por complementación funcional, esto es, un grupo de cepas capaces de crecer en el antibiótico al cual les confiere resistencia el plásmido, en este caso cloranfenicol, se replicarán a un medio mínimo en el que la xilosa sea la única fuente de carbono. La cepa receptora deberá ser incapaz de crecer en xilosa, por lo que las colonias que crezcan tendrán posibilidades de haber adquirido la información de las moléculas recombinantes. También contamos con un método de reconocimiento que consiste en un medio a base de peptona al 1 %, NaCl 0.5 %, xilosa al 4 % y con purpura de bromocresol al 0.004 % como indicador. La cepa receptora sería incapaz de cambiar el color del medio por no utilizar D-xilosa. Este método resulta claro para cepas de E.coli. La cepa IA422, con baja actividad isomerizante se comporta ligeramente diferente a B.subtilis 168 que la presenta alta. Aquellas recombinantes capaces de utilizar el carbohidrato variarían el pH del cultivo y con ello un cambio en la coloración del medio de purpura a amarillo. Sin embargo, este método debería ser empleado con mucho cuidado, ya que pequeños cambios en el pH inicial, en la densidad del inóculo o en el grosor de la caja de agar en la caja de Petri, pueden variar la coloración de las colonias e impedir distinguir las colonias capaces de usar la fuente de carbono.

Para comprobar que las colonias han adquirido la información deseada, será necesario extraer el plásmido y verificar la presencia del inserto. Posteriormente se podría hacer un análisis más completo con enzimas de restricción para localizar y comprobar el tamaño del mismo.

En caso de que hubiera inserto, sería importante volver a transformar con este plásmido para asegurar que se repite el fenómeno de complementación funcional en la cepa receptora. También habría que medirle la actividad isomerizante a esta cepa recombinante para comparar sus niveles de actividad con la cepa receptora sin transformar. Otros pasos adicionales en la caracterización podrían involucrar hibridización in vivo o in vitro o ensayos inmunológicos.

También pretendemos purificar el plásmido pSC104 (Lofdahl, 1979) para tenerlo como otra alternativa en caso de que surgan problemas con el pC104. Este plásmido es un híbrido natural entre el pC104 y el pS104, confiere resistencia a cloranfenicol y estreptomycinina y tiene dos sitios de corte para Hind III y uno para Eco RI.

Tanto Ehrlich (1977) en el caso del pC104 como Lofdahl (1979) para el pSC104, han logrado clonar genes de resistencia a antibióticos provenientes de otros plásmidos en B. subtilis. Estos plásmidos se han replicado dentro del huésped y han expresado la información de los genes que los componen con bastante eficiencia. Este hecho los coloca como candidatos a servir como vectores para la clonación de otros genes. El uso del pSC104 se ha visto restringido por algunos reportes que mencionan cierta inestabilidad al introducirle información en el sitio de Eco RI (Uhler, 1981).

A pesar de que estos y otros plásmidos de S. aureus han demostrado propagarse en B. subtilis, la clonación directa de secuencias de ADN con estos vehículos es ineficiente si se compara con el sistema en E. coli (Ostroff & Penz, 1984). El problema central, como ya se mencionó anteriormente, es que

la transformación de células competentes de E.subtilis, requiere de plásmidos multiméricos para que sea eficiente (Gryzcan et al, 1980). Se pretende probar tanto el método de células competentes como el de protoplastos para encontrar las mejores condiciones de transformación.

La segunda estrategia de clonación que se plantea es la que utiliza plásmidos bifuncionales para clonar, primero en E.coli y después en E.subtilis. El plásmido a usar es el pHV33 (Figura 7) con el fin de clonar en primera instancia una cepa de E.coli deficiente en su utilización de xilosa para posteriormente introducir el plásmido recombinante a la cepa mutante de E.subtilis.

La estrategia sería cortar el ADN con la enzima Bam HI que corta en el gene de tetraciclina y reconocer en E.coli a las colonias sensibles a este antibiótico. También se podrían usar otras enzimas como Sal GI que también corta en tetraciclina, o Pst I que corta en ampicilina. La enzima que se use dependerá de la sensibilidad del plásmido y del ADN cromosomal a la digestión con estas enzimas.

Una vez reconocidas las clonas recombinantes en E.coli, se les extraería el plásmido y se retransformaría en E.subtilis. En este caso, solo el gene de cloranfenicol se expresa por lo que las recombinantes se reconocerán por su resistencia a este antibiótico.

Rapoport (1979) logró construir un banco de genes en E.coli que contiene gran parte del genoma representativo de E.subtilis 169, con el plásmido pHV33. El empleo del plásmido para este fin comprobó su uso po-

tencial como vector para la clonación en E.coli y B.subtilis.

El clonar primero en E.coli tiene varias ventajas entre las que se encuentran el hecho de que en caso de que el plásmido sea linealizado durante su entrada a la célula, este es fácilmente recircularizado y amplificado en E.coli, lo que no sucede en B.subtilis. Otra ventaja es que en E.coli los plásmidos recombinantes se mantienen estables aún bajo condiciones selectivas, lo cual no es el caso de E.subtilis Rec⁺ (Rapoport,1979).

C.- MONTAJE DE TECNICAS PARA LA CLONACION DEL GENE DE GLUCOSA ISOMERASA.

a) Purificación de plásmidos.

Los plásmidos pC194 y pSC194 se purificaron a partir de B.subtilis HVS58 y SB202(HVS98) respectivamente, empleando el método de Kiesselburg para B.megaterium (1984). El principal problema en la extracción fue que se obtenía muy poca cantidad de plásmido a partir de un litro de medio. Esto lo atribuimos a que estos plásmidos no son multicopias, ni tampoco son amplificables. Fue necesario extraer a partir 5 litros de medio para obtener una cantidad de plásmido que permitiera trabajar.

En la Figura 26, se muestra una foto de una electroforésis en gel de agarosa al 0.8 % en la que se encuentra, en el carril 1, el plásmido pC194 (10ul) y en el carril 2 el pSC194 (10ul).

Las diferentes bandas en un carril con muestra de plásmido, indican las diferentes formas en que éste se encuentra; la banda de hasta arriba representa formas multiméricas, las bandas de más abajo formas circular monoméricas, más abajo formas lineales y más abajo aún fragmentos de plásmido. Estos patrones se pueden alterar de acuerdo al método de purificación y fuerza iónica de la solución en que se preservan.

En el caso del pC194, solo se ve una banda muy arriba, mientras que el pSC194 esta representado por una banda más intensa hasta arriba y algunas bandas por debajo de esta. En ambos casos el ADN esta puro y en condiciones de ser empleado para experimentos posteriores. También se purificó el plásmido pHV33 por el método de Gurry, 1973, a partir de E.coli SK1592.

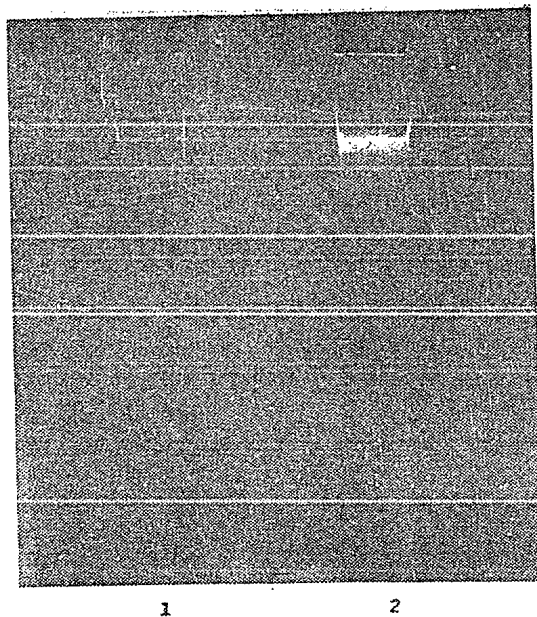


Figura 26.- Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los plásmidos pC194 (carril 1) y pSC194 (carril 2); la muestra en cada carril fue de 10 ul de ADN en amortiguador TE. El método de extracción fue el de Kielselburg (1984).

b) Purificación de ADN cromosomal.

Se probaron tres métodos distintos (Bolivar, 1977; Burke, 1977 y Rodriguez, 1983), cuyas principales variables se muestran en la Tabla 12.

La principal diferencia entre los tres métodos probados es que el de Bolivar emplea EDTA como agente quelante mientras que los otros no. El de Bolivar y Rodriguez utilizan sacarosa y el de Burke no. Bolivar reporta en su método el uso de lisozima con incubación a 0°C por 15', mientras que los otros métodos la emplean a 37°C por 30'.

El método de Bolivar es un método general, mientras que el de Burke y Rodriguez son específicos para Bacillus. Con el método de Bolivar se obtuvieron buenos resultados en cuanto a que en el gel de agarosa se veía una sola banda, lo que indica que el ADN está entero y libre de contaminantes. El problema fue que no se obtenían cantidades suficientes para seguir trabajando. Con el método de Burke, se obtuvo gran cantidad de ADN, pero en el gel se veía sumamente degradado. Finalmente, el método de Rodriguez dio buenos resultados al obtenerse mucho ADN e íntegro.

En la Figura 27 se encuentra la foto de la electroforesis en gel de agarosa que se corrió para comprobar el estado del ADN cromosomal extraído por el método de Rodriguez. Se pusieron 1, 5 y 10 ul de muestra. En el carril con 1 ul se aprecia una banda muy leve, en el de 5 ul la banda se ve claramente, y en el carril de 10 ul la banda está muy intensa. En todos los casos la banda está a la misma altura y no se ven bandas más abajo, que en este caso representarían contaminantes como ARN o ADN cromosomal muy degradado.

Tabla 12

COMPARACION DE DIFERENTES METODOS DE EXTRACCION DE ADN

CONDICION	Bolivar	Burke	Rodriguez
Amortiguador	Tris 50 mM EDTA 1 mM pH7.5	Tris 10 mM EDTA 10 mM	Sacarosa 20% EDTA 50 mM Tris-HCl 50mM pH7.6
Sacarosa	25%	-	25%
Lisozima	0.5 mg/ml 0°C 15 min	0.1 mg/ml 37°C 30 min	5.0 mg/ml 37°C 30 min
RNasa	0.1-0.5 mg/ml 37°C 60 min	0.1 mg/ml 37°C 10 min	10 mg/ml 37°C 2 hrs
Proteasa	0.5 mg/ml 37°C 60 min	0.1 mg/ml 37°C 60 min	2.0 mg/ml 37°C 60 min
Detergente	Tritón 3X	SDS 0.1%	SDS 27%
Agente Quelante	EDTA	-	-

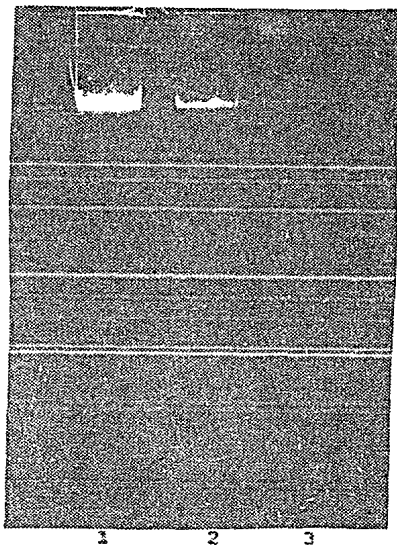


Figura 27.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de ADN cromosomal de *E.coagulans* NRRLB5660 extraído por el método de Rodríguez (1983). El carril 3 contiene 1 ul de muestra del ADN disuelto en amortiguador TEN, el carril 2 contiene 5 ul y el 1, 10 ul.

Quizá el éxito con el método de Rodriguez se debe básicamente a que este permite la acción independiente de la RNasa, la lisozima y la pronasa, además de que emplea mayores concentraciones de estas y se hacen más extracciones fenólicas entre cada tratamiento enzimático.

c) Transformación.

Se probaron los dos métodos de transformación para E.subtilis que son el de Dubnau,1971 y el de Chang,1979.

El montaje del método de Dubnau implicó la prueba de diversos factores como:

1.- Concentración de ADN.

En la Figura 28 se muestra el resultado de la transformación con diferentes concentraciones de ADN, desde 0.5 hasta 20 ug/ml. Esto se hizo con plásmido pUB110 y se seleccionó en medio de Luria con 7.5 ug/ml de kanamicina y se incubó 30".

Como se aprecia en la figura, el número de transformantes aumenta hasta 7.5 ug/ml de ADN en donde la curva se acuesta manteniéndose el mismo nivel de transformantes hasta con 20 ug/ml de ADN. Se llegó a la conclusión de que el uso de 2.5 a 5 ug/ml de ADN sería adecuado para posteriores experimentos ya que se obtienen muchas transformantes sin haber llegado aun a saturación.

2.- Tiempo de incubación.

La Figura 29 muestra los resultados de la transformación a diferentes tiempos de incubación con el ADN. El óptimo resultó ser 60", punto en el que se obtiene el máximo número de transformantes por ml.

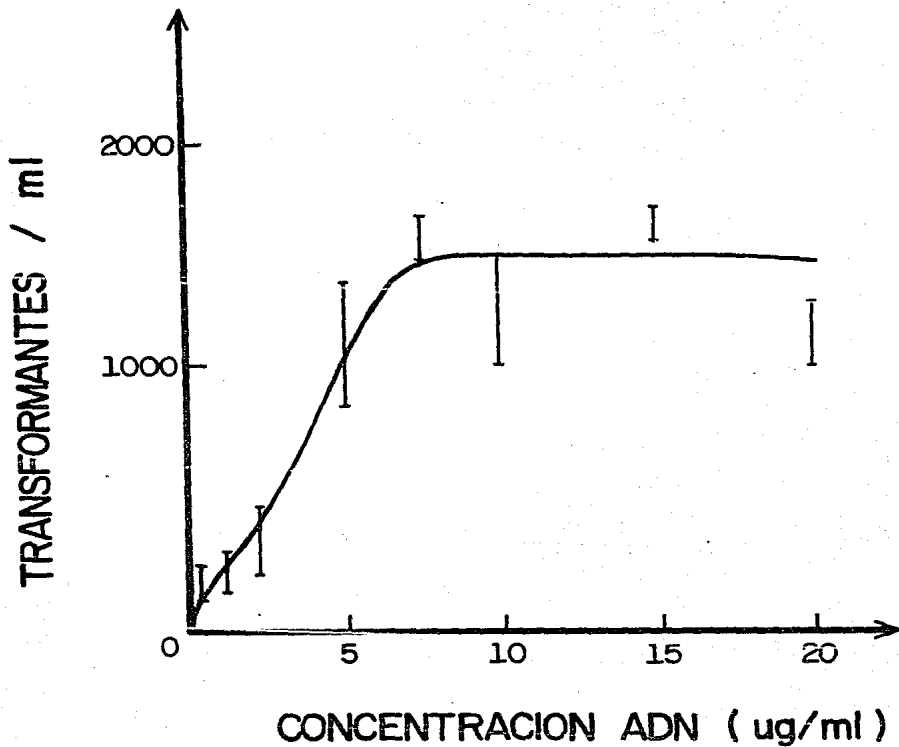


Figura 28.- Transformantes en función de concentración de ADN. Se utilizó plásmido pUB110, se seleccionó en medio de Luria con 7.5 ug/ml de kanamicina y se incubó durante 30'.

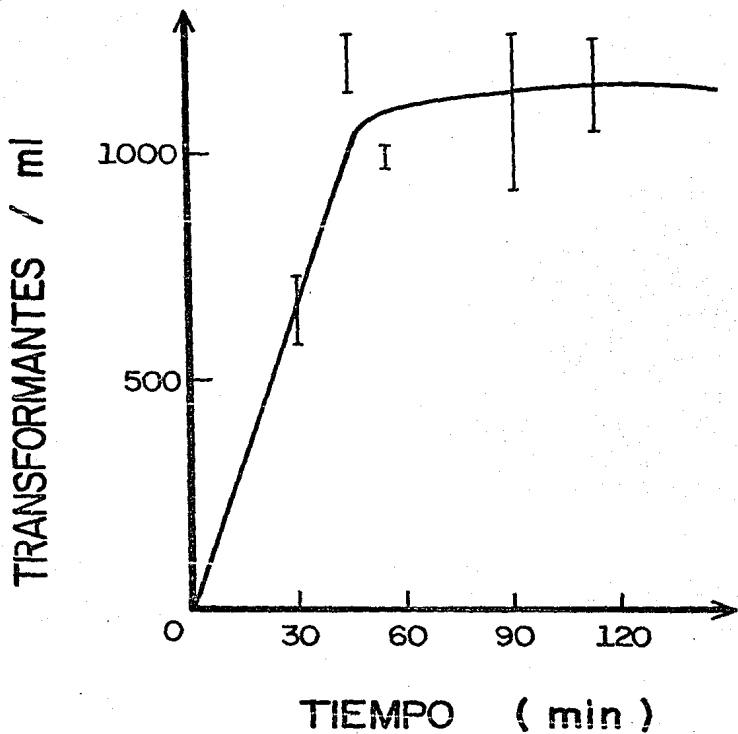


Figura 29.- Transformantes en función del tiempo de incubación con ADN. Se usaron las mismas condiciones que la figura anterior.

3.- Otras modificaciones.

Algunos autores han propuesto otras modificaciones al método de Dubnau como son el empleo de sales de Davis (Valenzuela, 1961), que son básicamente iones para facilitar la entrada del ADN a la célula, el uso de polietilenglicol 50% (50ul) para precipitar más ADN a la superficie celular o bien el evitar la expresión fenotípica del plásmido para que este no se pierda al ocurrir replicaciones en condiciones en que no hay presión selectiva. Sin embargo, ninguno de estos cambios dió mejores resultados comparados con el control en el que se emplearon 2 ug de ADN con el método normal (Tabla 13).

La optimización del método de Chang basado en la formación de protoplastos involucró las siguientes variables:

1.- Edad del cultivo.

En los primeros experimentos de transformación que realizamos, tomábamos a las células en fase logarítmica, sin embargo, no obtuvimos transformantes. Fue así como decidimos que tal vez era necesario dejar más tiempo las células en incubación porque se requeriría de algún factor de competencia para obtener transformantes. Así pues, transformamos con células en fase logarítmica y en fase estacionaria, y únicamente obtuvimos resultados positivos con células de fase estacionaria, como se puede ver en la Tabla 14. Esto parecería indicar que efectivamente se requiere de algún factor de competencia.

2.- Concentración óptima de lisozima.

Fue necesario optimizar la concentración de lisozima ya que es

Tabla 13
MODIFICACIONES AL METODO DE DUBNAU

TRATAMIENTO	TRANSFORMANTES/ML
CONTROL	1320
Sales de Davis (1)	335
Polietilenglicol 50%	
(50ul) (2)	100
No expresion fenotipica (3)	675

(1) K₂PO₄ pH7.4 0.06M; (NH₄)₂SO₄ 7.6mM;
MgSO₄ 0.2mM (Valenzuela,1981)

(2) Bingham,1980

(3) Doii,R. en Rodriguez,1983.

Nota.- Para el control se empleo el método
Dubnau, utilizando 2 ug de ADN, misma
cantidad que se uso para los demás.

Tabla 14

ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES OPTIMAS PARA EL MANEJO DE LA
TECNICA DE TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS.

(A)

Concentración Lisozima (mg/ml)	Fase logarítmi- ca media	Fase estacionaria
	TRANSFORMANTES	SUPERVIVIENTES
0.0	0	2.53×10^9
0.5	0	2.16×10^9
1.0	0	2.32×10^7
2.0	0	4.71×10^6
		TRANSFORMANTES
		0
		0
		1.26×10^5
		7.67×10^5

pC104 1 ug (antes de ultracentrifugar). Selección en LB cloran-
fenicol 2 mg/l.

(B)

EFEECTO DE ULTRACENTRIFUGACION

Antes de ultracentrífuga	62% transformantes
Despues de ultracentrífuga	57% transformantes

(C)

PLASMIDO UTILIZADO EN TRANSFORMACION

pC 104	45%
HV 33	40%

cesario encontrar el balance entre una óptima formación de protoplastos y una baja mortalidad.

La concentración óptima resultó ser de 2 mg/ml. Los resultados de la tabla ¹⁴ señalan que la disminución de cantidades de lisozima efectivamente reduce la mortalidad, pero no incrementa la obtención de transformantes, probablemente porque la protoplastización no es eficiente.

3.- Formas de plásmido.

Como se mencionó anteriormente, las formas multiméricas transforman más eficientemente células competentes, que formas monoméricas. En el caso de la transformación por protoplastos, esto supuestamente no es necesario y transforman igual multiméros que monómeros. Sin embargo, quisimos comprobar este hecho, para lo que transformamos con preparaciones de plásmido pasadas por la ultracentrífuga, en las que dominan monómeros, y preparaciones no pasadas por la ultracentrífuga, en las que si pueden estar presentes formas multiméricas que serían más resistentes a daños por nucleasas si la competencia esta inducida. Como puede verse en la segunda parte de la Tabla 14, no representa ningún problema la utilización de monómeros.

4.- Esta última variable consistió en probar como transformaban dos plásmidos, el pC104 y el pHV33, para conocer si existía alguna diferencia en su eficiencia de transformación, sobre todo en el caso de pHV33 que al ser un plásmido bifuncional podría presentar alguna diferencia. Como se puede apreciar al final de la Tabla 14, ambos plásmidos transforman de ma-

ra muy similar, lo que indica que la naturaleza del plásmido no afecta la eficiencia de transformación.

Dado que el método de formación protoplastos produce una mejor eficiencia de transformación que el método de células competentes (6.3×10^5 contra 1320 transformantes/ml), dos ordenes de magnitud más, lo cual corresponde a los reportes de la literatura (Chang & Cohen, 1979), y debido a que este último es más laborioso, pretendemos emplear el método de Chang para posteriores transformaciones.

d) Sensibilidad del ADN a enzimas de restricción.

La digestión del ADN se realizó utilizando el sistema citado en material y metodos, variando las cantidades proporcionalmente dependiendo del experimento.

En la Figura 30 se encuentra la foto del gel de agarosa en la que se muestra la digestión del pC194 con la enzima Hae III, misma que se pretende emplear en el experimento de clonación. El barrido que se ve de la muestra, en el carril con ADN sin digerir indica que este se encuentra un poco degradado. La banda del carril de ADN digerido se encuentra un poco por debajo de la banda del control. Sin embargo, para confirmar la digestión, es necesario checarla por transformación. Esto se hizo plateando en medio con cloranfenicol y esperando no encontrar o encontrar pocas colonias debido a la linearización del plásmido por la digestión y por lo tanto la incapacidad del gene de expresarse. Los resultados obtenidos fueron los esperados, es decir, cero colonias en el medio con antibiótico usando el plásmido digerido. Para el caso del plásmido sin digerir también se encon-

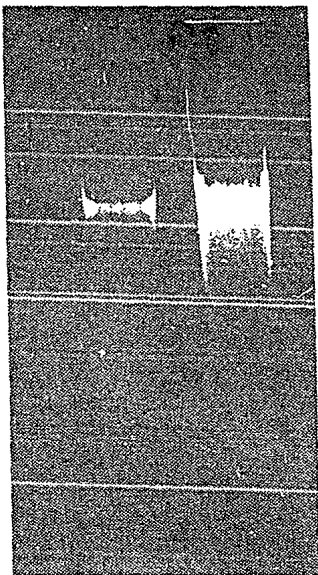


Figura 30.- Electrorroesis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pC194 digerido con Hae III. En el carril 2 se encuentra el control sin digerir y en el carril 1 el digerido. La digestión se practicó de acuerdo al método reportado por Bolivar et al (1977).

tró lo esperado, muchas colonias en el medio de Luria sin antibiótico y también en el medio con el antibiótico. La digestión del pSC104 con Hae III también se hizo y se obtuvieron resultados similares.

Para conocer la sensibilidad del ADN cromosomal a la digestión por enzimas de restricción, se montaron varios sistemas empleando varias enzimas disponibles. En la Figura 31 se ve claramente que el ADN cromosomal es sensible a la digestión con Hae III, Pal I, Pst I y Bam HI. La digestión con Eco RI no se dió tal vez porque este ADN tenga pocos sitios de corte para esta enzima. En un experimento independiente se comprobó que era el lote de enzima el que estaba en malas condiciones.

En la Figura 32 se encuentra una foto de la electroforesis en gel de agarosa del pHV33 digerido con Pst I y sin digerir. En este caso, también se ve un barrido efecto de la digestión, además de que la banda correspondiente a los multímeros ha desaparecido y aparece solo una banda más abajo, lo que quiere decir que los multímeros se han convertido en monómeros.

Aunque se había checado anteriormente la digestión del ADN cromosomal con la enzima Pst I, se quiso confirmar, ya que se cuenta con suficiente cantidad de esta enzima para ser empleada en los experimentos de clonación con el plásmido pHV33 en E.coli. En la Figura 33 se ve claramente que la digestión fue correcta.

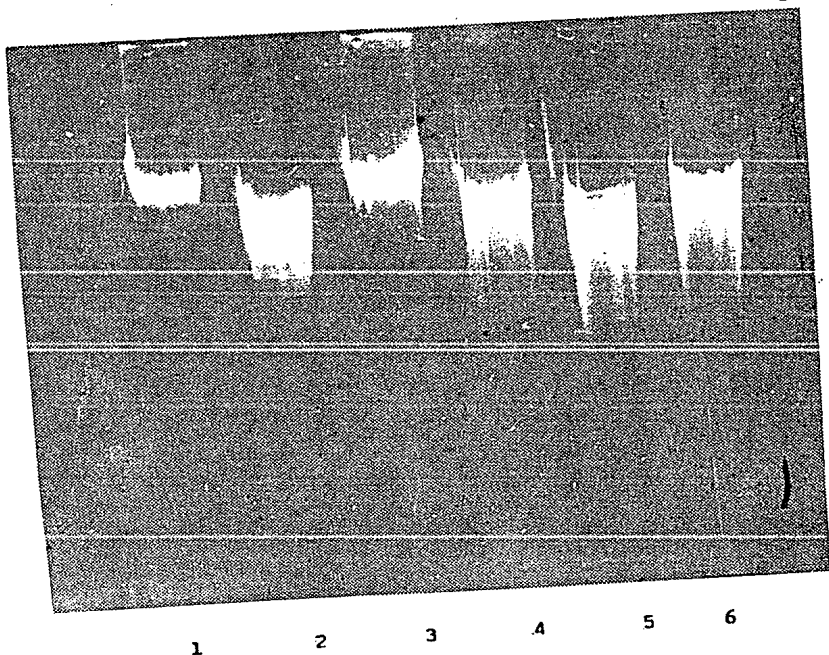


Figura 31.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de ADN cromosomal de *B.coagulans* NRRLB5660 digerido con varias enzimas de restricción: carril 1, control sin digerir, carril 2 digerido con Hae III, carril 3 con Eco RI, carril 4 con Pst I, carril 5 con Pst I y carril 6 con Bam HI. La digestión se realizó según el método de Bolivar et al, (1977).

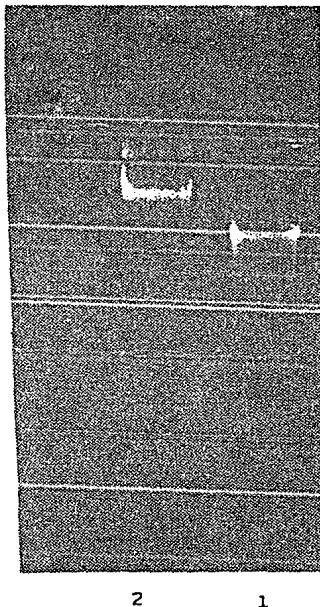


Figura 32.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% del plásmido pHV33 digerido con Pst I, carril 1. El carril 2 muestra el control sin digerir. El método de digestión fue el de Bolivar et al, (1977).

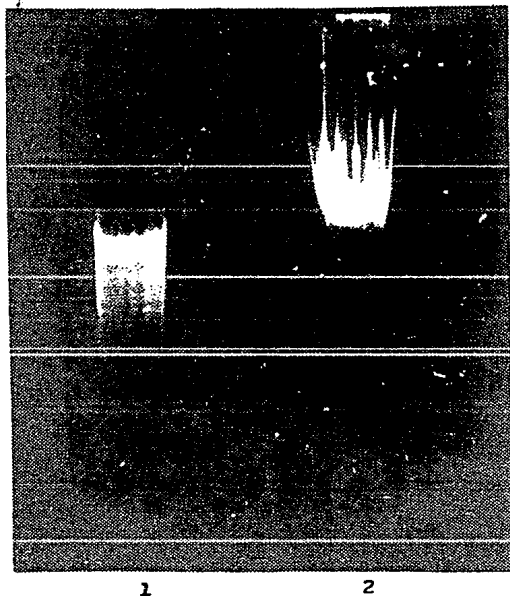


Figura 33.- Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de ADN cromosomal digerido con Pst I, carril 2. El carril 1 muestra el control sin digerir. El método de digestión fue el de Bolivar et al, (1977).

VI CONCLUSIONES

La glucosa isomerasa de B.coagulans NRRL85660 posee las siguientes características catalíticas:

a) pH óptimo de reacción de 8.0, aunque no se pierde más que el 5% de actividad entre pH 7.6 y 9.2. Este óptimo concuerda con lo reportado.

b) La temperatura óptima de reacción es de 60°C y también concuerda con lo reportado. El coeficiente Q₁₀ entre 50 y 60°C es de 0.78, lo que quiere decir que entre estas dos temperaturas, la velocidad aumenta en un factor de 0.78. La energía de activación es de 5,014 cal/mol.

c) La enzima presenta mayor afinidad por fructosa ($K_m=0.14M$), luego por glucosa ($K_m=0.5M$) y finalmente por xilosa ($K_m=1M$). Estas K_m s son aparentes ya que se calcularon a partir de células enteras y no de enzima purificada. Este resultado no se relaciona con los reportados para otros microorganismos ni aún para B.coagulans HN68 (Danno, 1970) ya que la K_m de xilosa es generalmente muy pequeña. La explicación a esto puede ser la falta de optimización de los iones, el haber trabajado con células enteras o bien algún problema en el transporte del carbohidrato a la célula.

d) La enzima es estable a la temperatura entre 35 y 75°C. No se aprecia diferencia entre la curva en la que se usaron cofactores en la reacción y en la que no se usaron, probablemente por haber trabajado con células enteras.

e) La enzima es inducible por xilosa ya que solo se detectó actividad en presencia de este carbohidrato en el medio de cultivo. La máxima activi-

dad isomerizante se presentó entre 6.6 y 66 mM de xilosa, mientras que con mayores concentraciones del carbohidrato se observó una disminución de un 85% de la actividad total. Esto refleja que por arriba de 66 mM, la xilosa de alguna manera afecta negativamente la actividad de la enzima.

En los medios con ambas fuentes de carbono, solo se detectó actividad en el medio con mayor concentración de xilosa que de glucosa. Esto nos indica que la glucosa afecta negativamente la síntesis de la enzima, pero de alguna manera, al haber más xilosa que glucosa, este efecto disminuye.

Los datos anteriores se compararon con las características obtenidas en el laboratorio para B. subtilis 168. Existe una similitud entre la temperatura y pH óptimos, sin embargo, B. subtilis tiene más afinidad por xilosa que por fructosa, mientras que B. coagulans es lo contrario. La afinidad por glucosa es similar. La enzima de B. subtilis pierde actividad al calentarla a 60°C y la de B. coagulans es estable entre 35 y 75°C. Este último dato podría ser importante para distinguir entre la enzima donadora y la receptora, como en el caso de α amilasa.

Se tienen planteadas dos posibles estrategias de clonación del gen en B. subtilis. En la estrategia 1 se va a usar el plásmido pC104 como vehículo, la enzima Hae III o Hind III como enzimas de restricción y la ADN ligasa del fago T4. La cepa receptora que tenemos en este momento no posee las características óptimas para ser usada como cepa receptora por lo que se va a mutagenizar una cepa recién obtenida con fenotipo leu⁻ r⁻ m⁻ recE4 para convertirla en xil⁺. El reconocimiento de las moléculas recombinantes se

hará por complementación en un medio mínimo con xilosa como única fuente de carbono o bien en un medio mínimo que usa purpura de bromocresol como indicador.

La segunda estrategia involucrará el uso del plásmido bifuncional pHV 33, para clonar primero en E.coli y después en B.subtilis. Se pretende cortar el ADN con la enzima Bam HI que corta en el gen de tetraciclina o bien cualquier otra como Pst I o Sal GI. La cepa receptora en E.coli será una cepa bien conocida por su deficiencia en la utilización de xilosa (E.coli RR1). Las moléculas recombinantes en E.coli se extraerán y se usarán para retransformar B.subtilis.

En cuanto a la optimización de las técnicas se ha logrado lo siguiente:

a) Se purificaron los plásmidos pC194 y pSC 194 por el método de Kielburg (1984). El estado de los plásmidos es adecuado. También se purificó pHV33 por el método de Guerry, 1973.

b) Se probaron tres métodos de extracción de ADN. El mejor método resultó ser el método de Rodríguez (1983), con el que se obtuvo cantidad suficiente de ADN para posteriores experimentos, íntegro y libre de contaminantes.

c) Se optimizó el método de células competentes, empleando entre 0.25 y 0.5 ug/ml de ADN y dejándolo 60' en incubación. Para el método de protoplastos se encontraron las siguientes condiciones óptimas:

- Fase de crecimiento: estacionaria.

A diferencia de lo reportado que es fase logarítmica, nosotros solo encontramos transformantes en fase estacionaria.

- Concentración de lisozima: 2 mg/ml.
- Formas del plásmido: no hay diferencia entre usar plásmido pasado por ultracentrífuga o no, esto es monómeros o multímeros.
- Similar número de transformantes se encontró usando el plásmido pC 104 o el pHV 33.

Dado lo laborioso del método de células competentes y debido a que el de protoplastos es dos ordenes de magnitud más eficiente en la producción de transformantes, se decidió que será más adecuado usar este método para posteriores transformaciones.

d) El ADN cromosomal es sensible a una variedad de enzimas de restricción entre las que se encuentran Hae III, Hind III, Pst I y Bam HI entre otras. Los plasmidos pC104 y p6C 104 fueron sensibles a la digestión con Hae III y el plásmido pHV33 fue sensible a Pst I.

Hasta el momento se cuenta con ADN donador, vehículo, métodos óptimos de transformación y extracción de ADN y plasmidos. Lo único que hace falta es el obtener la cepa receptora xii para poder continuar con la clonación.

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aaij,C,P.Borst. The gel electrophoresis of DNA. Biochim.Biophys.Acta 269;192 (1972).
- 2.- Alfano,M.C. Nutrition,sweeteners and dental caries. Food Technol Jan; 76-80 (1980).
- 3.- Antrim, R.L,W.Colilla,B.J.Schnyder. Glucose isomerase production of High fructose syrups.En: Applied Biochemistry and Bioengineering. Enzyme Technology. Academic Press 2;98-150 (1979).
- 4.- Armstrong,K.A,V.Hershfield,D.R.Helinsjy. Gene cloning and containment properties of plasmid ColE1 and its derivatives. Science 196;172 (1972).
- 5.- Azucar,S.A. Estadisticas Azucareras '84. Mexico D.F.
- 6.- Barker,J.A. Pure fructose syrups. Process.Biochem Dec;20-25 (1976).
- 7.- Bingham,A.1980.Plasmid 8;119-125 (1980).
- 8.- Birnboim,H.C,J.Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids.Res 7;1513 (1979).
- 9.- Bolivar,F. Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoR1 sites for selection of EcoR1 generated recombinant DNA molecules. Gene 4;121-136 (1978).
- 10- Bolivar,F,K.Backman. Plasmids of E.coli as cloning vectors. En: Methods in Enzymology. Academic Press 69;245-267 (1979).
- 11.- Bolivar,F,R.Rodriguez,M.Betlach,H.W.Boyer. Construction and characterization of new cloning vehicles Ampicilin resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene 2;75-93 (1977).

- 12.- Bolivar, F.R., Rodriguez, P.J., Greeno, M.C., Betlach, H.L., Heynecker, H.N., Boyer, H. Crosa, S., Falkow. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:85 (1977).
- 13.- Braval, L. *Ingenieria Genetica. Revolucion Biologica. Inf. Cient. Tecn* 4(63):9-14 (1982).
- 14.- Bucke, C. Enzymes in fructose manufacture. En: G. Birch, N. Blakebrough, K. Parker. *Enzymes and food processing. Applied Science Publishers Ltd, Londres; 51-72 (1981).*
- 15.- Bucke, C. Glucose transforming enzymes. En: *Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Publishers Ltd., Londres-Nueva York; 93-129 (1983).*
- 16.- Burke, W.F., J. Spizizen. Isolation, characterization and activation of the Mg dependent endodeoxyribonuclease from B. subtilis. *Biochemistry* 16:403-410 (1977).
- 17.- Canosi, V.G., Morelli, T.A., Trautner. The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some S. aureus plasmids isolated from B. subtilis. *Molec. Gen. Genet* 166:259-267 (1979).
- 18.- Cantwell, B.A., D.J. McConnell. Molecular cloning and expression of a Bacillus subtilis B-glucanase gene in Escherichia coli. *Gene* 23:211-219 (1983).
- 19.- Chang, A.S., Cohen. Genome construction between bacterial species in vitro; replication and expression of Staphylococcus plasmid in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci* 71:1030-1034 (1974).

- 20.- Chang, A.S. Cohen. High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA. Molec.Gen.Genet 169;111-115 (1979).
- 21.- Carrier, D. High expression of cloned gene in E.coli and its consequences. Trends in Biotechnology 1 (14) (1983).
- 22.- Chen, W.P., A.W. Anderson. Purification, immobilization and some properties of glucose isomerase from Streptomyces flavogriseus. Appl. Environ. Microbiol 38(6);1119-1119 (1979).
- 23.- Cohen, S., A. Chang, H.W. Boyer, R. Helling. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci 70(10); 3240-3244 (1973).
- 24.- Contente, S., D. Dubnau. Marker rescue transformation by linear plasmid DNA in Bacillus subtilis. Plasmid 2;555-571 (1979).
- 25.- Cornelis, P., C. Dignaffe, K. Willemot. Cloning and expression of a Bacillus coagulans gene in E.coli. Molec.Gen.Genet 186;507-511 (1982).
- 26.- Dale, J. Application of the principles of microbial genetics to biotechnology. (Ed. Alan Wiseman). Surrey. Univ. Press. USA; 56-75 (1983).
- 27.- Danno, G. Studies on D-glucose isomerizing enzyme from Bacillus coagulans strain HN66. Part IV. Purification, crystallization and some physicochemical properties. Agr. Biol. Chem 34(12);1795-1804 (1970).
- 28.- Danno, G. Studies on D-glucose isomerizing enzyme from Bacillus coagulans strain HN66. Part V. Comparative study on the three activities of D-glucose, D-xylose and D-ribose isomerization of the crystalline enzyme. Agr. Biol. Chem 34(12);1805-1814 (1970).

- 29.- Danno,G. Estudioson D-glucose isomerizing enzyme from Bacillus coagu-
lans strain HNG6. Part VI. The role of metal ions on the isomerizing
of D-glucose and D-xylose by the enzyme. Agr.Biol.Chem 35(7);997-1006
(1971).
- 30.- Dische,Z,E.Borenfreund. A new spectrophotometric method for the de-
tection of keto sugars and trioses. J.Biol.Chem 192,583-587 (1951).
- 31.- Doii,R.H.,1983.En: Rodriguez,R y Tiat,R.C.,1983. Recombinant DNA
Techniques.Addison Wesley;236.
- 32.- Dziezak,J.D. Sweeteners and Product development. Food.Technol. 40(1);
Jan 112-130 (1986).
- 33.- Ehrlich,S.D. DNA cloning in Bacillus subtilis. Proc.Natl.Acad.Sci
75(3);1433-1436 (1978).
- 34.- Ehrlich,S.D. Replication and expression of plasmids from Staphylo-
coccus aureus in Bacillus subtilis. Proc.Natl.Acad.Sci 74;1680-1682
(1977).
- 35.- Espinosa,M,P.Lopez,S.A.Sacks. Transfer and expression of recombinant
plasmid carrying pneumococcal mal genes in Bacillus subtilis. Gene
28;301-310 (1984).
- 36.- Farres,A,L.Paredes,S.Sanchez. Alternativas para la obtencion de sus-
titutos de azucar con elevado poder edulcorante:los jarabes fructo-
sados. Rev.Tecnol.Alimen.Mex 17(5);10-16 (1983).
- 37.- Farres,A,L.Paredes,A.San Martin,S.Sanchez. Clonacion molecular del ge-
ne de glucosa isomerasa. Trabajo presentado en el II Seminario Cubano
sobre Interferon, I Seminario Cubano sobre Biotecnologia, del 2a al 22
de febrero de 1986.

- 38.- Fouet, F., A. Klier, G. Rapoport. Cloning and expression in E.coli of the sucrase gene from Bacillus subtilis. Mol.Gen.Genet 186;399-404 (1982).
- 39.- Ganesan, A.T. Uptake, restriction, modification and recombination of DNA molecules during transformation in E.subtilis. En: Molecular cloning and gene regulation in Bacilli. Academic Press;261-268 (1982).
- 40.- Giovenco, S. Properties of free and immobilized glucose isomerase. FEBS Letters 36(1);Oct (1983).
- 41.- Goeddel, D.V., D.G.Klerd, F.Bolivar, H.L.Heynecker, D.G.Yansura, R.Crea, T.Hirose, A.Kraszewski, K.Itakura, A.D.Riggs. Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for human insulin. Proc.Natl. Acad.Sci 76;106-110 (1979).
- 42.- Gong, C., L.Chen, G.T.Tsao. Purification and properties of glucose isomerase of Actinoplanes missouriensis. Biotechnol.Bioeng 22;833-845 (1980).
- 43.- Gray, G., G.Selzer, G.Buell, P.Shaw, S.Escanez, S.Hofer, P.Voegli, C.T.Thompson. Synthesis of bovine growth hormone by Streptomyces lividans. Gene 32:21-30 (1984).
- 44.- Gryczan, T.J., S.Contente, D.Dubnau. Molecular cloning of heterologous chromosomal DNA by recombination between a plasmid vector and homologous resident plasmid in Bacillus subtilis. MolecGen.Genet 177;459-467 (1980).
- 45.- Gryczan, T.J., A.G.Shivakumar, D.Dubnau. Characterization of chimaeric plasmid cloning vehicles in Bacillus subtilis. J.Bacteriol 141;246-253 (1980).

- 46.- Guery, P. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol* 116;1064-1066 (1973).
- 47.- Hopwood, D. A. M. Bibbs, C. Bruton, K. I. Chater, J. S. Feitelson, J. A. Gil. Cloning Streptomyces genes from antibiotic production. *Trends in Biotechnology* 1(2);42-48 (1983).
- 48.- Horinouchi, S. B. Weisblum. Nucleotide sequence and functional map of pC194 inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol* 150(2); 815-825 (1982).
- 49.- Huitron, C. Limon-Lason, J. Immobilization of glucose isomerase to ion exchange materials. *Biotechnol. Bioeng* 20;1377-1391 (1978).
- 50.- Inglett, E. G. Sweeteners, a review. *Food Technol* Marzo;37-41 (1981).
- 51.- Iordanescu, S. Recombinant plasmid obtained from two different compatible staphylococcal plasmid. *J. Bacteriol* 124;597-601 (1975).
- 52.- Itakura, K. T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, F. Bolivar, H. L. Heynecker, H. W. Boyer. Expressions in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198;1056-1063 (1977).
- 53.- Jacob, F. J. Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol* 3;319 (1961).
- 54.- Joyet, P. M. Guerineau, H. Heslot. Cloning of a thermostable α amylase from Bacillus licheniformis and its expression in Escherichia coli and Bacillus subtilis. *FEMS Microbiology Letters* 21;353-359 (1984).
- 55.- Katz, E. C. J. Thompson, D. A. Hopwood. Cloning and expression of the tyrosinase gene from Streptomyces antibioticus in Streptomyces lividans. *J. Gen. Microbiol* 129;2703-2714 (1983).

- 56.- Keggins, K.M, P.S. Lovett, E.J. Duvall. Molecular cloning of genetically active fragments of Bacillus DNA in Bacillus subtilis, and properties of the vector plasmid PUB110. Proc.Natl.Acad.Sci 75:1423-1427 (1978).
- 57.- Kiesselburg, M.M. Weickert, P. Vary. Analysis of resident and transformant plasmids in B. megaterium. Biotechnology 2(3);254-259 (1984).
- 58.- Kreft, J. K. Bernhard, W. Goebel. Recombinant plasmids capable of replication in Bacillus subtilis and E.coli. Mol.Gen.Genet 162;59-67 (1978).
- 59.- Lathe, R.F. J.P. LeCocq, R. Everett. DNA engineering: the use of enzymes, chemicals and oligonucleotides to restructure DNA sequences in vitro. Ed. Williamson, R. Ed. Genetic Engineering 4. Academic Press. 1-51 (1983).
- 60.- Lawlis, V.B, M.S. Dennis, Y. Chen, C.S. Gong. Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose kinase genes of Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol Jan; 15-21 (1984).
- 61.- Le Hegarat, J.C, C. Anagnostopoulos. Detection and characterization of naturally occurring plasmids in Bacillus subtilis. Mol.Gen.Genet 157; 167-174 (1977).
- 62.- Lewin, B. (1965). Genes II. Second Edition. John Wiley and Sons. New York. 557-596 pp.
- 63.- Lofdall, S, J. Sjosfrom, L. Philipson. A vector for recombinant DNA in Staphylococcus aureus. Gene 3; 161-172 (1978).
- 64.- Lovett, P.S, K.M. Keggins. Bacillus subtilis as a host for molecular cloning. Methods in Enzymology. Academic Press 66; 342-357 (1979).

- 65.- Lowry,O.H,N.J.Rosenbrough,A.L.Farr,R.J.Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem* 193;265-275 (1951).
- 66.- Maleszka,R,P.Y.Wang,H.Schneider. A Col E1 hybrid containing D-xylose negative mutants of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Can. J.Biochem* 60;144-151 (1982).
- 67.- Mandel,M,A.Higa. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol* 159-162 (1970).
- 68.- Maniatis,T,E.F.Fritsch,J.Sambrook.(1982) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor.1-521pp.
- 69.- Mercerau-Pujalano,A.Royal,B.Cami,A.Garapin,A.Krust,F.Gannon,P.Kourilsky. Synthesis of an ovalbumin-like protein by Escherichia coli K12 harbouring a recombinant plasmid. *Nature,London* 275;505-510 (1978).
- 70.- Miller,B.M,W.Litsky.(1976). *Industrial Microbiology*. McGraw Hill, Nueva York,357 pp.
- 71.- Mortlock,R.P,W.A.Wood. Metabolism of pentose and pentiols by *Aerobacter aerogenes*. *J.Bacteriol* 68;838-849 (1964).
- 72.- Morrow,J,F,S.N.Cohen,A.Chang,H.W.Boyer,H.M.Goodman,R.B.Helling. Replication and transcription of eucaryotic DNA in Escherichia coli. *Proc.Natl.Acad.Sci* 71;1743-1747 (1974).
- 73.- Newsweek. The perils of a sweet tooth. August 26;42-49 (1985).
- 74.- Novedades. Marzo 26 (1985).
- 75.- Oishi,M,S.D.Cosloy. The genetic and biochemical basis of the transformability of E.coli K12. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 49;1568-1572 (1979).

- 76.- Old, R.W., S.B. Primrose. (1981). Principles of gene manipulation. Second Edition. University of California Press. Los Angeles. 1-103 pp.
- 77.- Orzech, K., W.F. Burke, Jr. Cloning of the Bacillus subtilis sulfanilamide resistance gene in Bacillus subtilis. J. Bacteriol Jan 391-394 (1982).
- 78.- Ostroff, G.R., J.J. Pene. Molecular cloning with bifunctional plasmid vectors in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet 193;299-305 (1984).
- 79.- Palva, I. Molecular cloning of amylase gene from Bacillus amyloliquefaciens and its expression in Bacillus subtilis. Gene 19;81-87 (1982).
- 80.- Palva, I. Secretion of interferon in Bacillus subtilis. Gene 22;229-238 (1983).
- 81.- Quintero, R. Biotecnología. En: La Biología Contemporánea. Las ciencias del siglo XX. Cap 10. UNAM. Mexico. 207-222 pp (1983).
- 82.- Rapoport, G., A. Klier, A. Billaut, F. Fargette, R. Dedonder. Construction of a colony bank of E. coli containing hybrid plasmids representative of the Bacillus subtilis 16f genome. Mol. Gen. Genet 176;239-245 (1979).
- 83.- Rodriguez, R.L., R.C. Tait. (1983). Recombinant DNA techniques, an introduction. Addison Wesley Publ. Comp. London; 236pp.
- 84.- Rose, A.H. Microbial enzymes and bioconversions. Economic Microbiology 5. Academic Press, London; 195-204 (1980).
- 85.- Sanchez, S., K.L. Smiley. Properties of D-xylose isomerase from Streptomyces albus. Appl. Microbiol June; 745-750 (1975).
- 86.- Sandhu, I.S. Molecular cloning of Bacillus polymyxa (1-4)B-D-xylanase gene in Escherichia coli. Enzyme Microb. Technol 6 June; 271-274 (1984).

- 87.- Scriban,R.(1984). Biotecnologia. Ed.El Manual Moderno. Mexico D.F. 282-298 pp.
- 88.- Segel,H.I.(1976).Biochemical Calculations.Second edition.John Wiley and sons.New York.435pp.
- 89.- Sgaramella,V,J.H.Van de Sande,H.G.Khorana.Proc.Natl.Acad.Sci 67;1468-1475 (1970).
- 90.- Shine,J,I.Fettes,N.C.Lan,J.L.Roberts. Expression of cloned B-endorphin gene sequence by Escherichia coli. Nature,London 285;456-461 (1980).
- 91.- Struhl,K,D.F.Stinchcomb,S.Scherer,R.W.Davis. High frequency transformation of yeast;autonomous replication of hybrid DNA molecules.Proc. Natl.Acad.Sci 76;1035-1039 (1979).
- 92.- Suarez,J.E,K.F.Chater. DNA cloning in Streptomyces.A bifunctional replicon comprising PBR322 inserted into a Streptomyces phage. Nature, London 286;527-529 (1980).
- 93.- Suekane,M,M.Tamura,C.Tomimura. Physico-chemical and enzymatic properties of purified glucose isomerase from Streptomyces olivochromogenes and Bacillus stearothermophilus. Agr.Biol.Chem 42(5);909-917 (1978).
- 94.- Tsukagoshi,N,H.Ihara,H.Yamagata. Cloning and expression of a thermophilic α amylase gene from Bacillus stearothermophilus in E.coli. Mol. Gen.Genet 193;58-63 (1984).
- 95.- Tsumura,N,T.Sato.Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Part VI. Properties from the enzyme from: Streptomyces phaeochromogenus.Agr.Biol.Chem 29(12);1129-1134 (1965).

- 96.- Ueng,P.P. Molecular cloning of the Escherichia coli gene encoding xylose isomerase. Biotechnology Letters 7(3);153-158 (1985).
- 97 .- Uhlen,M,J.Flock,L.Philipson. Rec Independent deletions of recombinant plasmids in Bacillus subtilis. Plasmid 5;161-169 (1981).
- 98 .- Valenzuela,M,M.F.Aquinaga.Formation of DNA fragments containing replicating growing forks from both E.coli and B.subtilis. Molec.Gen. Genet 181;241-247 (1981).
- 99.- Venema,G. Bacterial Transformation. Adv.Microb.Physiol 28;245-311 (1979).
- 100.- Vepdal,S.M. Recombinant DNA Technology. Advances in Applied Microbiology. Academic Press 27;1-67 (1981).
- 101.- Verbanic,C. Sugar is sweet, but it is not enough. Chemical.Business Jan;29-31 (1986).
- 102.- Voss,W,G.Venema. Fate of plasmid DNA in competent cells and protoplasts of B.subtilis. En: Molecular cloning and gene replication in Bacilli. Academic Press;211-221 (1982).
- 103.- Wiseman,A. Application of the principles of enzymology to biotechnology. En: Principles of Biotechnology.(Ed.A.Wiseman).Surrey Univ. Press. USA;144-151 (1983).
- 104.- Yamanaka,K. D-xylose of L.brevis. Biochim.Biophys.Acta 151;670-680 (1968).
- 105.- Yamazaki,H. α amylase genes (amyR2 and amyE+) from an α amylase hyper producing nucleotide sequences. J.Bacteriol Oct;327-337 (1983).
- 106.- Yoshimura,S,G.Danno,M.Natake. Studies on D-glucose isomerizing acti-

vity of D-xylose grown cells from Bacillus coagulans, strain HN68. Part I Description of the strain and conditions for formation of the activity. Agr.Biol.Chem 30(10);1015-1023 (1966).

107.- Young, F.E. Impact of cloning in Bacillus subtilis on fundamental and industrial microbiology. J.Gen.Microbiol 19;1-15 (1980).