



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
Instituto de Investigaciones Biomédicas

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE H.
UNIDAD ACADÉMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO / CCH
U N A M

"OBTENCION DE UNA CEPA PRODUCTORA
DE GLUCOSA ISOMERASA POR RECOMBINA-
CION DE ACIDOS NUCLEICOS EN *Bacillus*
subtilis"

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

Amelia María Guadalupe Farres González Sarabia



México, D. F.

1987



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 esta 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.

El presente trabajo fue realizado en el
Departamento de Biotecnología
del Instituto de
Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

Los trabajos relativos a la caracterización de la enzima de E. coagulans fueron hechos por la Biól. Ana San Martín. Los de E. coli por Emma Estrada:

La Q.F.B. Leticia Paredes colaboró en diferentes etapas del trabajo.

Agradezco también a la Biól. Laura Escalante su ayuda técnica.

La consecución de una meta requiere de la ayuda de muchas personas. He sido muy afortunada en todo este trayecto al contar con

Mis padres, quienes han sido un modelo a seguir y de quienes he recibido cariño y estímulos.

El Dr. Sergio Sánchez, de quien he recibido ejemplo y valiosa asesoría

El Ing. Francisco Ferrer, quien me ha dado apoyo y paciencia

Mis hermanos, mis amigos y compañeros de laboratorio, quienes han participado en mi formación en diversas formas.

Por todo,

G R A C I A S

CONTENIDO

Indice de tablas	ii
Indice de figuras	ii
Abreviaturas	iv
Resumen	1
Introducción	4
I. Glucosa isomerasa	5
II. Comparación de los sistemas de clonación molecular en <u>E. coli</u> y <u>B. subtilis</u>	12
A. Vehículos moleculares	14
B. Sistemas de transformación	18
C. Sistemas de transcripción, traducción y regulación	28
D. Cepas receptoras	25
E. Problemas de clonación intra e interespecífica	28
III. Planteamiento de la estrategia	29
Objetivos	34
Material y Métodos	37
Resultados	47
I. Caracterización de la actividad enzimática de <u>B. subtilis</u>	
II. Caracterización de la actividad enzimática en <u>E. coli</u>	56
III. Determinación del método de extracción del ADN en <u>B. subtilis</u>	60
IV. Transformación de <u>E. coli</u> RR1	61
V. Caracterización de la cepa recombinante derivada de <u>E. coli</u> RR1	65
VI. Transformación de <u>B. subtilis</u> IA 422	70
Conclusiones	76
Apéndice I: Tablas	84
Apéndice II: Figuras	98
Bibliografía	138

INDICE DE TABLAS

1. Usos y propiedades de jarabes fructosados y otros edulcorantes.
2. Microorganismos productores de glucosa isomerasa
3. Propiedades de algunas isomerasas provenientes de diversos microorganismos.
4. Plásmidos de B. subtilis
5. Plásmidos de E. coli
6. Diferentes proteínas clonadas en B. subtilis
7. Diferentes proteínas clonadas en E. coli
8. Propiedades de glucosa isomerasa de especies consideradas en este trabajo
9. Efecto de diferentes concentraciones de xilosa y glucosa en la producción de glucosa isomerasa por B. subtilis 168
10. Aspecto de cepas de B. subtilis en diferentes medios con indicador y con xilosa como fuente de carbono.

INDICE DE FIGURAS

1. Diagrama de conversiones de glucosa a fructosa
2. Diagrama de elaboración de los jarabes fructosados
3. Metabolismo de pentosas y pentitoles
4. Operón de isomerasa en E. coli
5. Estrategia general de este trabajo
6. Plásmido pHV 33
7. Secuencias consenso de promotores reportados
8. Pared celular de un microorganismo Gram⁺

9. Pared celular de un microorganismo Gram⁺
10. Modelo y ejemplo de secuencia peptídica líder para la excreción de proteínas
11. Crecimiento y actividad isomerizante de B. subtilis 168
12. Actividad isomerizante de tres cepas de B. subtilis
13. Curva de progreso de la reacción de isomerización catalizada por células rotas y enteras de B. subtilis
14. Actividad isomerizante a diferentes temperaturas
15. Actividad isomerizante a diferentes pH
16. Actividad isomerizante comparada entre B. subtilis y B. coagulans, tras incubarse a diferentes temperaturas
17. Actividad isomerizante hacia diferentes concentraciones de glucosa
18. Actividad isomerizante hacia diferentes concentraciones de fructosa
19. Linearizaciones de Lineweaver-Burke para determinar afinidad hacia diversos carbohidratos
20. Patrón de activación por diferentes iones
21. Determinación de la constante de afinidad hacia cobalto
22. Curva de crecimiento en medio mínimo M9 de dos cepas de E. coli
23. Actividad isomerizante de dos cepas de E. coli
24. Incorporación de xilosa marcada por dos cepas de E. coli
25. ADN cromosomal de B. subtilis sometido a la acción de diversas enzimas de restricción
26. ADN cromosomal y pHV digeridos con la enzima Bam HI
27. Fenotipo de la cepa recombinante
28. Actividad isomerizante relativa de la cepa receptora y la recom

binante obtenida en E. coli

iv

29. Curva de crecimiento en medio mínimo M9 de las cepas receptora, recombinante, y receptora transformada con el plásmido recombinante
30. Actividad isomerizante a 50 °C y a 60 °C de dos cepas de E. coli.
31. Actividad isomerizante relativa ante la presencia de ampicilina en el medio de cultivo
32. Efecto del tiempo de incubación sobre el rendimiento de células transformantes
33. Efecto de la concentración de ADN sobre el rendimiento de células transformantes
34. Demostración de la presencia de la mutación recE4 en B. subtilis IA 422
35. Actividad proteolítica de B. subtilis 168 y B. subtilis IA 422
36. Actividad isomerizante de las cepas donadora, receptora y recombinante de B. subtilis.

ABREVIATURAS

Antibióticos

Ap	Ampicilina
Cm	Cloranfenicol
Tc	Tetraciclina
Km	Kanamicina
Sm	Estreptomina
Em	Eritromicina

Acidos Nucleicos

ADN	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico

Unidades de medición

Md	megadaltones	µg	microgramos
v	volumen	mg	miligramos
h	horas	g	gramos
min	minutos	µl	microlitros
rpm	revoluciones por minuto	ml	mililitros
K	constante de Michaelis	l	litros
M	molar	pb	pares de bases
n moles	nanomoles	Kb	kilobases

RESUMEN

La glucosa isomerasa es una enzima de interés industrial, tanto en el campo de producción de edulcorantes como en el de elaboración de etanol a partir de desechos agroindustriales. Los principales microorganismos productores de la enzima son bacterias Gram⁺ en las que los sistemas de recombinación in vitro han tenido un desarrollo más lento que en E. coli. El género Bacillus presenta múltiples ventajas como sistema de clonación, por lo que se intenta introducir la información que codifica para esta enzima a este género.

Inicialmente, se buscó actividad en diversas cepas de B. subtilis usadas comúnmente como receptoras de información heteróloga. En seguida se procedió a caracterizar la actividad mostrada por la cepa B. subtilis 168, al ser ésta la que presentó mayor actividad. El análisis de la misma fue practicado en forma comparada con la de la cepa B. coagulans NRRL B 5660, usada normalmente en la producción industrial de la enzima. Las características cinéticas de la enzima proveniente de B. subtilis indicaron un pH óptimo de 7.6, una temperatura óptima de 60 °C, y los valores de K_m para D-xilosa, D-fructosa y D-glucosa fueron 0.21, 0.78 y 1.04 M, respectivamente. La adición de Mg^{2+} junto con Co^{2+} incrementó significativamente el nivel de actividad. La termoestabilidad de la enzima fue baja en ausencia del sustrato, pero se elevó en presencia

de Co^{2+} 10 mM. El valor de K_m hacia este ión fue de 2.38 mM. Estas propiedades fueron consideradas adecuadas como fuente de información para clonarse.

Posteriormente, el ADN proveniente de esta cepa fue introducido, mediante clonación tipo "tiro de escopeta", en E. coli RR1, utilizando como vehículo molecular el plásmido bifuncional pHV 33. Se logró aislar así una cepa recombinante que presenta no sólo la capacidad de crecer en xilosa como única fuente de carbono, sino que presenta un nivel de actividad isomerizante superior en 4 veces al basal presentado por la cepa receptora y alcanza un nivel similar al de una cepa productora de E. coli.

Finalmente, el plásmido recombinante se aisló de esta cepa y se introdujo en B. subtilis IA 422, deficiente en actividad isomerizante. En este caso se logra incrementar 4 veces la actividad basal de la cepa receptora, pero los niveles son similares a los de la cepa donadora. Lo anterior permite ver que en este caso un solo paso de clonación es insuficiente para lograr obtener una cepa hiperproductora de la enzima, pero quedan sentadas las bases para la obtención de la misma y se abre la posibilidad de obtener una cepa secretora de glucosa isomerasa en B. subtilis.

INTRODUCCION

I. GLUCOSA ISOMERASA

En este trabajo se pretende usar como modelo una enzima de interés industrial, para lo que se ha seleccionado a la glucosa isomerasa (D-xilosa cetol isomerasa 5.3.1.5). Se pretende aislarla de un microorganismo perteneciente al género Bacillus e introducirla a una cepa receptora adecuada de B. subtilis, para así sentar las bases para futuras manipulaciones que conduzcan a la obtención de cepas hiperproductoras y secretoras. En una etapa inicial, la información se introducirá en E. coli.

El interés hacia esta enzima se inició en el año de 1957, en que se descubrió en (Pseudomonas hydrophyla una actividad enzimática capaz de transformar aldosas en cetosas, siempre y cuando estuviesen fosforiladas (Marshall y Kooi, 1957). La enzima cataliza la conversión reversible de aldosas a cetosas, con una constante de equilibrio cercana a 1.0 a 60 °C (Coker y Venkatasubramanian, 1985), aunque la velocidad de reacción es lenta en este punto (Fig. 1). Pronto se vio que una enzima así podría ser utilizada en la conversión de glucosa a fructosa y participar por ello en la producción de sustitutos de sacarosa, ya que es posible obtener mezclas casi equimoleculares de fructosa y glucosa. Así, a los pocos años era factible la elaboración de jarabes ricos en fructosa provenientes de la hidrólisis enzimática del almidón, tal como se muestra en la figura 2. Los usos de estos jarabes fueron pronto

extendidos, compitiendo con los numerosos sustitutos de sacarosa que han entrado al mercado y que se ejemplifican en la tabla 1. El proceso tardó casi quince años en entrar al mercado ya que hubo que sortear varios obstáculos. La enzima descubierta inicialmente no era la más adecuada para el proceso debido a su necesidad de sustrato fosforilado. Por lo tanto, hubo de emprenderse una búsqueda entre numerosos microorganismos para encontrar alguna que no los requiriese. Lactobacillus fue el primer organismo descubierto con estas cualidades (Hamilton, 1974).

Los organismos pertenecientes al género Streptomyces pasaron en seguida a ocupar el liderazgo en cuanto a uso, dadas las propiedades de sus enzimas. Entre ellas, destaca el no requerir arsénico como cofactor. Además, estos microorganismos han sido ampliamente utilizados en la industria como fuente de numerosos metabolitos; fisiológica y genéticamente son también bastante conocidos, si bien el grado de avance no es tan impresionante como en E. coli. La producción de glucosa isomerasa en estos microorganismos presenta los mismos inconvenientes que se manifiestan en la producción de otros metabolitos a partir de este género, esto es, la productividad es baja debido al crecimiento lento, el que a su vez incrementa los riesgos de contaminación. Los organismos del género Bacillus ofrecen muchas ventajas, incluyendo la presencia de espe-

cies termofilicas. En la actualidad se conocen casi siete decenas de microorganismos productores, que se muestran en la tabla 2, lo que permite seleccionar una gran variedad de opciones. La búsqueda de nuevos microorganismos ha conducido al encuentro de algunos que presentan mayor afinidad por glucosa, como Actinoplanes missouriensis (Gong, 1980), que además presenta un menor requerimiento por cobalto. También se han seleccionado otros, como B. coagulans, que presentan mayor termoestabilidad (Chen, 1980).

En el transcurso de los años ha sido posible caracterizar algunas de las enzimas de mayor interés. Según su origen, pueden encontrarse diferencias en diversos parámetros, como son: afinidad por el sustrato, requerimientos de iones metálicos para la manifestación de la actividad, temperatura y pH óptimos, además de variaciones en número de subunidades idénticas y pesos moleculares. Algunos ejemplos se ilustran en la tabla 3. Una característica común a todas es la necesidad de xilosa como inductor de la actividad. De hecho, la enzima permite a la célula utilizar este carbohidrato como fuente de carbono y forma parte de un conjunto de enzimas que incluyen, además, a una permeasa y una cinasa (David y Weismeyer, 1970) y permiten su incorporación a la vía de las pentosas (Mortlock y Wood, 1964), en un mecanismo común a varios microorganismos (Fig. 3).

El requerimiento de este inductor es un fenómeno que encarece el proceso de producción de la enzima debido a su alto costo, por lo que se han hecho diversos esfuerzos por optimizarlo. Si bien pueden emplearse tanto manipulaciones genéticas como ambientales para lograr el objetivo, el caso de glucosa isomerasa es un buen ejemplo para ilustrar la importancia tanto de los propios microorganismos como de la genética tradicional en la resolución de problemas que presenta la producción de enzimas. Entre ellos destacan la obtención de mutantes constitutivas e insensibles a represión catabólica (Sánchez y Quinto, 1975) y la de cepas capaces de utilizar los xilanos u otros substratos baratos, como el olote de maíz, como fuente de inductor (Takasaki, 1969, Park y Nakamura, 1974 y Chen, 1979). Asimismo, se han obtenido cepas hiperproductoras (Vaheri y Kauppinen, 1977 y Demnerova, 1977) y cepas capaces de excretar cierta cantidad de enzima al medio de cultivo para facilitar el proceso de recuperación (Hzuka, 1971), aunque la mayoría de los productores actuales inmovilizan células completas.

Las técnicas de recombinación in vitro de ácidos nucleicos permitirían lograr mejoras sustanciales tanto en aquellas características que implican cambios en la estructura de la molécula, como en los fenómenos que conducirán a la elevación de la productividad de la enzima. Estas técnicas permiten la manipulación de la ma

quinaria de la célula hasta lograr la saturación con el producto de interés, partiendo del principio de que un incremento en la dosis génica conduce a una síntesis más activa de proteínas (Uhlen y Nordstrum, 1979). Se cuenta con ejemplos de sobreproducción tanto de proteínas de interés básico, entre las que están las involucradas en el operón de arabinosa (Steffen y Schleif, 1977), como de proteínas de interés para la industria, alfa amilasa entre ellas (Cornelis, 1982).

Las técnicas de recombinación in vitro no han sido aplicadas hasta ahora al mejoramiento de la producción de glucosa isomerasa con fines de producción de edulcorantes y con interés comercial. La xilosa isomerasa de E. coli ha sido clonada y secuenciada, pero el objetivo final de los primeros trabajos era el conocimiento de la organización genómica. Posteriormente, estos resultados fueron aprovechados para conseguir la introducción del gene a levaduras, como Schizosaccharomyces pombe, con el fin de lograr una cepa capaz de degradar desechos lignocelulósicos en forma eficiente (Gong, 1981, Jeffries, 1984 y Alexander, 1986).

Los resultados obtenidos hasta ahora han permitido saber que tanto en E. coli como en Salmonella typhimurium la información está codificada en un operón, que incluye al gene estructural xylA, al

de una permeasa (xylT), al de una cinasa (xylB) y a un gene regulador (xylR) (Maleszka, 1982, Ho, 1983 y Lawliss, 1984) (Fig. 4). La regulación parece ser coordinada, ya que mutantes afectadas en la producción de una de las enzimas suelen estarlo en la de otras. En el modelo del operón propuesto hay discrepancias en cuanto al número de promotores funcionales, pues algunos autores afirman que existen dos, uno para el gene estructural y otro para el de cinasa (Ho, 1983 y Lawliss, 1984) mientras que otros afirman que xyl B se transcribe desde xyl A (Rosenfeld, 1984). Lo que es cierto es que es difícil separar los dos genes (Ho, 1983). Se ha logrado determinar que el de la isomerasa tiene una longitud entre 1002-1320 pb (Ueng, 1985) y que el peso molecular de la enzima de E. coli es de 54000 daltones (Lawliss, 1984).

En organismos como Bacillus y Streptomyces no están reportados los operones típicos de E. coli; sin embargo, una secuencia de ADN de B. subtilis ha sido clonada en E. coli y complementa tanto la función de xilosa isomerasa como la de xilulosa cinasa, lo que permite suponer que la organización genética es similar (Wilhelm y Hollenberg, 1984), así como el mecanismo de asimilación de pentosas y pentitoles.

Por otra parte, si bien no se han empleado las técnicas de recombinación con fines de sobreproducir enzima con fines comerciales, los autores que han trabajado con el gene aislado de E. coli han logrado incrementar 20 veces la producción de la enzima fusionando el gene aislado en las etapas iniciales del trabajo a promotores eficientes, tipo "lac" en E. coli (Stavis y Ho, 1985). La utilidad de esta cepa en la producción de edulcorantes es baja, puesto que la enzima de E. coli presenta baja afinidad por glucosa (Wovcha, 1983). Es por ello que resulta importante la clonación de glucosa isomerasa proveniente de los microorganismos actualmente empleados en la producción de edulcorantes, en su mayoría bacterias Gram⁺, lograr su expresión en los propios microorganismos Gram⁺ (Workman, 1986).

Una ventaja que representaría el aislamiento del gene de interés sería el que abriría la posibilidad de mutagénesis in vitro y así buscar cambios que conduzcan a modificar termoestabilidad o afinidad por el sustrato, una vez conocidos los factores que afectan estos parámetros, pues hasta ahora es poco lo que se sabe (Mozhaev y Martinek, 1984). La genética tradicional ha tenido pocos éxitos en este sentido; un ejemplo es la modificación de afinidad por el sustrato en el caso de la enzima de A. aerogenes, pero ésta carece de valor comercial (Oliver y Mortlock, 1971). Los pocos avances se

podrían deber al hecho de que es difícil encontrar métodos de selección que permitan identificar este tipo de mutantes (Imanaka, 1983). La recombinación in vitro permitirá aislar, secuenciar genes e identificar más fácilmente los puntos críticos a modificar; sin embargo, cuestiones económicas y regulatorias definirán la factibilidad de la aplicación (Fitcher, 1986).

II. COMPARACION DE LOS SISTEMAS DE CLONACION MOLECULAR EN E. COLI Y B. SUBTILIS.

La metodología de recombinación de ácidos nucleicos in vitro se ha desarrollado en los últimos quince años. El sistema más conocido y para el que existe una mayor cantidad de elementos es E. coli. Fue el primero que se empleó, ya que en otros terrenos de la biología molecular es también el microorganismo mejor conocido. Sistemas como Streptomyces y Bacillus, de gran interés para la industria, están en menor grado de desarrollo. B. subtilis es el organismo mejor conocido genéticamente después de E. coli, a pesar de lo cual sólo se han localizado en su mapa alrededor de 400 genes, contra más de 1000 en E. coli (Workman, 1986). El panorama es aún más desalentador para Streptomyces, pues aún la especie mejor conocida, S. coelicolor, no presenta un número tan elevado de genes

localizados (Hopwood, 1984). Se tienen aislados fragmentos que poseen actividad promotora (Bibb y Cohen, 1982), pero las secuencias y detalles del mecanismo de transcripción se han esclarecido más recientemente (Fayerman, 1986). Se presentan también problemas de expresión de secuencias heterólogas (Robbins, 1981 y Rodgers, 1982), que se han explicado hasta ahora por el alto contenido de guaninas y citosinas en el genoma de estos microorganismos. Lo anterior indica que sólo para B. subtilis existen los elementos suficientes como para pensar en la producción a gran escala de proteínas recombinantes.

La estrategia seguida para una recombinación in vitro es la misma, independientemente del tipo de sistema biológico que se desee utilizar como hospedero, y puede verse en la figura 5, que corresponde a la de este trabajo. En esencia, debe contarse con un procedimiento de obtención de información de interés, lo que implica ya sea el aislamiento del ADN o su síntesis, químicamente o por transcripción reversa. En seguida, éste se corta para poder ser unido a un vehículo molecular y la molécula recombinante formada es introducida por una técnica de transformación de la cepa receptora adecuada. Debe contarse con un método de selección de la colonia deseada, y éste dependerá de que se exprese el mensaje o de que sólo se pretenda detectar la presencia de ADN heterólogo. Po-

dria ocurrir también que la información genética sólo se exprese a nivel de transcripción, por lo que se habrá de contar con un método de detección de RNA específico. Aún si se da el caso de que la información sea traducida, la proteína de interés puede haber sufrido modificaciones que impidan la detección de su actividad, por lo que el producto debe ser caracterizado.

Las diferencias entre los organismos considerados en este momento, E. coli y B. subtilis, son mayores en lo que se refiere a vehículos moleculares y a sistemas de transformación, tal como se explica más adelante. Por otra parte, el número de cepas adecuadas como receptoras para información genética heteróloga es mucho menor en B. subtilis que en E. coli. Quizás esto pueda explicarse por el conocimiento desigual en torno a la biología molecular para ambos géneros. A continuación se analizarán algunas de las diferencias conocidas hasta ahora.

II. A. Vehículos moleculares.

Con este término se quiere denotar a moléculas capaces de entrar a la célula e insertarse en el genoma o mantenerse en forma autónoma, preferentemente como moléculas capaces de replicarse independientemente del cromosoma denominadas replicones. Estas moléculas

pueden ser cortadas y aceptar como "pasajero" ADN proveniente de otra fuente, es decir, heterólogo. La información, a su vez, se expresará o no dependiendo de la compatibilidad de señales regulatorias que contenga la maquinaria de transcripción y traducción de la cepa receptora.

Una característica fundamental que debe poseer todo vector para quien pretende introducir información heteróloga a una célula es contener una señal que indique su presencia. Esta puede ser, por ejemplo, la formación de una placa de lisis, el conferir resistencia a algún metabolito (antibiótico, toxina, metal) o proporcionar la capacidad de crecimiento en algún sustrato (Malik, 1980 y Rodríguez y Tait, 1983). Los vehículos, a su vez, pueden ser de varios tipos: fagos, plásmidos, cósmidos y, para el caso de eucariotes, organelos. Tanto en E. coli como en B. subtilis existen los tres primeros tipos. En general, para E. coli se encuentra un gran número tanto de virus como de plásmidos; en el caso de B. subtilis es especialmente notable la limitación en cuanto a fagos (Young, 1980 y Workman, 1986). La selección del tipo de vehículo dependerá de varios factores; entre ellos pueden citarse la capacidad de carga de información, la disponibilidad de cepas receptoras con marcadores adecuados, las posibilidades de corte con enzimas de restricción. Los virus permiten la clonación de fragmentos

más grandes, pues hay que recordar que algunos de ellos pueden prescindir de un 30% de su genoma, que puede ser sustituido por ADN heterólogo; sin embargo, los vehículos virales en uso están diseñados para trabajar con un máximo de dos o tres enzimas de restricción. Con los plásmidos, en cambio, pueden usarse varias enzimas, lo que da mayor versatilidad al sistema. Por otra parte, dado su tamaño pequeño, es más fácil su manejo, mapeo y regulación (Morrow, 1980).

En el caso de B. subtilis uno de los principales problemas encontrados para el desarrollo de los sistemas de clonación fue la carencia de plásmidos naturales que poseyeran las características previamente señaladas como importantes (Doi, 1986). A pesar de que el microorganismo contiene muchos plásmidos, éstos son de naturaleza críptica, esto es, no contienen propiedades identificables (Le Hegarat, 1977 y Yoshimura, 1983). Sin embargo, Ehrlich demostró que una serie de plásmidos descritos previamente para S. aureus (Iordanescu, 1975) eran capaces de transformar a B. subtilis (Ehrlich, 1977).

Los plásmidos de B. subtilis, como en su momento los de E. coli, han debido ser mejorados en cuanto a lograr combinaciones de diversos marcadores, sitios únicos para diferentes enzimas de res-

tricción, estabilidad, etc. (Keggins, 1978). Un tipo de plásmido que ha resultado ser de gran utilidad lo representan los plásmidos híbridos capaces de replicarse tanto en E. coli como en B. subtilis, pues contienen orígenes de replicación de ambos géneros. Un ejemplo interesante lo constituye el plásmido denominado pHV 33, descrito por Rapoport en 1979 e ilustrado en la figura 6. Este se construyó aprovechando el sitio único de Hind III existente tanto en el pC 194 (Cm^r) proveniente de S. aureus, y el sitio único para la misma enzima encontrado en el pBR 322 ($Ap^r Tc^r$), utilizado en E. coli (Bolívar, 1977). De esta manera se logró formar una molécula capaz de transformar a ambos géneros; sin embargo, la expresión de la información es desigual: E. coli es capaz de manifestar la resistencia a los tres antibióticos que contiene el plásmido híbrido, mientras que B. subtilis sólo expresa la información proveniente del pC 194.

En el ejemplo detallado anteriormente, el gene que confiere resistencia a cloranfenicol no puede ser inactivado insercionalmente, ya que no presenta sitios únicos para ninguna enzima de restricción. Se han construido plásmidos con más marcadores propios de B. subtilis, de manera que alguno de ellos pueda inactivarse al recibir un inserto. También se han buscado plásmidos que se encuentren presentes en un número mayor de copias. Ejemplos representativos

para ambos géneros pueden encontrarse en las tablas 4 y 5. En ellas se apreciara la menor variedad en B. subtilis.

II.B. Sistemas de transformación

La transformación es el fenómeno mediante el cual una célula puede aceptar ADN extraño e incorporarlo a su propio genoma, de manera que adquiere las características conferidas por este ADN heterólogo. Para que el proceso se lleve a cabo se requieren varias condiciones: la célula debe estar en un estado fisiológico tal que le permita aceptar ADN, estado conocido como de "competencia". En estas condiciones se producen actividades de nucleasas, de enzimas que forman parte del mecanismo de recombinación, de receptores de ADN y de otros elementos cuya función es poco clara. Es también importante el papel que desempeñan ciertos iones, especialmente calcio y magnesio. Entre los organismos en los que está mejor descrito el fenómeno están B. subtilis y Haemophilus influenzae (Venema, 1978). Otros, entre los que se cuenta E. coli, nunca alcanzan este estado en forma natural, pero se puede inducir artificialmente, colocando a las células enteras en contacto con una solución hipotónica de cloruro de calcio en frío (Mandel y Higa, 1970).

Son aún poco conocidas las funciones de algunos de los elementos participantes en el fenómeno de transformación. Destaca la actividad de las nucleasas, que permiten cortar el ADN que se introduce, pero una excesiva actividad de estas enzimas podría destruir a los ácidos nucleicos que se pretende introducir.

Por otra parte, las enzimas de recombinación deben estar activas, pues la información se incorporará al genoma gracias a ellas. Sin embargo, si el material que se usará para transformar está formado por plásmidos, y se desea que éstos permanezcan en forma autónoma, quizás sea preferible que los niveles de recombinación de la cepa receptora sean deficientes para evitar la integración al cromosoma. El papel de los iones está poco claro. Podrían participar tanto al permitir la actividad de las enzimas, como formando un complejo con el ADN heterólogo. Este complejo sería resistente a la acción de nucleasas, y los iones contribuirían a su precipitación sobre la superficie celular, donde se encontraría con los receptores de ADN. Tras este contacto, la entrada a la célula de la molécula de ADN se favorece por un pulso de calor.

Cada organismo presenta características particulares en cuanto a la eficiencia del proceso de transformación, al tipo de moléculas

por el que muestra preferencia, etc. En el caso de B. subtilis el estado de competencia se alcanza en la fase estacionaria temprana. Muestra preferencia por moléculas lineales de ADN. En cambio, la transformación con plásmidos monoméricos circulares es notablemente ineficiente, ya que se requiere una multiplicidad de 1:1000 a 1: 10000 para que una célula pueda ser transformada. Algunos autores han explicado esta baja eficiencia aduciendo el hecho de que, durante el proceso de entrada a la célula, el plásmido es roto por las nucleasas y linearizado. Estos daños no siempre son reparados adecuadamente. Por ello, resulta imposible detectar transformantes. En cambio, si lo que se introduce son oligómeros o multimeros de plásmido se obtendrán altas frecuencias de transformación (Camosi, 1978, Contente y Dubnau, 1979a y de Vos y Venema, 1982). En otros trabajos se sugieren técnicas como la denominada "rescate de marcadores". En ella se usa como cepa receptora una que contenga plásmidos con cierta homología con el que se pretende utilizar como vehículo de manera que, por procesos normales de recombinación, sea posible reparar las moléculas que se hayan dañado durante el proceso de entrada (Contente y Dubnau, 1979b).

En B. subtilis, como en otros microorganismos Gram⁺, entre los que está Streptomyces, es posible la introducción de información genética por otro método: el de formación de protoplastos (Hopwood,

1981). Esto permite eliminar la barrera que representa la pared celular a la entrada de ADN mediante el uso de lisozima. Posteriormente, se hace uso de la propiedad del polietilenglicol de favorecer la precipitación del ADN sobre los receptores que se encuentran en la membrana, y así resulta sencilla la entrada tanto para moléculas lineales como superenrolladas. La eficiencia, no obstante, es de diez mil a mil veces menor que con plásmidos cerrados y superenrollados (Chang y Cohen, 1979).

Una de las técnicas empleadas para la formación de un banco de genes que resulta más sencilla es la conocida como "clonación en tiro de escopeta". En ella se parte de una mezcla de ADN linearizado con enzimas de restricción o por métodos diversos y del vehículo molecular también linearizado. Ambos se ponen en contacto con la enzima ligasa, que formará enlaces fosfodiéster. Para favorecer la formación de moléculas recombinantes, es común incrementar la proporción de moléculas lineales de pasajero en relación a las del vector.

Sin embargo, lo señalado en los párrafos anteriores permite prever la dificultad que entrañaría la formación de un banco de genes en B. subtilis siguiendo esta estrategia. Las moléculas lineales competirían favorablemente con las circulares por los receptores y la

consiguiente entrada a la célula. Esto ha orillado a que algunos autores intenten la clonación de genes de interés inicialmente en E. coli. Una vez detectada la colonia que lo contenga, se aísla el plásmido y se transfiere a B. subtilis. De este modo, se ha tenido éxito en la clonación de alfa-amilasa, B-gluconasa y xilanasas de Bacillus, entre otras enzimas (Cornelis, 1982, Fouet, 1982, y Bernier, 1983).

II. C. Sistemas de transcripción, traducción y regulación.

El conocimiento general sobre las señales genéticas que permiten la transcripción, traducción, procesamiento pre y postraduccional, así como de la regulación de la producción de proteínas es fundamental para determinar la posibilidad de síntesis de proteínas heterólogas en un hospedero determinado. Una vez más, en este aspecto es E. coli el microorganismo mejor conocido, lo que contribuye a que sea la bacteria más utilizada en procesos de transferencia genética.

Para E. coli, se conocen con detalle secuencias consenso de promotores (Gold, 1981), así como regiones de terminación y sitios de unión al ribosoma (Rosenberg, 1979). También se conocen detalladamente algunos ejemplos de puntos de interacción entre la ARN

polimerasa y el ADN, la importancia de las secuencias espaciadoras y a la misma ARN polimerasa. El conocimiento de estos aspectos es posterior e incompleto para el caso de B. subtilis. Desde luego, este último microorganismo es mucho más complejo, ya que muestra un cierto nivel de diferenciación al presentar el proceso de esporulación. Posee varias polimerasas, cada una de las cuales, a su vez, transcribirá una familia de genes y se comportan de manera diferente durante la fase de crecimiento vegetativo o durante la esporulación (Doi, 1986b).

En la figura 7 pueden verse algunas secuencias de promotores con senso reportadas tanto para E. coli, como para B. subtilis. El número de secuencias conocido para el primer género es cercano a doscientos, mientras que para B. subtilis es menor en un 75%, aproximadamente. A pesar de las similitudes que se observan, se presentan barreras de expresión entre genes de las dos especies (Ehrlich y Sgaramella, 1978); cabe recordar el caso ya señalado de diferencias de expresión entre los marcadores del plásmido pHV 33 (Gryczan, 1980). Puede afirmarse que B. subtilis es mucho más estricto que E. coli en lo que a reconocimiento de señales se refiere; el punto más crítico parece estar a nivel del proceso de traducción. Se ha detectado que la secuencia Shine Delgarno es fundamental para el éxito del mismo, ya que ésta determina la comple-

mentareidad entre el ARN mensajero y el ARN ribosomal 16S (McLaughlin, 1981). Otros factores involucrados son desconocidos (Doi, 1986). Una vez iniciado el proceso de traducción, es prácticamente seguro lograr la expresión de un gene heterologo en B. subtilis.

La genealogía de las diversas especies de Bacillus no está bien establecida y no es posible delimitar líneas de parentesco claras. Por ello, no es de extrañar que se presenten problemas de expresión en la transferencia de genes entre las especies del mismo género. Sin embargo, se han registrado algunos ejemplos exitosos de expresión de genes provenientes, entre otros, de B. amyloliquefaciens y de B. pumilus (Palva, 1982 y Panbengréd, 1983).

La regulación presenta también diferencias a todos los niveles entre los dos géneros. En Bacillus, por ejemplo, un grupo de genes puede estar controlado por dos o más promotores, que permiten la expresión de los genes en diferentes etapas del crecimiento o durante la esporulación. Los promotores, a su vez, pueden estar traslapados o localizados uno a continuación del otro, lo que sugiere estrategias de regulación diferentes a los operones típicos de E. coli. Otra diferencia la encontramos en el caso del fenómeno de represión catabólica, la que en E. coli ha sido explicada por

la interacción del nucleótido AMP cíclico con una proteína receptora; CAP, la que a su vez se une al ADN. En Bacillus no parece actuar este nucleótido, sino nucleótidos polifosforilados.

II. D. Cepas receptoras.

Una de las características que deben cubrir las cepas que se utilizan como receptoras de información genética heteróloga es la de carecer de sistemas de modificación y degradación por diversos sistemas de restricción del ADN que aceptan. En E. coli se han desarrollado numerosas cepas con estas características, mientras que en B. subtilis los esfuerzos por obtener cepas deficientes en sistemas de restricción y modificación han avanzado lentamente (Ganesan, 1982). Una cepa que ha sido ampliamente utilizada como receptora es B. subtilis 168, tanto por poseer sistemas de restricción deficientes (Tanaka, 1979) como por carecer de plásmidos residentes (Lovett, 1976). Esto último puede ser importante de presentarse fenómenos de incompatibilidad de plásmidos.

La seguridad de las cepas es un factor importante en la selección de una receptora adecuada. Algunas cepas de E. coli presentan lipopolisacáridos con actividad tóxica, por lo que se ha requerido el esfuerzo de varios grupos para el desarrollo de hospederos que

no presenten problemas para la salud (Curtiss, 1976). B. subtilis, por su parte, presenta la ventaja de no ser tóxico y está reconocido como organismo "GRAS" (generalmente reconocido como seguro) por la Administración de Alimentos y Drogas en Estados Unidos. Por ello, ha sido ampliamente utilizado en la producción industrial de enzimas y antibióticos. Sin embargo, presenta algunos otros problemas como cepa receptora. En primer lugar, puede citarse su alta actividad proteolítica, lo que puede disminuir el título de proteínas producido y afectar la recuperación del producto, especialmente si ésta se realizará a partir del medio de cultivo (Doi, 1986). Este problema puede resolverse construyendo cepas receptoras afectadas en la actividad proteolítica, hecho que no resulta tan sencillo puesto que se presentan al menos dos tipos de proteasas en esta especie y es preciso buscar dobles mutantes (Kawamura y Doi, 1984, Fahnestock y Fisher, 1987). Sin embargo, el problema se compensa de alguna manera al presentar una alta velocidad de síntesis de proteínas. Otro problema que presenta B. subtilis, y que comparte con E.coli, es su incapacidad de modificar proteínas postraduccionalmente, especialmente en cuanto a plegamiento, glicosilación e insolubilidad de las proteínas producidas. Esto resulta relevante cuando la proteína que se desea producir es de origen eucarionte (Zabriskie y Arcuri, 1986).

Una ventaja adicional del género Bacillus sobre E. coli es la capacidad de secretar proteínas al medio de cultivo; B. subtilis puede excretar porcentajes que oscilan hasta en 10% y 20% de la proteína total (Holland, 1986). Inicialmente, se pensaba que esto podía deberse a las diferencias en estructura de pared celular, que se ilustran en las figuras 8 y 9. Estudios recientes demuestran que las proteínas que se excretan contienen una secuencia "líder" codificada dentro del mismo mensaje, mecanismo que funciona en cualquier tipo de organismo, y un ejemplo de la cual puede verse en la figura 10. La unión de este tipo de secuencias con proteínas funcionales permite la excreción de las mismas (Ulmanen, 1985). En organismos como E. coli la proteína saldrá sólo hasta el espacio periplásmico, mientras que en Bacillus llega hasta el medio de cultivo (Emr, 1983). Los modelos que explican el funcionamiento de esta secuencia aún no están de acuerdo sobre todos los factores que resultan decisivos para la salida de la proteína; entre ellos están la presencia de aminoácidos básicos, cuya carga favorece la interacción con la membrana (Ramaley, 1979), o bien, la carga neta de la secuencia (Inouye, 1982). Otros requisitos parecen ser el potencial de membrana, el carácter hidrofóbico del extremo amino terminal, las proteínas que constituyen el complejo de acoplamiento y los mecanismos de traslocación y de escisión de la señal.

Una característica adicional de importancia para una cepa receptora es la capacidad para mantener la existencia de los plásmidos incorporados en forma autónoma; para lograrlo, la cepa debe poseer sistemas de recombinación defectuosos (de Vos y Venema, 1983).

El comportamiento de las cepas en condiciones de alta densidad celular, como las que se presentan en un fermentador, resulta crítico si el objetivo final es la producción a gran escala. En este sentido son mucho mejor conocidos organismos como Streptomyces, Bacillus e incluso Saccharomyces cerevisiae que E. coli; sin embargo, se ha avanzado en el conocimiento del comportamiento de esta última en fermentadores de gran escala (Muth, 1985).

II. E. Problemas de clonación intra e interespecífica.

Se han mencionado ya algunos de los factores que pueden determinar si una proteína se sintetiza o no. La expresión puede ocurrir a partir de la información presente en el segmento introducido al vehículo como pasajero o a partir de las señales originalmente presentes en el vector. Para tener éxito, la estrategia general ha sido diseñar mejores vehículos moleculares, que contengan todos los elementos mencionados como importantes. Así, los plásmidos o fagos usados como vehículos pueden contener promotores adecuados

(Brosius, 1984), sitios de unión al ribosoma (Ambulos, 1984 y Flock, 1984); señales de secreción (Palva, 1983), de terminación de transcripción-traducción (Petterson, 1983). En ocasiones se requieren estrategias adicionales, según la similitud de las maquinarias metabólicas de las especies donadora y receptora. En general, puede afirmarse que los principales problemas para la expresión de información heteróloga se deben a diferencias en el funcionamiento de regiones regulatorias (McLaughlin, 1981) o de la ARN polimerasa (Sakaguchi, 1982). El mayor conocimiento de estos dos fenómenos contribuirá al diseño de los vehículos adecuados y al establecimiento de condiciones de producción que favorezcan la expresión de la información deseada.

En las tablas 6 y 7 se presentan ejemplos de clonación exitosa en los organismos estudiados hasta ahora. Aunque el número de ejemplos sea similar, la variedad de estrategias con resultados positivos en E. coli es mucho mayor.

III. PLANTEAMIENTO DE LA ESTRATEGIA

Las consideraciones anteriores permiten delinear los objetivos de trabajo, que se llevarán a cabo siguiendo el esquema mostrado en la figura 5.

La glucosa isomerasa, como ya se ha dicho, representa interés para la industria de edulcorantes. Si bien es un proceso que ha entrado en etapa de franca estabilización en cuanto a crecimiento se refiere, la baja de precios del azúcar en el mercado internacional y la fuerte presión que sobre el precio ejercen productos como el aspartamo, hacen necesario continuar investigando para que el proceso mantenga su competitividad (Homler, 1984). Por otra parte, el aprovechamiento de desechos lignocelulósicos constituye una extensa área de investigación, y la actividad de xilosa isomerasa resulta fundamental para el buen aprovechamiento de los xilanos, presentes en gran cantidad en este tipo de desechos.

A pesar de las bondades que para la producción de sustitutos de sacarosa representan las enzimas de Bacillus o de Streptomyces, se han mencionado también las dificultades que implica la clonación y expresión de genes heterólogos en estos géneros. A su vez, la información provenientes de estos microorganismos se expresa con dificultad en E. coli, y esto es particularmente cierto para el caso de la información proveniente de Streptomyces. En este laboratorio se ha practicado la clonación de la enzima proveniente de Actinoplanes missouriensis NRRL B 3342 en E. coli, y los resultados obtenidos hasta ahora permiten vislumbrar la dificultad, no ya de obtención de cepas hiperproductoras, sino incluso de alcanzar niveles detectables de expresión (Farrés, 1986).

Con el afán de evitar en lo posible problemas de expresión, dado que el objetivo final es obtener una cepa recombinante en B. subtilis, se exploró en primera instancia la posibilidad de usar al propio B. subtilis como donador de la información. Por lo tanto, se buscó actividad en varias cepas de esta especie, la que se evaluó en comparación a la expresada en las condiciones del laboratorio por la cepa de interés industrial B. coagulans NRRL B 5660. De no encontrarse actividad en B. subtilis, se usaría esta otra especie como cepa donadora, o se intentaría paralelamente la clonación de la misma.

En virtud de los problemas que representa la formación de un banco de genes por clonación tipo "tiro de escopeta" en B. subtilis, se procedió en primera instancia a detectar colonias recombinantes poseedoras de actividad isomerizante en E. coli.

La estrategia planteada, que implica una selección inicial en E. coli, podría partir del uso de uno de los vehículos que se han diseñado para la expresión de proteínas en este género, como alguno de los miembros de la serie pBR (Bolívar, 1977). Del plásmido recombinante obtenido podría después aislarse el fragmento de interés para introducirse a un vehículo usado en B. subtilis, como pC 194 o pUB 110. Sin embargo, se ha preferido usar de entrada un ve-

hículo bifuncional, pues así sólo es necesaria la selección de la colonia de interés en E. coli, la purificación del plásmido y su introducción por transformación en B. subtilis. La caracterización inicial puede hacerse en la misma E. coli.

Como cepa receptora de E. coli se seleccionó la cepa RR1, deficiente en capacidad de crecimiento en xilosa, y que se describe en la sección de resultados. Su bajo nivel de actividad isomerizante la hace una cepa receptora idónea, además de sus deficiencias en sistemas de restricción y modificación. Se ha manejado también la cepa K802, que posee deficiencias sólo en el sistema de restricción (Blattner, 1977). Para solventar el problema de que presente actividad isomerizante se intentó la obtención de una mutante incapaz de crecer en xilosa. Se logró aislar una cepa, 1-25, (Farrés, 1986), pero tras varias resiembras recuperó la actividad, por lo que se descartó como posible receptora y la cepa parental se utilizó sólo como control de actividad.

El vehículo seleccionado es el pHV 33, perteneciente a una familia de plásmidos híbridos entre pBR 322 y pC 194. Conserva un origen de replicación que le permite la multiplicación en Bacillus, pero se encuentra en bajo número de copias. Esto permite predecir que no habrá un incremento notable en la actividad isomerizante de la

cepa transformante sobre la obtenida en la cepa receptora, ya que no se eleva en forma considerable la dosis génica.

A las colonias que manifestaron fenotipo recombinante se les determinaron actividad isomerizante y capacidad de crecimiento en xilosa como única fuente de carbono, en forma comparada con cepas control. En seguida se aisló el plásmido y se volvió a transformar a la cepa receptora, para asegurar que de él proviene la actividad. En caso de ser necesario, se compararían parámetros característicos, como son temperatura y pH óptimos, termoestabilidad, requerimientos de iones y afinidad por sustrato.

No fue necesario implementar en B. subtilis una estrategia de selección igual a la practicada en E. coli, puesto que ya se transformó con el plásmido que contiene el gene de interés. Posiblemente, el proceso de caracterización se facilitaría si la célula hospedera no presentase actividad. Intentos por obtener una mutante incapaz de crecer en xilosa fracasaron, por lo que se seleccionó como cepa receptora a B. subtilis IA422, cuyas propiedades se describen en la sección de resultados. Las cepas transformantes de B. subtilis IA422 se reconocen por manifestar resistencia a clo-ranfenicol, y se les determinó también la actividad isomerizante.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener una cepa recombinante en B. subtilis productora de glucosa isomerasa con información proveniente del género Bacillus.

OBETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Establecer la presencia de actividad isomerizante en la cepa B. subtilis 168 y caracterización de la misma en caso de presentarse.
- 2) Determinación de las condiciones adecuadas de extracción de ADN para B. subtilis.
- 3) Obtención de una cepa recombinante con información proveniente de Bacillus en E. coli RR1.
- 4) Caracterización de la cepa recombinante obtenida en E. coli en términos de actividad isomerizante y capacidad de crecimiento en xilosa como única fuente de carbono.
- 5) Aislamiento del plásmido recombinante.

6) Determinación del método adecuado de transformación en B. subtilis.

7) Transformación de B. subtilis IA 422 con el plásmido aislado de la cepa recombinante obtenida en E. coli.

8) Determinación de la actividad isomerizante manifestada en B. subtilis IA 422 con el plásmido recombinante

MATERIAL Y METODOS

I. Cepas y Plásmidos.

*Bacillus subtilis

- a) 168 (trpC2) fue proporcionada por W. Burke, Universidad de Arizona
- b) IA 422 (leu^rm^rrecE4) fue obtenida del "Bacillus Genetics Stock Centre, Columbus, OH.
- c) QB 666 (sacA321 thr5 leuA8 hisA1) fue proporcionada por el Dr. S. Ehrlich, Universidad de París.
- d) SB 202 (trpC2 his2 tyr1 stoB) fue proporcionada por el Dr. S. Ehrlich, Universidad de París.

*Bacillus coagulans NRRL B 5660 fue proporcionada por Northern Regional Research Laboratories, ILL.

*Escherichia coli

- a) SK 1592 (pHV 33) fue proporcionada por el Dr. G. Rapoport, Universidad de París.
- b) RR1 (xyl5 thy proA2 lacY1 mtl1 supE44 galK2 hsdM hsdR rpsL20 (Sm^r) ara14) fue proporcionada por el Dr. Fernando Bastarrachea, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- c) K802 (hsdR hsdM gal met supE) fue proporcionada por el Dr. Edmundo Calva, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM)

d) K12 fue proporcionada por la Colección de Cultivos del Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

II. Medios de cultivo.

1) Medio completo de propagación (preservación de B. coagulans)
Bactopeptona 1%, extracto de carne 0.5%, extracto de levadura 0.5%; cloruro de sodio 0.25% y agar 1.8%.

2) Medio de crecimiento para B. coagulans (Yoshimura, 1966). Se preparan las soluciones A, B y C y se esterilizan por separado, mezclándose antes de usarse: A) extracto de levadura 0.3%, NH_4Cl 0.3%, KH_2PO_4 0.1% y agua a 700 ml; B) D-xilosa o D-glucosa 1%, MgSO_4 0.05%, MnSO_4 0.005% y agua a 300 ml; C) CaCO_3 0.2%.

3) Medio de Luria (preservación y cultivo de E. coli y B. subtilis)
Extracto de levadura 0.5%, triptona 1% y NaCl 1%; agar 1.5%

4) Medio de McConkey: se usó la fórmula de Difco, sustituyendo lactosa por xilosa 1%.

5) Medio mínimo para E. coli: se usó el medio M9 que contiene, por

litro:	Na_2HPO_4	7.0 g
	KH_2PO_4	3.0 g
	NaCl	0.5 g
	NH_4Cl	1.0 g

Glucosa 20% (*)	10 ml
CaCl ₂ 0.01 M	10 ml
MgSO ₄ 0.10 M	10 ml
Casaminoácidos 20%**	20 ml
Agua aforar a	1000 ml

* Puede ser sustituida por otra fuente de carbono

** Usado sólo para amplificación de plásmidos

*** Los requerimientos de las cepas fueron añadidos a una concentración final del 0.004%

6) Medio mínimo para B. subtilis: se usó el medio mínimo de Spizizen que contiene, por litro:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	14 g
KH ₂ PO ₄	6 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
agua destilada	1000 ml

Fuente de carbono variable

En el caso de que el medio sea usado para transformación se suplementa con 10 ml de glucosa 50% y 10 ml de solución CAYE (0.2 g de casaminoácidos y 1 g de extracto de levadura por 10 ml de agua). Durante la segunda fase de la transformación se utiliza el mismo medio suplementado con CaCl₂ 0.005 M y MgCl₂ 0.0025 M.

7) Suplementos

Los antibióticos requeridos fueron esterilizados por filtración y se añadieron en las siguientes concentraciones:

Ampicilina	100 µg/ml	
Tetraciclina	10 µg/ml	
Cloranfenicol	50 µg/ml	(<u>E. coli</u>)
	2 µg/ml	(<u>B. subtilis</u>)

III. Métodos de Aislamiento de ADN

1) Plásmidos

a) Los plásmidos provenientes de E. coli fueron aislados por el método de Bolívar, 1977.

b) Los plásmidos provenientes de B. subtilis fueron aislados por el método de Kieselburg, 1984.

2) ADN cromosomal

Para determinar cuál era el método más adecuado para la extracción de ADN íntegro en el caso de las especies del género Bacillus se probaron los métodos reportados por Rodríguez y Tait, 1983, Burke y Spizizen, 1977 y Bolívar, 1977.

IV. Transformación

1) E. coli se transformó según lo reportado por Cohen, 1972.

2) Para B. subtilis se probó el método de Dubnau según lo reportado por Rodríguez y Tait, 1983, así como el de Chang y Cohen, 1979, con las variantes que se reportan en resultados.

V. Unión de ADN

Se empleó la enzima ligasa de T4 (BRL) utilizando una solución amortiguadora (10X) formada por Tris 0.66 M, pH 7.6, MgCl₂ 66 mM, DTT 100 mM y ATP 4 mM, preservada por congelación y en oscuridad.

Las condiciones de reacción se reportan en resultados y están basadas en Dugaiczky, 1975.

VI. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción fueron obtenidas indistintamente de Sigma Chemical Co. o de BRL. Las condiciones de digestión fueron las señaladas por el fabricante en cuanto a soluciones amortiguadoras, pero los tiempos de incubación no fueron menores a 24 horas.

VII. Determinación de actividad isomerizante

Las condiciones de determinación de actividad se variaron de acuerdo al óptimo para cada especie, pero el procedimiento general fue:

- a) Cultivo del microorganismo partiendo de un inóculo precrecido 3 h, el que se añadió en una proporción de 1% (v/v) al medio de cultivo correspondiente. La concentración del inductor (xilosa) se varió según la especie. Posteriormente las células se cultivaron durante 16 h a la temperatura óptima de incubación (37°C para E. coli y B. subtilis, 45 °C para B. coagulans) en una incubadora Psychrotherm a 150 rpm.
- b) Concentración de las células por centrifugación en Sorvall RC50 a 8000 rpm durante 10 min. Se lavan con amortiguador maleatos 0.2 M pH 6.8 dos veces, y se resuspenden en el volumen adecuado del mismo amortiguador, normalmente una décima parte del volumen original.
- c) En el caso de E. coli se requiere romper las células con un homogeneizador celular Braun MSK enfriado con CO₂ por 45 seg, y recuperar el sobrenadante tras centrifugar el extracto 10 min a 10000 rpm en el rotor SS34 en una centrifuga Sorvall RC50.
- d) Para el caso de B. subtilis y de B. coagulans es posible detectar actividad usando células enteras resuspendidas en el mismo amortiguador.
- e) Cuando se analizó el efecto de los diversos iones sobre el comportamiento de la enzima la preparación se dializó 24 horas en frío contra el amortiguador maleatos 0.2 M.
- f) Los sistemas de reacción se preparan con:

0.5 ml de una solución de cofactores; normalmente,

MgSO₄ 0.1 M, CoCl₂ 0.1 M para E. coli

MgSO₄ 0.06 M, CoCl₂ 0.006 M para Bacillus

2.5 ml de una solución 2 M del carbohidrato

2.0 ml de sobrenadante o células

La temperatura de incubación es de 50 °C para E. coli y de 60 °C para Bacillus. El tiempo normal de reacción es de una hora.

La concentración de glucosa se mide enzimáticamente con el reactivo de glucosa oxidasa GOD-Perid (Lakeside). La cantidad de fructosa formada se cuantifica por la reacción de cisteína-carbazol (Dische y Borefreund, 1951), al igual que la de xilulosa, usando en ambos casos referencia a curvas patrón. En el caso de las pentosas la curva se prepara con D-ribulosa-O-dinitrofenilhidrazona.

La concentración de proteína se determina por el método de Lowry, 1951, usando como referencia albúmina sérica bovina.

VIII. Actividad proteolítica

Esta se determinó utilizando alícuotas del medio de cultivo o extracto de células obtenido tras la ruptura con el homogeneizador celular Braun MSK. Las preparaciones obtenidas se utilizaron para hidrolizar caseína y el producto se determinó colorimétricamente,

según la definición de unidad del catalogo de Sigma Chemical Co.

IX. Electroforesis en gel

La pureza de las diferentes preparaciones de ADN, la magnitud de la digestión con enzimas de restricción y las características del inserto se verifican por medio de electroforesis en gel de agarosa 0.8%, según lo especificado por Bolívar, 1977.

X. Determinación de sensibilidad a luz ultravioleta.

Las células fueron expuestas a las radiaciones emitidas por una lampara de luz ultravioleta UVSL-25, Ultraviolet Products, 254 nm, por diferentes tiempos de exposición; la viabilidad fue determinada por dilución seriada en solución salina 0.9% y las células fueron sembradas en medio de Luria.

XI. Transporte de xilosa.

Las dos cepas de E. coli se cultivaron en 10 ml de medio de Luria con 0.5% de xilosa por 14 horas a 37 °C con agitación. Se transfirieron a 20 ml de medio fresco con xilosa al 0.05% y se mantuvieron a 37 °C con agitación por 4 h. Se les agregaron 0.5 ml de solución de xilosa ¹⁴[C] a cada cepa. Se tomaron muestras de 1 ml a los tiempos indicados, se centrifugaron por 10 min a 10 000 rpm y cada muestra se resuspendió en 1 ml de líquido de centelleo, que

contiene 60 g de naftaleno, 4 g de PPO, 20 ml de etilenglicol, 100 ml de metanol por 1000 ml de dioxano. La incorporación de xilosa radioactiva fue cuantificada en un contador Mark III de Searle Analytic Inc. Se expresa en función de la cantidad de proteína.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE B. SUBTILIS 168.

B. subtilis es una especie ampliamente utilizada en la industria para la producción de enzimas de interés, como la alfa amilasa y diversas proteasas. No está reportada actividad de glucosa isomerasa en esta especie, a pesar de que otros miembros de este género son excelentes productores, como B. coagulans, B. stearothermophilus y Bacillus sp. El gene que codifica para xilosa isomerasa de B. subtilis ha sido clonado en E. coli (Wilhelm y Hollenberg, 1984), pero no se conocen detalles acerca de la actividad isomerizante. Se presenta, pues, como un problema de interés el ver si esta especie produce actividad isomerizante hacia glucosa y si la misma es comparable con la de enzimas de interés comercial, en caso de que se manifieste. La detección y caracterización de la actividad resulta importante desde dos puntos de vista: si la cepa manifiesta actividad, se puede utilizar como fuente de la información genética a clonar, esperando disminuir los riesgos de problemas de expresión, tanto en E. coli como en B. subtilis. El otro aspecto por el que resulta interesante detectar la actividad es el diseño de la estrategia de reconocimiento de la colonia que adquiriera la actividad isomerizante en el propio B. subtilis. Si presenta actividad, la colonia sólo podrá ser caracterizada en caso de incremento de actividad provocado por el plasmido recombinante.

Si la actividad es deficiente, se podría reconocer por complementación de función.

Por lo tanto, el primer paso fue determinar si en esta especie se presenta o no actividad isomerizante. Se procuró comparar con la cepa de B. coagulans NRRL B 5660, puesto que la enzima proveniente de la misma ha sido usada por la empresa Novo Industri A/S para la producción industrial de la enzima (Hamilton, 1974), si bien se desconocen algunos detalles específicos para esta mutante.

En primera instancia se analizó el crecimiento y la producción de enzima por parte de B. subtilis 168, en presencia de xilosa como inductor, ya que éste es un requisito para la producción de isomerasa por la mayoría de los microorganismos. En la Fig. 11 se ve que la actividad alcanza el punto máximo entre las 8 y 14 horas de fermentación y decrece posteriormente, probablemente por alta actividad proteolítica propia de la especie. Debe hacerse notar que tanto en este como en los siguientes casos la actividad determinada es la conversión de fructosa a glucosa por el método enzimático, que resulta más simple y sensible que la determinación de cetonas. Esto resulta válido toda vez que ya se dijo que la constante de equilibrio es cercana a 1.0.

Una vez establecido que esta cepa produce actividad isomerizante, así como el punto óptimo de cosecha, que se fijó en 16 horas, se procedió a comparar con otras dos cepas de B. subtilis, la QB 666 y la SB 202, en presencia y en ausencia de inductor. En la Fig. 12 puede verse que la actividad presentada por la cepa 168 es la más alta de las tres, y en todos los casos la presencia del inductor es necesaria para la manifestación de la actividad.

En la tabla 8 puede verse el efecto de diferentes concentraciones de xilosa en el medio de cultivo sobre la producción de la enzima. Concentraciones altas del carbohidrato traen consigo un efecto negativo en la producción de la enzima, probablemente por efectos de pH; el mismo fenómeno se produce con la enzima de B. coagulans. La concentración de xilosa se mantuvo siempre al 0.5% para garantizar el máximo nivel de inducción, de acuerdo a estos resultados. En la misma tabla puede verse que la glucosa no ejerce acción alguna como inductor, y en cambio su presencia afecta negativamente la síntesis de la enzima, aún en presencia de xilosa. El fenómeno de represión catabólica por glucosa se presenta también en otras isomerasas (Sánchez y Quinto, 1975).

Cabe señalar que siempre se registró la actividad correspondiente a células enteras; se buscó actividad en el sobrenadante y no se

pudo detectar, lo que indica que toda la actividad está localizada intracelularmente, como en la mayoría de los organismos productores.

La detección de la actividad en células enteras puede presentar problemas por difusión y entrada del sustrato, y para evitarlos se determinó actividad también en células rotas con desintegrador Braun, según el procedimiento descrito en Material y Métodos. Como se aprecia en la Fig. 13, no hay una diferencia marcada entre la actividad mostrada por las células rotas y las enteras. Esto sugiere que no hay limitantes a la entrada del sustrato y salida del producto en las condiciones empleadas. Por ello, y para facilitar la manipulación, todas las determinaciones de actividad posteriores se hicieron con células enteras. Este experimento permite notar, también, que a una hora de reacción se está todavía en velocidad inicial, por lo que es un tiempo adecuado para las determinaciones subsecuentes.

Las figuras 14 y 15 ilustran, respectivamente, temperatura y pH óptimos de actividad. Debe señalarse que sólo se muestra la actividad determinada en un punto de la reacción efectuada en las condiciones señaladas, no se trata de representaciones de velocidad inicial contra el parámetro considerado. El procedimiento puede

considerarse válido puesto que se realizaron determinaciones similares para B. coagulans y los valores obtenidos coinciden con los reportados por Danno (1970) para B. coagulans HN 68; esto puede verse en la tabla 9. Se observa un gran parecido entre las dos especies de Bacillus: coincide la temperatura óptima para ambas, y el pH óptimo es ligeramente más ácido para B. subtilis. Esta última propiedad representa una ventaja en un proceso industrial, pues se sabe que el pH alcalino favorece la formación de intermediarios tóxicos como la psicosa.

Los resultados obtenidos en el análisis de termoestabilidad sí muestran grandes diferencias de comportamiento entre las dos especies. Existen varios métodos para determinar este parámetro; aquí se siguió el procedimiento que sugiere la incubación por quince minutos a una temperatura dada y la posterior determinación de actividad usando las condiciones normales, en presencia de sustrato. Los resultados mostrados en la Fig. 16 indican que B. subtilis pierde un 80% de su actividad tras incubarse a 60 °C, mientras que B. coagulans la retiene alta incluso tras la incubación a 80 °C. Huitrón y Limon-Lason encontraron que la actividad de enzima libre e inmovilizada de B. coagulans empezaba a decaer tras incubarse a 70 °C. Quizás en este caso, al tratarse de células completas se eleve la resistencia a inactivación. Cabe añadir que B. coagulans

es un microorganismo cuya enzima es particularmente notable en cuanto a termoestabilidad (Huitrón y Limón-Lason, 1978). Además, en este caso, se puede observar que el ión cobalto ejerce un efecto protector, ya que si la incubación a altas temperaturas se realiza en su presencia, la pérdida de actividad es menor. Este efecto ha sido observado por otros autores y se explica al señalar que tanto cobalto como magnesio son fundamentales para la conformación activa de la enzima (Danno, 1971). B. subtilis, en cambio, no se comporta de la misma manera, pues no responde a la protección por cobalto. El sustrato puede también estar ejerciendo un efecto protector contra la inactivación térmica, pues al comparar los valores de actividad obtenidos al efectuar la reacción en condiciones normales, a 60 °C, se presenta una actividad casi 4 veces mayor que cuando se preincubó sin sustrato; esto se puede ver al comparar los valores indicados en las figuras 15 y 16. Cabe señalar que también el ión Mg^{2+} podría estar involucrado en el efecto protector.

La afinidad hacia el sustrato es una característica fundamental en una enzima. Glucosa es el sustrato de uso comercial, pero generalmente se trabajan mezclas de glucosa y fructosa, por lo que se consideró de interés analizar su comportamiento con ambos sustratos. Por otra parte, xilosa es el sustrato de interés metabólico,

por lo que resulta importante determinar si el grado de afinidad por este carbohidrato indica que se trata, efectivamente, de una xilosa isomerasa. Las figuras 17 y 18 muestran el comportamiento hacia fructosa y glucosa, respectivamente, por parte de B. subtilis. Las linearizaciones ilustradas en la Fig. 19 permiten determinar valores de K_m , que se comparan en la tabla 9 con los obtenidos en condiciones similares para B. coagulans. La afinidad de la enzima de éste último hacia glucosa es particularmente alta, y no es el denominador común de otras cepas de la misma especie, por lo que es posible que la cepa NRRL B 5660 haya sido seleccionada para su uso en la industria precisamente por esta característica, ya que esta hexosa es el sustrato normal en la producción de jarabes fructosados. No resulta extraño, pues, que la afinidad sea mayor que la presentada por B. subtilis. Este último posee una menor afinidad por fructosa, lo que podría representar una ventaja al usarse en un reactor enzimático en el que se encontrasen ambos azúcares, ya que se convertiría glucosa en fructosa preferencialmente. Debe agregarse que los valores obtenidos son comparables a los reportados para otras enzimas de uso industrial (Vaheri y Kauppinen, 1977).

Otro aspecto a destacar en la Fig. 17 es la inhibición de la actividad por cantidades de glucosa superiores a 2 M (36%). Estas

cantidades, empero, no obstaculizarían el trabajo de un reactor, puesto que la actividad máxima se alcanza normalmente con concentraciones cercanas al 40%, además de que el diseño del reactor puede ayudar a subsanar el problema de inhibición (Bucke, 1981). El valor de la afinidad por xilosa obtenido por la linearización mostrada en la Fig. 19 indica que estamos ante una verdadera xilosa isomerasa, como lo son la mayoría de las isomerasas en el mercado. Los valores de K_m obtenidos son más altos que los reportados para otras enzimas de Bacillus; sin embargo, las comparaciones son difíciles de establecer puesto que las condiciones de reacción y purificación de enzimas son diferentes. Otro aspecto coincidente con otras isomerasas es su necesidad de cobalto para manifestar la actividad, y especialmente el efecto sinérgico entre cobalto y magnesio. En la figura 20 se ilustra el fenómeno, al ver el efecto de diferentes iones sobre la actividad isomerizante. Se puede afirmar que manganeso, magnesio y calcio inhiben la actividad enzimática, y ningún ión por sí solo estimula la actividad. Cobalto es el ión con el que se alcanzan valores más elevados; sin embargo, en presencia de concentraciones crecientes de magnesio la actividad se estimula sinérgicamente y en forma proporcional a la concentración de magnesio presente en el sistema. Este comportamiento corresponde al mostrado por la enzima de B. stearothermophilus (Suekane, 1978). El valor obtenido para la constante de

afinidad por el ión cobalto es de 2.38 mM (Fig. 21) y es similar al de enzimas provenientes de estreptomicetos, como S. albus (Sánchez y Smiley, 1975) y A. missouriensis (Gong, 1980)

Los resultados obtenidos en esta etapa permiten afirmar que B. subtilis 168 muestra una actividad isomerizante similar a la de otras isomerasas empleadas con fines comerciales. Su termoestabilidad no es tan alta como la de B. coagulans, pero su pH óptimo puede ser más interesante para la producción de jarabes fructosados. Esto permitió concluir que el ADN de B. subtilis 168 constituye una alternativa interesante como fuente de información para obtener una cepa recombinante productora de una enzima de interés en el campo de edulcorantes, tanto en E. coli como en B. subtilis.

II. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN E. COLI.

Se han expuesto anteriormente las razones para proceder a la clonación del gene de glucosa isomerasa inicialmente en E. coli. Por consiguiente, se consideró necesario contar con información acerca de su actividad isomerizante.

La cepa que se pretende usar como receptora, E. coli RR1, presenta una actividad isomerizante mínima, que prácticamente no le permite

crecer en xilosa como única fuente de carbono. Esto puede verse en las figuras 22 y 23, respectivamente. En ambos casos se presenta en forma comparada con la cepa E. coli K802; esta es una cepa capaz de crecer en xilosa como única fuente de carbono y presenta actividad isomerizante. Ambas provienen de E. coli K12; por lo que es de esperarse que los genes involucrados en el metabolismo de xilosa de ambas cepas sean similares y que, si la cepa RR1 revirtiera o presentara niveles detectables de actividad isomerizante, sus propiedades fuesen parecidas. Los principales parámetros fueron determinados de manera similar a la realizada para E. subtilis y E. coagulans, y los resultados se presentan sintetizados en la tabla 9.

Los valores obtenidos son similares a los reportados para otras especies de *Escherichia*, como *E. intermedia*: la temperatura óptima es de 50 °C, es termolábil y magnesio y cobalto estimulan su actividad. Esto indica que se trata de verdaderas glucosas isomerasas, pues las hexosa-fosfato isomerasas requieren arsenato para manifestar su actividad. Los valores de K_m hacia glucosa y fructosa no se pudieron determinar, ya que las curvas de velocidad contra concentración de sustrato presentaron un comportamiento de enzima alostérica. Wovcha (1983) reporta un valor de K_m de 0.5 para glucosa, en condiciones diferentes de reacción.

Entre los parámetros señalados en la tabla 9 se ve que existen diferencias en varios aspectos entre E. coli y B. subtilis, pero el más fácil de determinar es la temperatura óptima. Esto puede ser aprovechado para determinar rápidamente el origen de la actividad, en caso de que tras la transformación con ADN de Bacillus aparezcan colonias capaces de crecer en xilosa, y así distinguir recombinantes de revertantes. Joyet (1984) usó un procedimiento similar, haciendo uso de las diferencias en termoestabilidad de dos amilasas, para evitar recurrir a métodos inmunológicos, más precisos y sensibles, pero que implican purificaciones de proteína previas y consumen tiempo.

La cepa receptora debe cumplir con los requisitos mencionados en cuanto a carencia de sistemas de restricción, aunque los de modificación pueden estar presentes. Si bien en lo que a este aspecto se refiere la cepa E. coli K802 podría haber sido una receptora adecuada, la presencia de actividad isomerizante permite descartarla para facilitar el proceso de selección por complementación funcional, aunque puede servir como punto de referencia para el estudio del comportamiento de cepas que si presentan actividad isomerizante. Por ello se optó por usar como cepa receptora a E. coli RR1. Esta mutante es incapaz de crecer en medio sólido con xilosa como única fuente de carbono; por otra parte, tiene color

blanco cuando se le cultiva en medio de McConkey suplementado con xilosa 1%; mientras que las colonias usadas como control, E. coli K802, presentan un color rojo o rosado.

La cepa E. coli RR1 presenta deficiencias en actividad isomerizante debido a que presenta la mutación xyl5; sin embargo, no está claro el efecto de ésta. Aparentemente, está alterado sólo el gene estructural (Maleszka, 1982, Wilhelm y Hollenberg, 1984), pero hay que recordar que pueden presentarse efectos polares en el operón. El que el gene de xilulosa cinasa esté intacto ha sido considerado por algunos autores como un requisito para evitar problemas de manifestación de la actividad isomerizante (Lawliss, 1984).

Sin embargo, experimentos realizados en este laboratorio indican que la cepa no presenta un transporte normal del carbohidrato al compararse con una cepa silvestre, E. coli K12 (Fig. 24). La interpretación de estos resultados es difícil, toda vez que además de la permeasa codificada en el operón, recientemente se ha encontrado un segundo sistema de transporte de xilosa (Kurose, 1985), aunque de menor afinidad por el azúcar. Esto implica la necesidad de practicar la selección de colonias de interés en un medio con altas concentraciones del carbohidrato, para asegurar la entrada a la célula por difusión y lograr la inducción de la actividad.

III. DETERMINACION DEL METODO ADECUADO DE EXTRACCION DE ADN EN B. SUBTILIS.

Se probaron tres métodos para la extracción de ADN cromosomal íntegro a partir de B. subtilis. Ellos fueron los descritos por Bolívar, 1977, Burke y Spizizen, 1977 y Rodríguez y Tait, 1983. Los resultados obtenidos obligaron a descartar el método de Burke, ya que aunque se obtuvieron grandes cantidades de ADN, éste estaba totalmente degradado al ser verificado su aspecto en un gel de agarosa al 0.8%. Entre los otros dos, se optó por el método de Rodríguez, ya que los rendimientos fueron mucho mayores, alrededor de 2.5 mg/l. Es difícil atribuir a algún factor el éxito de este método, ya que las diferencias con el de Bolívar son muy sutiles; prácticamente usan los mismos reactivos. Rodríguez no usa agente quelante (EDTA) y prolonga la incubación con lisozima al doble, la que además lleva a cabo a 37 °C, en vez de los 0 °C de Bolívar.

La Fig. 25 muestra el ADN obtenido, así como su sensibilidad a diversas enzimas de restricción, lo que indica que la calidad de la preparación es buena. Un aspecto que debe destacarse en esta figura es que ninguna de las enzimas provoca una digestión total del ADN, a pesar de que los tiempos de incubación son largos. Este mismo fenómeno se ha presentado en el laboratorio en B. coagulans,

no así en otros microorganismos, como A. missouriensis (datos no mostrados). La explicación a este fenómeno no es fácil, y podría estar relacionada con mecanismos de modificación del ADN. Cabe recordar que el proceso de restricción y modificación es un proceso poco conocido aún. Pueden existir varios sistemas que lo lleven a cabo. Sin embargo, el hecho de no obtener fragmentos muy pequeños puede resultar benéfico, pues éstos competirían activamente por la acción de la enzima ligasa. Por otra parte, una digestión total incrementa el riesgo de ruptura del gene de interés, en caso de que éste posea algún sitio de corte de la enzima de elección.

IV. TRANSFORMACION DE E. COLI RR1.

Las cualidades que hacen de E. coli RR1 una cepa receptora adecuada ya han sido descritas. Sin embargo, se corría el riesgo de que, al desconocer la genealogía de la cepa y el modo en que ocurrió la mutación, la cepa revirtiera fácilmente. Por lo tanto, se procedió a la búsqueda de revertantes. Para ello, se sembraron alicuotas de 0.2 ml provenientes de una suspensión celular de aproximadamente 10^8 células por mililitro en placas de medio M9 con xilosa a diferentes concentraciones: 0.5%, 1%, 2% y 5%. Las concentraciones altas fueron empleadas para permitir la entrada del carbohidrato

por difusión y rescatar aquellas colonias que tuvieran el gene de isomerasa intacto, aunque tuviesen problemas de transporte. Nunca se encontraron células capaces de crecer, incluso cuando se trataron previamente con CaCl_2 , de manera similar al tratamiento practicado para transformación, buscando una permeabilización que facilitase la entrada del carbohidrato y la consiguiente inducción de actividad.

El ADN del plásmido pHV 33 fue purificado a partir de E. coli SK 1592 por el método de Bolívar, 1977. Tanto éste como el ADN cromosomal de *B. subtilis* fueron digeridos por separado con la enzima de restricción Bam HI, que corta en el gene que confiere resistencia a tetraciclina, como se muestra en la Fig. 26. Tras 24 h de incubación, la enzima fue inactivada por calentamiento a 65°C por 15 minutos y extraída con fenol y cloroformo en proporción 1:1. El ADN proveniente de ambas preparaciones se precipitó con NaCl 0.2 M y 2 volúmenes de etanol frío, guardándose a -70°C . Se mantuvieron en estas condiciones durante 12 horas y se centrifugaron en una microcentrifuga Eppendorf durante 5 minutos. El paquete se lavó dos veces con etanol 70% frío y se resuspendió en agua estéril. Los ácidos nucleicos del vector y el pasajero se mezclaron en una proporción de 1:10, de acuerdo a Orzech (1982), sin el uso de fosfatasa alcalina, de acuerdo a Bernier (1983). Posteriormente se

incubaron a 4 °C por 16 horas con la enzima ligasa de T4 (BRL) amortiguada como se señaló en Material y Métodos. Se aplicaron 100 unidades de enzima por microgramo de ADN, en un volumen total de 20 µl.

La mezcla ligada fue usada para la transformación de E. coli RR1, tal y como se describe en Cohen (1972). La eficiencia de las enzimas de restricción y de ligasa fue comprobada también por transformación, verificando la aparición de células transformantes con las preparaciones de plásmido entero, plásmido digerido, plásmido digerido y ligado a si mismo y la mezcla ligada. La digestión fue completa pues no aparecieron colonias que indicasen transformación con plásmido digerido. El plásmido digerido y ligado a si mismo si produjo transformantes, lo que indica que la ligasa si actuó correctamente. Esto se vio al sembrar las células en los medios de selección adecuados. Se usó medio de Luria con 100 µg/ml de ampicilina para la detección de transformantes, y se replicó al mismo medio con 10 µg/ml de tetraciclina para detectar recombinantes, cuando la enzima de restricción usada fue Bam HI. Las que resultaron recombinantes fueron resembradas en medio M9 con xilosa 2% como fuente de carbono, además de los requerimientos de la cepa.

El número de transformantes obtenido fue muy bajo (490 colonias

por microgramo de ADN), pero 90% de ellas resultaron recombinantes; quizás se debe a la alta proporción de pasajero que competía con las moléculas circulares por la entrada a la célula, pero que evidentemente no podría ser detectado. Cabe recordar que la clonación tipo "tiro de escopeta" favorece la entrada de insertos pequeños (Bron, 1985). Se obtuvieron dos colonias con aparente capacidad de crecimiento en xilosa tras la réplica al medio M9, pero sólo una resultó estable y mantuvo el fenotipo ilustrado en la figura 27: resistencia a ampicilina y cloranfenicol, sensibilidad a tetraciclina, capacidad de crecimiento en xilosa como única fuente de carbono.

Se repitió el mismo procedimiento utilizando como enzima de restricción Pst I. Se obtuvo un mayor número de transformantes (3210/ μ g de ADN), pero sólo 15% fueron recombinantes, detectadas en este caso por su incapacidad de crecimiento en ampicilina. Ninguna adquirió la capacidad de crecimiento en xilosa. Las explicaciones posibles son varias; el gene podría haber sido cortado por la enzima, o el número de colonias es bajo y la posibilidad de encontrar la clona de interés también. Es conveniente señalar que la formación de un banco completo de genes de B. subtilis, usando enzimas que corten hexanucleótidos, implica tener aproximadamente 2500 colonias, de acuerdo al tamaño del genoma de B. subtilis (Fe-

rrari, 1981), así como de la capacidad de carga del pHV 33, que en promedio es 5 Kb (Aubert, 1982). Por lo tanto, es realmente afortunado el haber aislado, para el caso de corte con Bam HI, cepas poseedoras del fenotipo esperado.

Un factor que puede haber contribuido a la transformación ineficiente es el no haber seleccionado fragmentos del tamaño aceptable por el plásmido. Los fragmentos mayores a su propio tamaño no forman moléculas recombinantes estables, y los pequeños pueden conducir a la obtención de un alto índice de recombinantes aparentes. Estas difícilmente formarán proteínas activas debido a que los insertos pequeños no contienen suficiente información.

V. CARACTERIZACION DE LA CEPA RECOMBINANTE DE E. COLI RR1.

A pesar de que se había buscado previamente alguna revertante, no podía descartarse el fenómeno como explicación al crecimiento de las cepas que habían aparecido como posibles poseedoras del gene de glucosa isomerasa; tampoco se podía descartar la posibilidad de contaminación. Esta última se descartó al comprobarse la necesidad de los requerimientos específicos de la cepa RR1 para el crecimiento de las colonias.

Cuando se comparan las actividades isomerizantes, la cepa recombinante presenta mayor actividad que la cepa receptora, como se ve en la Fig. 28. Sin embargo, los niveles de actividad apenas alcanzan los manifestados por la cepa E. coli K 802. No se puede, pues, hablar de la obtención de una cepa hiperproductora, si bien los niveles de actividad se incrementaron 4 veces sobre el nivel basal. En el caso de xilosa isomerasa de E. coli el nivel basal en un primer intento se elevó 5 veces (Wovcha, 1983). Es posible que para alcanzar el objetivo de hiperproducción deban utilizarse plásmidos con promotores adecuados, o controlar las condiciones de mantenimiento del número de copias del plásmido que incluyen manipulación de condiciones ambientales como composición del medio de cultivo, temperatura de crecimiento, además de las interacciones entre el plásmido y la célula hospedera (Seo y Bailey, 1985).

El plásmido recombinante fue purificado y usado para transformar nuevamente a E. coli RR1, para ver si era capaz de conferir nuevamente el fenotipo buscado. En la Fig. 29 pueden compararse las curvas de crecimiento tanto de la cepa receptora como de la recombinante aislada inicialmente, así como de la transformada con el plásmido recombinante (BT). Caba la posibilidad de haber reestablecido el sistema de transporte del carbohidrato o de no detectar actividad por la no entrada de fuente de carbono. Por lo tanto, se usaron dos concentraciones de xilosa en el medio de cultivo, 0.5%

y 2.0%. En la Fig. 29 puede advertirse un ligero crecimiento por parte de la cepa RR1 cuando la concentración de xilosa es más elevada. Por su parte, las dos cepas recombinantes muestran crecimiento, cuya magnitud es independiente de la concentración de fuente de carbono. El crecimiento de la cepa BT es ligeramente menor.

El hecho de que la cepa transformada con el plásmido recombinante no alcance los niveles de crecimiento de la cepa de la cual se aisló éste no lo tenemos explicado. Podrían haber ocurrido mutaciones, alteraciones o rearrreglos en el plásmido debido a propiedades de la cepa receptora. El mismo fenómeno se ha presentado previamente en E. coli 1-25 tras la introducción de ADN proveniente de A. missouriensis (Farrés, 1986), y esta cepa no tiene alterado el sistema de modificación, en tanto que la cepa RR1 está afectada en los sistemas de restricción y modificación codificados por los genes hsdR y hsdM. Ambas poseen el sistema de recombinación intacto; esto podría permitir rearrreglos internos del plásmido. Quienes han clonado el gene de xilosa isomerasa de E. coli sugieren que el uso de cepas recA es recomendable para garantizar la mayor estabilidad de plásmidos (Stavis y Ho, 1985).

Por otra parte hsdR y hsdM no son los únicos genes involucrados en los sistemas de restricción y modificación, ya que éstos han de-

mostrado ser mucho más variados. Por lo tanto, pueden estarse presentando fenómenos de degradación o modificación del ADN causados por otros mecanismos. Entre los sistemas de restricción descritos recientemente están los codificados por los genes mar, mcrA y mcrB (Blumenthal, 1986), aunque cabe hacer notar que E. coli RR1 pertenece al grupo de las cepas receptoras que no deben presentar problemas por ser mcrB⁻. Problemas de mantenimiento de ADN heterólogo en E. coli se han presentado, por ejemplo, en el caso del de Campylobacter jejunii. Esta es una bacteria Gram⁻ tipo Vibrio, con similitudes a microorganismos Gram⁺, especialmente en su proporción G/C, cercana al 30%. Es difícil mantener los bancos de genes de la misma en E. coli r⁻m⁻, aparentemente porque el ADN se va degradando, posiblemente por el tipo de modificaciones de su ADN (Calva, 1987). Es posible que un fenómeno similar haya ocurrido en estos casos, al tratarse también de microorganismos Gram⁺. Sin embargo, habría que verificarlo comparando los patrones de restricción de los dos plásmidos.

Si bien los datos anteriores parecen eliminar la posibilidad de que haya ocurrido una reversión, no debe descartarse la posibilidad de inducción de un fenómeno regulatorio o supresivo por el plásmido. Para descartar esta explicación, se recurrió a determinar diferencias entre algunas características de las enzimas pro-

venientes de E. coli y B. subtilis. Concretamente, por facilidad, se recurrió a la temperatura óptima. La enzima de E. coli se inactiva rápidamente tras incubarse a 60 °C, que es la temperatura óptima para el género Bacillus. En la Fig. 30 se puede ver que la actividad de la cepa recombinante es más elevada a 60 °C, lo que señala una vez más que el origen de la actividad es Bacillus y no una reversión o fenómeno regulatorio.

Un fenómeno que confirmaría la relación entre el plásmido y la actividad detectada sería que ésta se incrementase en presencia de una presión selectiva sobre el vehículo molecular. Esta estrategia ha permitido incrementos hasta de 60% en el caso de producción de alfa-amilasa por B. subtilis en presencia de neomicina y cloranfenicol (Pinches, 1985). En la Fig. 31 puede verse que en presencia de ampicilina la actividad se incrementa hasta cierto límite (200 µg/ml), pero concentraciones demasiado altas (500 µg/ml) ya no ejercen efecto. Esto puede deberse a que las células estén siendo afectadas por el antibiótico, tal como ha sido reportado en otros experimentos de análisis de estabilidad (Dennis, 1985). La ampicilina es inestable en el medio de cultivo, por la actividad de la B-lactamasa del plásmido (Pierce y Gutteridge, 1985). No obstante, la estimulación por ampicilina ha sido reproducible en nuestras condiciones de trabajo. Habría que estudiar más a fon

do la relación entre las actividades de B-lactamasa y de isomerasa para alcanzar una conclusión definitiva.

Los resultados anteriores sugieren, pues, que se cuenta con un plásmido recombinante que contiene el gene que codifica para la enzima glucosa isomerasa proveniente de B. subtilis 168, por lo que se procedió a su introducción en una cepa receptora adecuada de B. subtilis.

VI. TRANSFORMACION DE B. SUBTILIS IA 422

Se ensayaron las dos metodologías disponibles para lograr la transformación de Bacillus: el llevar a las células al estado de competencia y la formación de protoplastos. Sin embargo, cabe señalar que, para efectos de una transformación como la que se pretende realizar, con un plásmido monomérico que se sabe que contiene la información deseada, ninguno de los dos métodos representa ventaja. El criterio de selección del método será, por lo tanto, facilidad de manejo; los experimentos de prueba se llevaron a cabo con B. subtilis 168.

La inducción del estado de competencia se logró por el método de

al no contar con el agente quelante EGTA, recomendado para incrementar rendimientos, fue necesario optimizar el procedimiento para las condiciones del laboratorio. Así, se decidió probar el efecto de diferentes concentraciones de ADN, así como de tiempos de incubación, tal y como se indica en las figuras 32 y 33. Se logra obtener niveles aceptables de células transformantes a una hora de incubación, pero con concentraciones altas de ADN, 5 µg/ml; puede hablarse ya de un nivel de saturación.

La formación de protoplastos se llevó a cabo basándose en el método de Chang y Cohen (1979). Para obtener transformantes fue necesario variar la fase de crecimiento a la que se cosechaban las células, y trabajar con las colectadas en fase estacionaria, no la logarítmica que señala el autor; además, se emplearon concentraciones mayores de lisozima (5 mg/ml). A pesar de que no se usó medio de regeneración, sino el propio medio de Luria con el antibiótico requerido como indicador de selección, fue posible recuperar un alto número de transformantes respecto a células viables. No obstante, el criterio de facilidad de manipulación llevó a seleccionar el método de inducción del estado de competencia para llevar a cabo la transformación deseada.

La cepa a utilizar como receptora es B. subtilis IA 422. Además de

que posee niveles de restricción y modificación deficientes, presenta la mutación recE4. Esta permite la permanencia de los plásmidos que se han introducido como moléculas autónomas del cromosoma. Su actividad es deseable para lograr mayor eficiencia de transformación de células competentes (de Vos y Venema, 1983). Sin embargo, ya se ha dicho que en este caso la eficiencia de transformación no resulta tan importante ya que sólo se transforma con un tipo de plásmido, cuya presencia se detecta por resistencia a antibióticos y no se pretende formar un banco de genes. La cepa no presenta ningún problema si es transformada por el método de protoplastos.

La presencia de la mutación recE4 se verificó al comprobar la mayor sensibilidad de esta cepa en relación a B. subtilis 168 al ser tratadas ambas con luz ultravioleta (Fig. 34). Su actividad proteolítica extracelular es comparable a la de la cepa 168 (Fig. 35) y no se detectó en ninguno de los dos casos actividad intracelular. Esto sugiere que podrían presentarse problemas si la proteína es secretada al medio de cultivo, pero no es el caso en el presente momento.

Por otra parte se analizó su capacidad de producción de enzima y prácticamente no produce actividad isomerizante (Fig. 36). Sin em-

bargo, en medio mínimo de Spizizen con xilosa 1% como fuente de carbono si presenta crecimiento, tanto en medio sólido como líquido. A pesar de ello, es posible detectar diferencias entre su aspecto y el de B. subtilis 168 en medios de crecimiento con indicadores, como se ejemplifican en la tabla 10. Esto indica que la actividad isomerizante si está relacionada con el metabolismo de xilosa, aunque quizás contenga un segundo sistema que le permita la asimilación y metabolismo del carbohidrato, gracias al cual se observa crecimiento en medio mínimo.

Se llevó a cabo la transformación por el método de Dubnau, usando 5 µg de ADN de plásmido recombinante. Se usó la misma cantidad de plásmido pHV 33 como control. Tras la incubación con ADN las células se sembraron en medio de Luria con 2 µg/ml de cloranfenicol. Este antibiótico sólo permite detectar las células que fueron transformadas y es el único de los tres antibióticos a los que el plásmido confiere resistencia que se expresa en B. subtilis.

La frecuencia de transformación obtenida fue baja (390 colonias por mililitro), hecho esperado ya que la cepa IA 422 posee la mutación en el gene recE4, que conduce a una menor eficiencia del proceso. Las colonias aisladas presentaron un color amarillento en púrpura de bromocresol, aunque no tan intenso como B. subtilis. Se

seleccionaron algunas al azar y se determinó actividad isomerizante. En la misma Fig. 36 puede verse que se incrementa la actividad con respecto a la cepa receptora, y prácticamente se alcanza el nivel original de la donadora, aunque la coloración presentada no es tan intensa. Las colonias transformadas con el pHV 33 no modificaron su color ni elevaron sus niveles de actividad isomerizante con respecto a los de la cepa receptora, lo que en este caso permite, si no descartar, por lo menos disminuir la posibilidad de que se trate de una reversión, pues por ahora no se cuenta con pruebas que permitan eliminar esta suposición.

B. subtilis IA 422 está presentando un comportamiento similar al observado en E. coli RR1. La cepa transformada con el plásmido aislado de la cepa recombinante inicial no incrementa los niveles de actividad sobre los de la cepa donadora; esto refuerza la suposición de que el plásmido sufrió alguna modificación. No obstante, en este caso pueden estar sucediendo fenómenos adicionales, ya que la regulación es diferente en ambos géneros y el plásmido puede no contener todos los elementos necesarios para lograr una expresión eficiente. Cabe señalar que en este caso se probó la adición de cloranfenicol al medio de cultivo y no hubo diferencias entre la actividad mostrada en presencia y en ausencia del antibiótico. Es-

to plantea la necesidad de practicar estudios a fondo que indiquen cuál es el promotor y el control de expresión que se está usando. El hecho de que tanto E. coli RR1 como B. subtilis requieran xilosa como inductor parece indicar que el fragmento contiene la señal regulatoria. Esta es reconocida y empleada en los dos casos, como ocurre con Wilhelm y Hollenberg (1984).

CONCLUSIONES

En la primera etapa de este trabajo se detectó actividad de glucosa isomerasa en B. subtilis. Es importante la detección de actividad en este microorganismo, puesto que ha sido ampliamente utilizado por la industria para la producción de enzimas, como proteasa y alfa-amilasa, así como de antibióticos. Varias cepas de esta especie mostraron actividad, si bien la de la cepa 168 fue la más elevada.

La actividad encontrada en el laboratorio coincide con la determinada en condiciones similares para una cepa de interés industrial, B. coagulans NRRL B 5660. Las propiedades encontradas para la enzima de B. subtilis resultan interesantes para su uso en el campo de edulcorantes, a reserva de que su termoestabilidad es menor a la mostrada por B. coagulans.

Técnicas de recombinación in vitro sencillas, utilizando el vehículo bifuncional pHV 33 y la cepa E. coli RR1 como receptora, permitieron aislar una cepa recombinante capaz de crecer en xilosa como única fuente de carbono y que incrementa el nivel basal hasta alcanzar el de una cepa de E. coli poseedora de actividad isomerizante.

El contar con una cepa de B. subtilis deficiente en actividad iso-

merizante y con sistemas de recombinación, restricción y modificación alterados permitió que, tras el montaje de condiciones de selección, aislamiento de ADN y transformación, se aislase una cepa con la capacidad de producción de isomerasa elevada casi al nivel de la cepa donadora. El objetivo final, de lograr obtener una cepa recombinante productora de glucosa isomerasa en B. subtilis se puede considerar cubierto. Sin embargo, a la cepa obtenida pueden realizársele varios cambios, de manera de lograr obtener una cepa hiperproductora o con propiedades de mayor interés.

Una de las razones por las que la actividad obtenida puede ser baja es que el plásmido utilizado como vehículo molecular posee un origen de replicación perteneciente a un plásmido, el pC 194, que se encuentra normalmente en un número de copias bajo. Por lo tanto, una tarea inmediata consistiría en el aislamiento y caracterización del fragmento de interés y su subclonación en un plásmido multicopia, como pUB 110, y buscar así un incremento en la producción por un incremento en la dosis génica. Esto no siempre garantiza la hiperproducción, por lo que también habría que estudiar otros fenómenos regulatorios y aspectos del metabolismo de xilosa en este microorganismo.

Por otra parte, se desconoce a partir de qué promotor se está ex-

presando el gene. La determinación de este hecho, así como la subclonación a plásmidos que contengan promotores más eficientes puede resultar en incrementos en la actividad. Cabe recordar que este tipo de metodologías han conducido a incrementos de 20 a 40 veces en la producción de una proteína, lo que colocaría a esta cepa en condiciones de competir favorablemente con las cepas que se emplean actualmente en la producción de la enzima a nivel industrial.

Otro aspecto que puede resultar de gran interés es la subclonación a vehículos que permitan la excreción de la proteína porque posean la señal de secreción codificada en la secuencia líder. Si bien este no es el único aspecto que determina la salida de una proteína, si es uno de los más importantes. Esta posibilidad permitiría un concepto diferente en la recuperación de la enzima. Hasta ahora, el diseño de reactores con enzima semipurificada es incosteable al comparar con la inmovilización de células completas, por lo que habría que hacer previamente un estudio económico y determinar las posibilidades de competitividad.

En este trabajo no se llevó a cabo la clonación de la enzima de B. coagulans por evitar posibles problemas de expresión. Sin embargo, éste es un microorganismo que posee de entrada algunas propiedades atractivas, como su mayor termoestabilidad. Resultaría, pues, de

interés, poder comparar resultados entre las dos especies y ver si las diferencias genéricas afectan o no la expresión en este sistema. Un primer intento de clonación directa en B. subtilis realizado en este laboratorio fracasó, debido a que se usó una cepa receptora derivada por mutagénesis con NTG a partir de B. subtilis que resultó ser inestable.

La obtención de cepas recombinantes hiperproductoras de enzimas de interés industrial en organismos adecuados para su producción a gran escala, como Bacillus, es difícil de lograr en un solo paso. El aislamiento del gene sólo es el primer paso, y el resultado obtenido en este momento representaría tan solo una primera etapa, quedando pendiente el obtener una cepa hiperproductora.

Las técnicas de recombinación in vitro presentan la ventaja de trabajar sobre un objetivo determinado, no aleatoriamente como se hace con la mutagénesis tradicional. El inconveniente que presentan es el alto costo de la experimentación. Por lo tanto, para continuar con este tipo de proyecto es necesario evaluar los beneficios que se derivarán de su conclusión.

En este sentido, cabe analizar las perspectivas desde dos puntos de vista: la adquisición de conocimientos y las posibilidades de

implementación en México de procesos que requieran la isomerización enzimática.

La glucosa isomerasa, como ya se ha dicho, constituye un buen modelo de estudio puesto que es una enzima conocida en diversos microorganismos. Ofrece la posibilidad de realizar estudios comparativos y se cuenta con un buen banco de información en torno a propiedades como pesos moleculares y características cinéticas. El caso concreto de B. subtilis presenta interés, al ser éste un microorganismo muy conocido genéticamente y de uso en la producción industrial de diversos metabolitos. Al ser una enzima intracelular, ofrece la posibilidad de realizar estudios sobre secreción mediante la ayuda de secuencias líder incorporadas a vectores diseñados con este propósito.

La principal aplicación de la glucosa isomerasa en el mundo está en la producción de edulcorantes líquidos conocidos como jarabes de maíz ricos en fructosa, y los principales consumidores son los productores de refrescos. México es uno de los países con mayor consumo per capita de este tipo de bebidas; sin embargo, la factibilidad de llevar a cabo procesos de isomerización enzimática en México es prácticamente nula en el campo de producción de edulcorantes a partir de almidón de maíz. La razón es la estructura ar-

tificial de precios que existe en nuestro país, ya que los granos básicos están subsidiados y su distribución es controlada por entidades gubernamentales. El recurso que queda es partir de almidón proveniente de otras fuentes, pero los tubérculos como papa, remolacha y yuca no son tan ampliamente cultivados como para garantizar un gran mercado para la enzima. Los productores de yuca han manifestado interés en modificar su almidón para darle mayor valor agregado, y es el único sector en el que se puede ver una aplicación a mediano plazo.

La industria azucarera ha superado en los últimos años deficiencias, lo que le ha permitido cubrir la demanda nacional. Sin embargo, sus problemas financieros e ineficiencias subsisten. La producción de fructosa a partir de desechos como las mieles incristalizables podría ayudar a elevar ganancias, puesto que el valor comercial de la fructosa es muy elevado. La enzima puede usarse para convertir glucosa proveniente de la hidrólisis química de la sacarosa en fructosa. Azúcar S.A. ha mostrado interés en este proyecto.

Las consideraciones anteriores permiten afirmar que, a pesar de que los usos de la enzima en nuestro país son mucho más limitados que en el resto del mundo, existe un mercado para la misma. El

éxito para su introducción dependerá en buena medida de contar con una cepa eficiente, y las técnicas de recombinación in vitro permiten llegar rápidamente al objetivo. El sistema de clonación en Bacillus ofrece muchas ventajas para todos los productos destinados a la industria de alimentos, por lo que profundizar en el estudio de este sistema es importante como área de adquisición de conocimientos básicos. Las razones anteriores indican, por lo tanto, que es recomendable el proseguir en la búsqueda de una cepa hiperproductora de glucosa isomerasa en B. subtilis por esta metodología, así como estudiar el sistema de recombinación in vitro de B. subtilis para productos destinados al campo de alimentos.

APENDICE I:
TABLAS

TABLA 1: USOS Y PROPIEDADES DE JARABES FRUCTOSADOS Y OTROS EDULCORANTES

Substancia	Poder edulcorante	Otras propiedades
EDULCORANTES CALORICOS		
Sacarosa	1.0 *	Nutritivo. Disacárido formado por glucosa y fructosa. Su patron edulcorante se toma como punto de comparación. Es el más usado en el mundo, proveniente de la caña de azúcar y remolacha. Cariogénico. Confiere cuerpo y textura característicos. Dulzor de calidad estándar.
Azucar invertido	0.7-1.0	Jarabe proveniente de la hidrólisis de sacarosa. Usado en caramelos de centro blando.
Glucosa	0.7-0.8	Monosacárido. Obtenido de la hidrólisis completa almidón. Alta viscosidad e higroscopia, baja solubilidad, muy buen dulzor.
Fructosa	1.1-1.4	Monosacárido. Presente en frutas y verduras. Es el hidrato más dulce. Altamente higroscópico. Se vende en forma de cristales. Muy buen dulzor, alto precio.
Jarabes fructosados	1.0-1.6	Mezcla de glucosa y fructosa obtenida de la conversión enzimática de jarabes glucosados provenientes de la hidrólisis del almidón. Presentación líquida. Principal campo de aplicación es la industria refresquera; además, frutas enlatadas, mermeladas, jarabes y confitería. Propiedades similares a la sacarosa, pero difiere en cuerpo y textura impartidos.

Lactosa	0.2-0.4	Disacárido compuesto por glucosa y galactosa. Importante en acentuación de sabores, incremento de sólidos y modificación de textura.
Monelina	2500	Proteína de 11000 daltones extraída de semillas africanas. Es la molécula más dulce conocida, pero su aplicación está limitada por termolabilidad y sabor amargo posterior. Importante en estudios de fisiología del sabor.
Sorbitol	0.5	Alcohol hexahídrico soluble en agua. Uso general en alimentos dietéticos. No cariogénico. A altas concentraciones puede producir diarrea osmótica.

EDULCORANTES NO CALORICOS

Sacarina	200-700	Forma anhidrida del ácido sulfimido ortobenzoico; se sintetiza químicamente. Polvo cristalino. Residuos de sabor amargo; su seguridad ha sido cuestionada, pero ha demostrado no ser perjudicial y ha permanecido en el mercado. Uso en alimentos dietéticos y para diabéticos. Muy económico.
Ciclamatos	30-90	Síntesis química a partir del ciclohexilamino. Retirado un tiempo del mercado, ahora se usa en combinación con sacarina o aspartamo.
Aspartamo	100-120	Dipéptido formado por fenilalanina y ácido aspártico. Es solo uno de muchos péptidos que producen sabor dulce. Se sintetiza químicamente, pero se buscan técnicas de producción a partir de microorganismos. Su uso se ha extendido a partir de 1981, principalmente para alimentos dietéticos. Aplicación limitada por termolabilidad e inestabilidad a pH bajo. Prohibida para fenilcetonúricos. Caro, pero se usa en bajas cantidades.

Acesulfamo K

200

Similar a la sacarina; útil para alimentos de mesa y bebidas. Derivado del ácido acetoacético. Perceptible rápidamente, sin residuos amargos. Estable a temperatura ambiente y amplio rango de pH.

* Tomada como punto de referencia y se le asigna un valor de 1.0

Fuentes: Inglett, 1980; Bucke, 1983; Dziezak, 1986; Mermelstein, 1987

TABLA 2. MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GLUCOSA ISOMERASA

<i>Actinomyces olivocinereus</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>A. phaeochromogenes</i>	<i>N. coralia</i>
<i>Actinoplanes missouriensis</i> NRRL B3342	<i>N. dassovillei</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Paracolobactrum aerogenoides</i>
<i>A. cloacae</i>	<i>Pseudomonas hydrophila</i>
<i>A. levanicum</i> NRRL B1678	<i>Streptomyces</i> sp. S41-10
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>S. achinatus</i>
<i>Bacillus</i> sp. NRRLB5350, 5351	<i>S. achromogenes</i>
<i>B. coagulans</i> HN 68, NRRLB5649-5666	<i>S. albus</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>S. bikiniensis</i>
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>S. bodiliaei</i>
<i>Brevibacterium incertum</i>	<i>S. cinnamomensis</i>
<i>B. pentosaminoacidicum</i>	<i>S. echinatus</i>
<i>Corynebacterium incertum</i>	<i>S. flavogrisseus</i>
<i>Curtobacterium helvolum</i>	<i>S. flavovirens</i>
<i>Escherichia freundii</i>	<i>S. fradiae</i>
<i>E. intermedia</i>	<i>S. galbus</i>
<i>Flavobacterium arborescens</i>	<i>S. glauscescens</i>
<i>F. devorans</i>	<i>S. gracitus</i>
<i>Lactobacillus</i> sp. D-80	<i>S. grisseolus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>S. grisseus</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>S. hivers</i>
<i>L. fermenti</i>	<i>S. matens</i>
<i>L. gayoni</i>	<i>S. nivens</i>
<i>L. licopersici</i>	<i>S. olivaceus</i>
<i>L. mannipoeus</i>	<i>S. olivochromogenes</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>S. phaeochromogenes</i>
<i>Microbispora rosea</i>	<i>S. platensis</i>
<i>Microelllobospora flavea</i>	<i>S. venezuelae</i>
<i>Micromonospora coerulea</i>	<i>S. wedmorensis</i>
<i>Mycrobacterium</i> sp. 279	<i>Streptosporangium album</i>
	<i>S. outgare</i>

Fuente: Chen, 1980.

TABLA 3: PROPIEDADES DE ALGUNAS ISOMERASAS PROVENIENTES DE DIVERSOS MICROORGANISMOS.

<u>Característica</u>	<u>L. brevis</u> (1)	<u>S. phaeochromogenes</u> (2)	<u>A. missouriensis</u> (3)	<u>B. coagulans</u> (4)
pH óptimo	6.0-6.5	9.3-9.5	7.0	8.0-8.5
Temperatura óptima	45 °C	90 °C con Co 50 °C sin Co	90 °C	60 °C
Requerimientos de metales	Mn	Mg y Co	Mg	Mn
K_m D-xilosa	0.005 M			0.011 M
D-glucosa	0.920 M	0.300 M	1.330 M	0.090 M
D-fructosa			1.670 M	0.083 M
Termoestabilidad		60 °C-80 °C		40 °C-80 °C
Peso molecular	191 000 d		80 000 d	167 000 d

Fuente: 1) Yamanaka, 1969; 2) Tsumura, 1965; 3) Gong, 1980; 4) Danno, 1970.

TABLA 4: PLASMIDOS DE B. subtilis.

Origen	Nombre	Marcadores	Observaciones	Referencias
1. Especies capaces de replicarse en <u>B. subtilis</u>				
<u>S. aureus</u>	pC 194	Cm	oligocopia, 1.8 Md	Iordanescu, 1977.
	pE 194	Em	oligocopia, 2.3 Md	Iordanescu, 1977.
	pUB 110	Km	multicopia, 3.0 Md	Keggins, 1978.
<u>Streptococcus</u>	pAM 77	Em	4.5 Md	Workman, 1986.
<u>B. pumilus</u>	pPL 10	Bacteriocina	inserción al genoma	Lovett, 1976.
<u>B. cereus</u>	pCW 7	Cm	2.8 Md	Wilson, 1978.
2. Plásmidos híbridos con dos marcadores.				
	pBD 64	Km, Cm	híbrido pC 194-pUB 110; selección por inactivación insertional; 3.2 Md	Gryczan, 1980.
	pBD 8	Km, Cm, Sm	híbrido pSA 2100 y pUE 110; 6.0 Md	Gryczan, 1978.
3. Plásmidos que permiten selección positiva.				
	pBD 214	Cm, thy	confiere fenotipo Tmp ^r a cepas receptoras thy ⁻	Gryczan, 1982.

Cromosomal B. licheniformis pS 105 Km, trpC 5.4 Md Keggins, 1978. ⁹⁰
 pUB 110

4. Plásmidos bifuncionales entre varias especies de Bacillus.

pTB 90 Km, Tc B. subtilis-B. stearothermophilus Imanaka, 1983.

5. Plásmidos bifuncionales E. coli-B. subtilis.

pHV 33 Cm En E. coli se expresan también Ap y Tc. Rapoport, 1979.
 Híbrido pC 194-pBR 322

pMK 4 Cm, Ap, lacZ Híbrido pUC 9-pC 194 Sullivan, 1984.
 Permite secuenciar fragmentos.

pCED. 2 lacZ-tms Contiene promotor lac que se expresa en E. coli y tms proveniente de B. subtilis. Donnelly 1982.

TABLA 5. EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE PLASMIDOS USADOS EN E. coli.

Tipo	Ejemplo	Referencia
I. Inactivación insercional sin selección directa para plásmidos recombinantes.	pBR 322 pBR 328 pBR 329 pUC 8 pACYC 184	Bolívar, 1977 Soberón, 1980 Covarrubias, 1982 Vieira, 1982 Chang, 1978
II. Inactivación insercional con selección positiva para plásmidos recombinantes	pLV 59 pHE 3	O'Connor, 1982 Hennecke, 1982
III. Vectores de reemplazo con selección positiva de recombinantes	pGJ 153	Hagan, 1982
IV. Vectores de amplio rango, Gram ⁻	pK 1230	Bagdasarian, 1981
V. Vectores de expresión	pKT 100	Talmadge, 1980
VI. Vectores para clonación de promotores	pPV 33	West, 1982
VII. Vectores para clonación de secuencias de terminación	pKL 1	Honigman, 1981

Clasificación tomada de Rodríguez y Tait, 1983.

TABLA 6: DIFERENTES PROTEINAS CLONADAS EN B. subtilis

Proteina	Origen	Referencia
Cloranfenicol acetil transferasa	<u>S. aureus</u>	Ehrlich, 1977
alfa amilasa	<u>B. amyloliquefaciens</u>	Palva, 1982
antigeno de fiebre aftosa	virus fiebre aftosa	Hardy, 1981
antigeno de hepatitis B	virus hepatitis B	Hardy, 1981
penicilinasa	<u>E. coli</u>	Palva, 1982
penicilinasa	<u>Bacillus</u> sp.	Oliver Lampen, 1982
interferón alfa	humano	Palva, 1983
urogastrona	humano	Flock, 1984
genes <u>his G</u>	<u>E. coli</u>	Ferreti, 1984
alfa amilasa	<u>B. licheniformis</u>	Joyet, 19844
<u>rec A</u>	<u>P. mirabilis</u>	Eitner Monke, 1986
estreptocinasa	<u>Streptococcus equisimilis</u>	Klessen, 1986

TABLA 7: DIFERENTES PROTEINAS CLONADAS EN E. coli

Proteina	Origen	Referencia
endoglicosidasa H	<u>Streptomyces</u>	Robbins, 1981
resistencia a neomicina	<u>S. fradiae</u>	Rodgers, 1982
tirosil tARN sintetasa	<u>B. stearothermophilus</u>	Barker, 1982
antigeno hepatitis B	virus hepatitis B	Valenzuela, 1982
xilanasa	<u>B. pumilus</u>	Panbengred, 1983
B-glucanasa	<u>B. subtilis</u>	Cantwell, 1983
celulasa	<u>Clostridium thermocellum</u>	Cornet, 1983
gene 2 del fago O 29	<u>B. subtilis</u>	Blanco, 1984
xilanasa	<u>B. polymyxa</u>	Sandhu, 1984
alfa amilasa	<u>B. licheniformis</u>	Joyet, 1984
xilosa isomerasa	<u>E. coli</u>	Lawliss, 1984
B-glucosidasa	<u>Kluveromyces fragilis</u>	Raynal, 1984
biosintesis de fenilalanina	<u>Corynebacterium glutamicum</u>	Ozaki, 1985
celulasa	<u>Bacillus sp.</u>	Park, 1986

TABLA 8: PROPIEDADES DE GLUCOSA ISOMERASA DE ESPECIES CONSIDERADAS EN ESTE TRABAJO

Característica	<u>B. subtilis</u>	<u>B. coagulans</u>	<u>E. coli</u> K802
Actividad promedio	300 nmoles glucosa min ⁻¹ mg proteína ⁻¹	420 nmoles glucosa min ⁻¹ mg proteína ⁻¹	22 nmoles glucosa min ⁻¹ mg proteína ⁻¹
Temperatura óptima	60 °C	60 °C	50 °C
pH óptimo	7.6	8.0	6.8
K _m glucosa	0.78 M	0.50 M	-
K _m fructosa	1.04 M	0.14 M	-
K _m xilosa	0.21 M	1.00 M	-
Inducción	xilosa 0.5%	xilosa 0.1%	xilosa 1%
Represión por glucosa	presenta	presenta	presenta
Temperatura de crecimiento	37 °C	45 °C	37 °C
Localización	intracelular 100%	intracelular 100%	intracelular 100%
Requerimiento de ruptura	no	no	si
Termoestabilidad	pierde 60% tras incubar a 60 °C	retiene actividad tras incubar a 60 °C	labil
CoCl ₂	0.006 M	0.006 M	0.100 M
MgSO ₄	0.060 M	0.060 M	0.100 M

TABLA 9: EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE XILOSA Y GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE GLUCOSA ISOMERASA POR B. subtilis 168.

D-xilosa (%)	Actividad (nmoles de D-glucosa por min por mg de proteina)
0.00	0
0.10	311
0.25	358
0.50	372
1.00	272
2.50	201
0.00 + D-glucosa 0.20%	0
0.30 + D-glucosa 0.20%	16

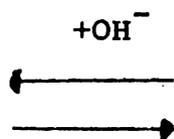
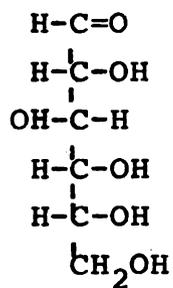
TABLA 10: ASPECTO DE CEPAS DE *B. subtilis* EN DIFERENTES MEDIOS CON INDICADOR Y CON XILOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

Medio	<u>B. subtilis</u> 168	<u>B. subtilis</u> IA 422	<u>B. subtilis</u> BT
Peptona 1% NaCl 0.05% xilosa 4% rojo neutro 0.04%	roja	blancuzca	rosada
Peptona 1% NaCl 0.05% xilosa 4% púrpura de bromo cresol 0.004% pH 7.0	amarilla	azul	amarillenta

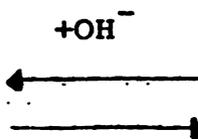
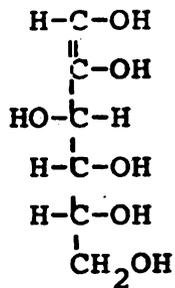
Nota: Con concentraciones menores de xilosa no se pudieron detectar respuestas que permitieran diferenciar las cepas.

APENDICE II:
FIGURAS

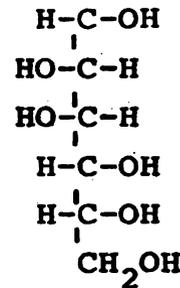
D-glucosa



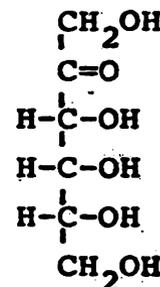
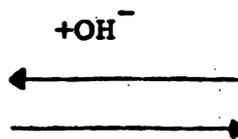
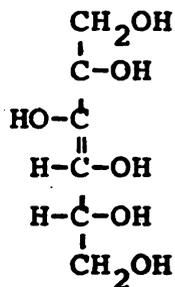
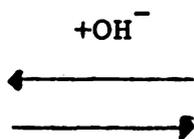
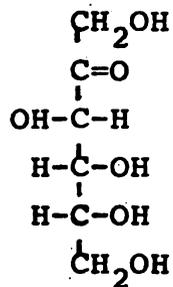
Ene Diol 1-2



D-manosa



Glucosa
isomerasa



D-fructosa

Ene Diol 2-3

D-psicosa

FIGURA 1: DIAGRAMA DE CONVERSIONES DE GLUCOSA A FRUCTOSA
Fuente: Hamilton, 1974.

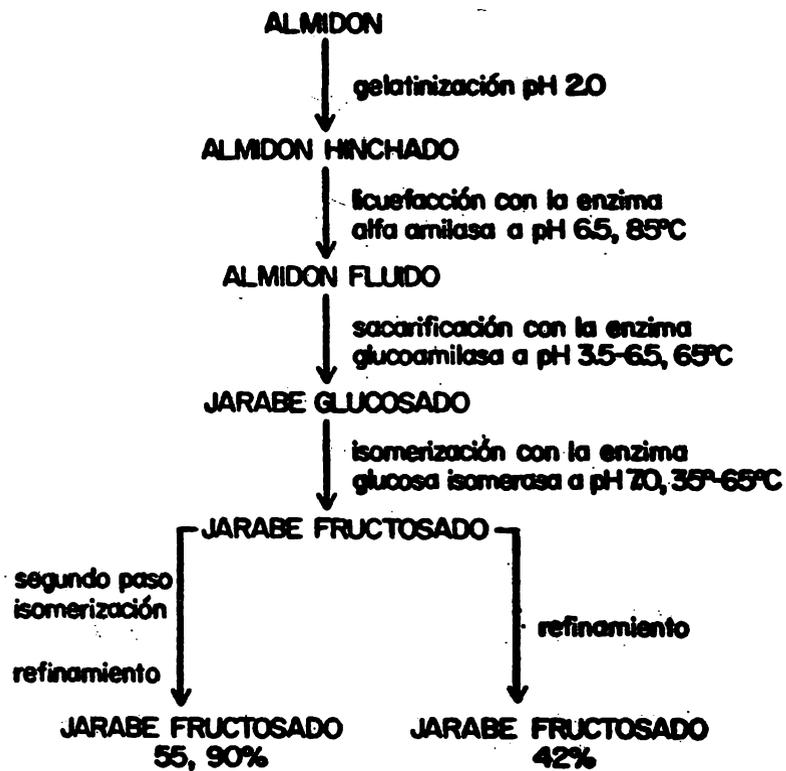


FIGURA 2: DIAGRAMA DE ELABORACION DE LOS JARABES FRUCTOSADOS
Fuente: Bucke, 1981.

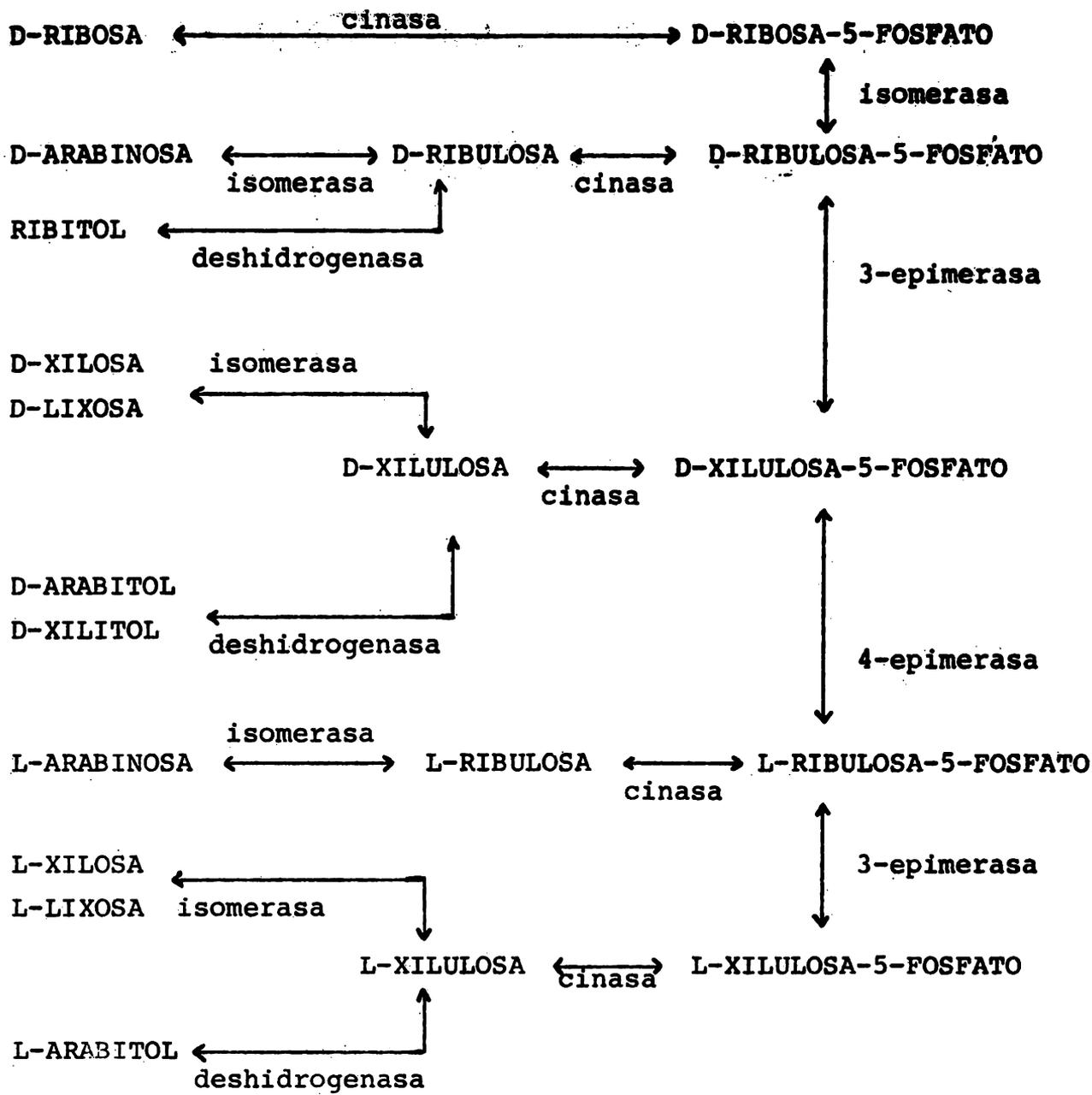
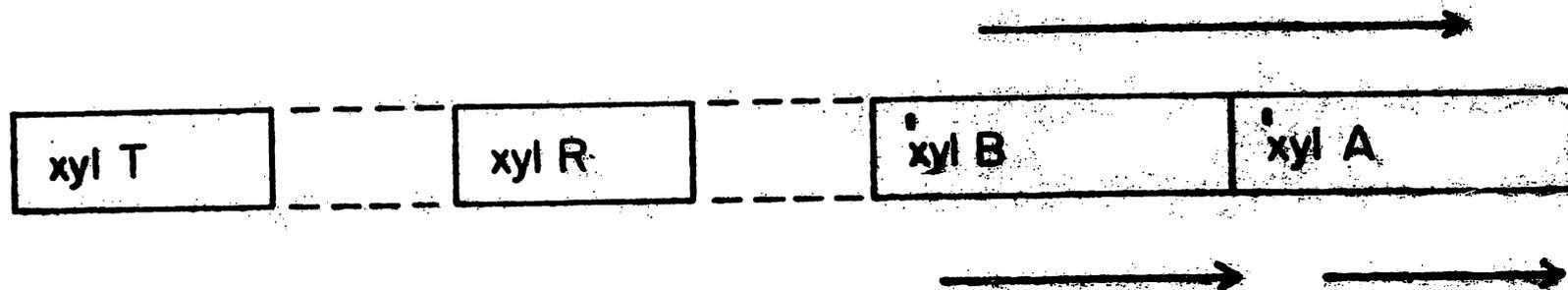


FIGURA 3: METABOLISMO DE PENTOSAS Y PENTITOLES
Fuente: Mortlock y Wood, 1964.



- xyl A- gene estructural de xilosa isomerasa
- xyl B- gene estructural de xilulosa kinasa
- xyl T- elemento genético involucrado en el transporte de xilosa
- xyl R- elemento genético regulador
- promotor
- dirección de la transcripción

FIGURA 4: OPERON DE XILOSA EN E. coli. El diagrama está construido con información proveniente de Maleszka, 1982 y de Ho, 1983. No está establecida plenamente la relación entre xylT y xylR con los genes estructural y de cinasa. Existe la certeza de la presencia de dos promotores, pero cabe la posibilidad de que en un momento dado puedan transcribirse como una sola unidad.

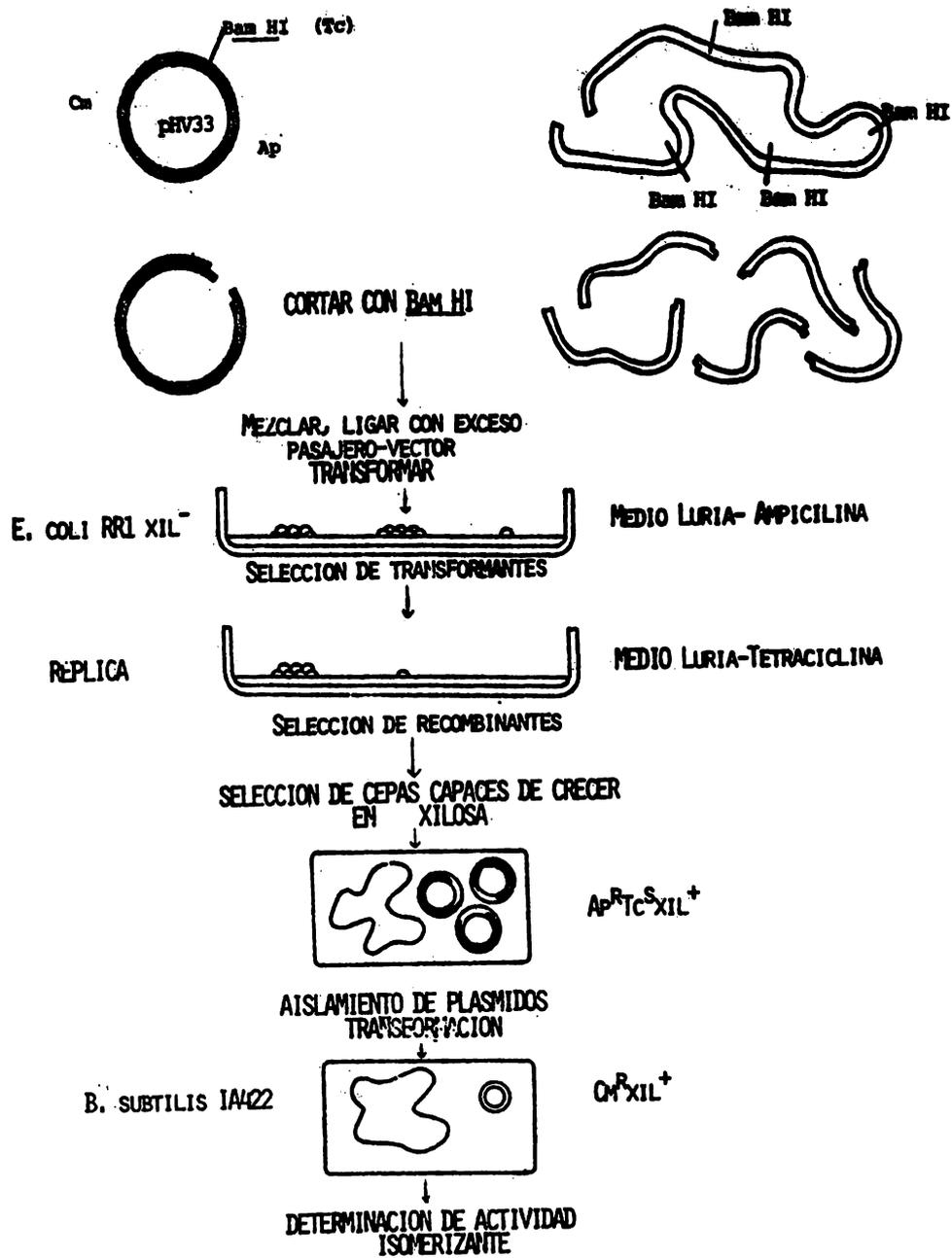
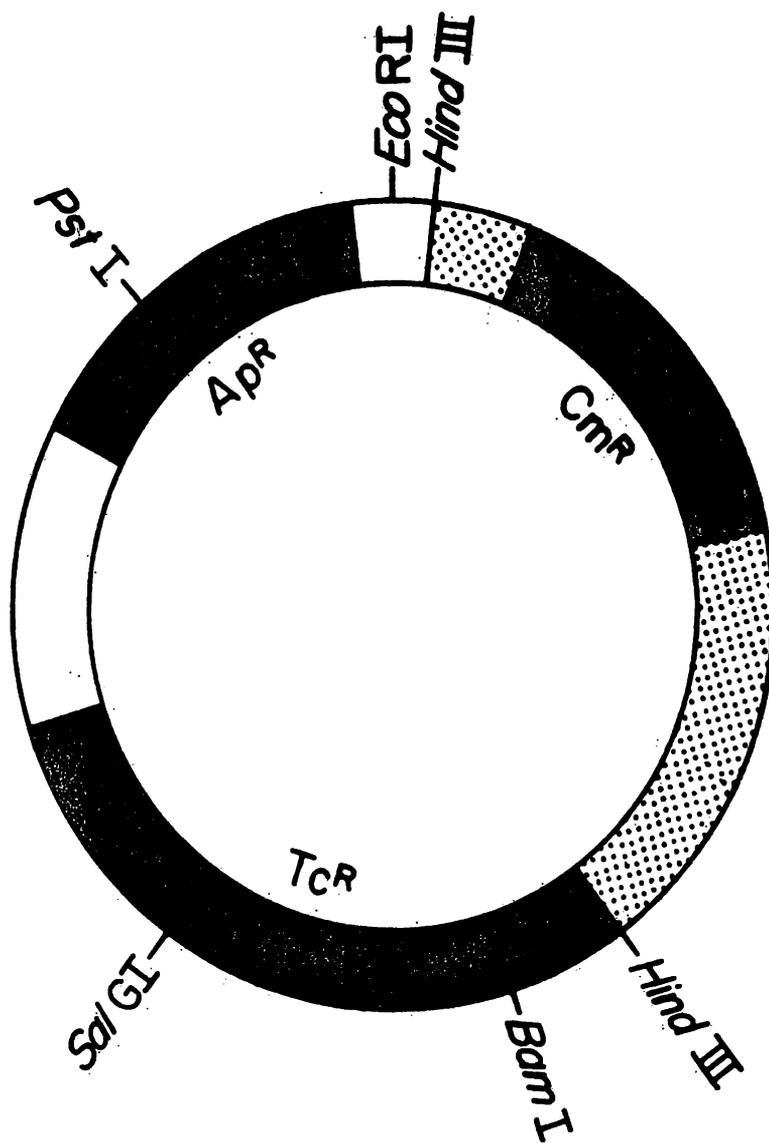


FIGURA 5: ESTRATEGIA GENERAL DE ESTE TRABAJO



pHV33
(4.6 Mdal)

FIGURA 6: PLASMIDO pHV 33
Fuente: Old. 1981

Holoenzima	-35	-10
Sigma		
<i>Bacillus subtilis</i>		
43 (1)	TTGACA	TATAAT
37 (2)	AGGATTNA	GGAATTNTTT
32 (3)	AAATC	TANTGNTTNTA
29 (4)	TTNAA	CATATT
<i>Escherichia coli</i>		
70 (5)	TTGACA	TATAAT

Fuente: 1) Shiroza, 1985 2) Doi, 1986 3) Youngman, 1985
4) Doi, 1986b 5) Rosenberg, 1979

FIGURA 7: SECUENCIAS CONSENSO DE PROMOTORES REPORTADOS.

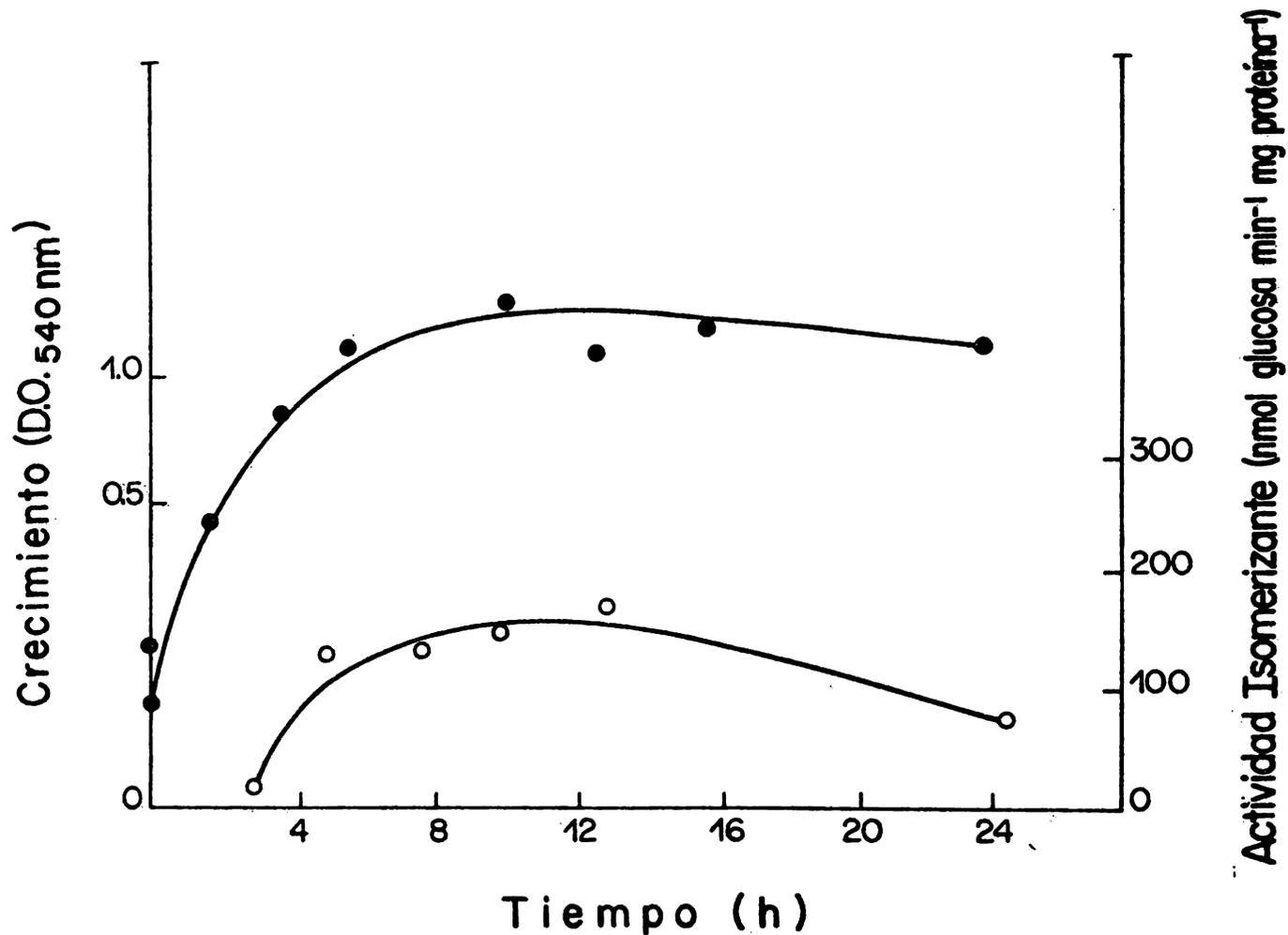


FIGURA 11: Crecimiento (•) y actividad isomerizante (◦) de *B. subtilis* 168. El microorganismo fue cultivado en medio de Luria con xilosa al 0.5% y se presentan los valores a diferentes tiempos de fermentación.

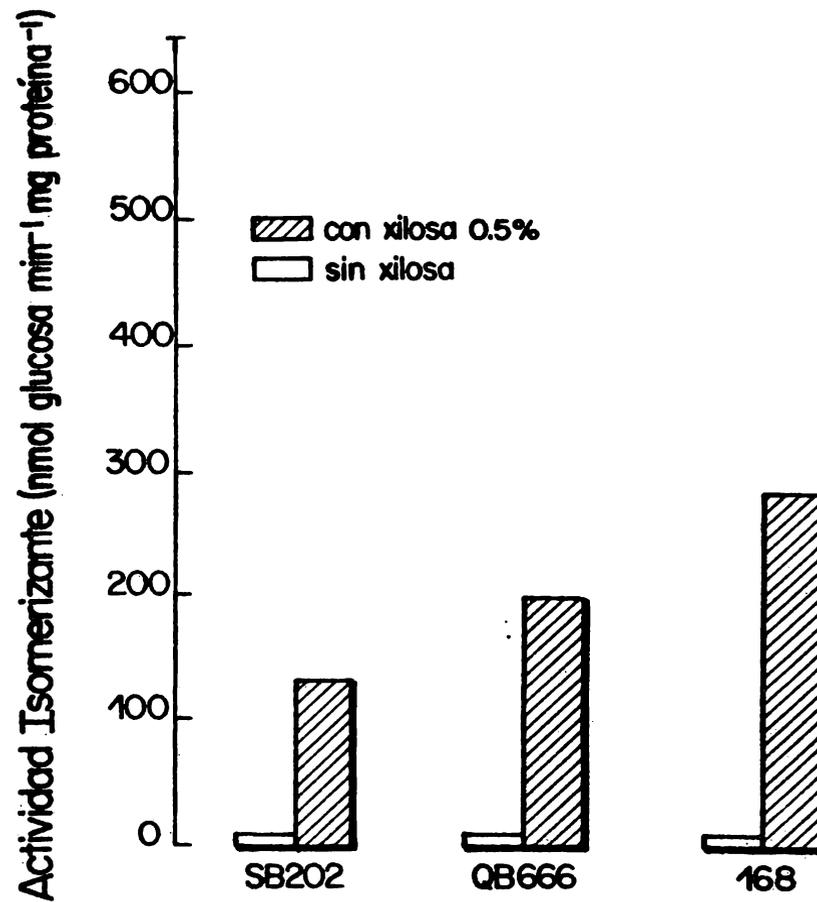


FIGURA 12: Actividad isomerizante de tres cepas de *B. subtilis* en las que se buscó inicialmente la actividad. Las células se cultivaron en medio de Luria, en presencia y en ausencia de inductor. Tras 16 horas de fermentación se determinó la actividad sobre fructosa, según lo señalado en materiales y métodos.

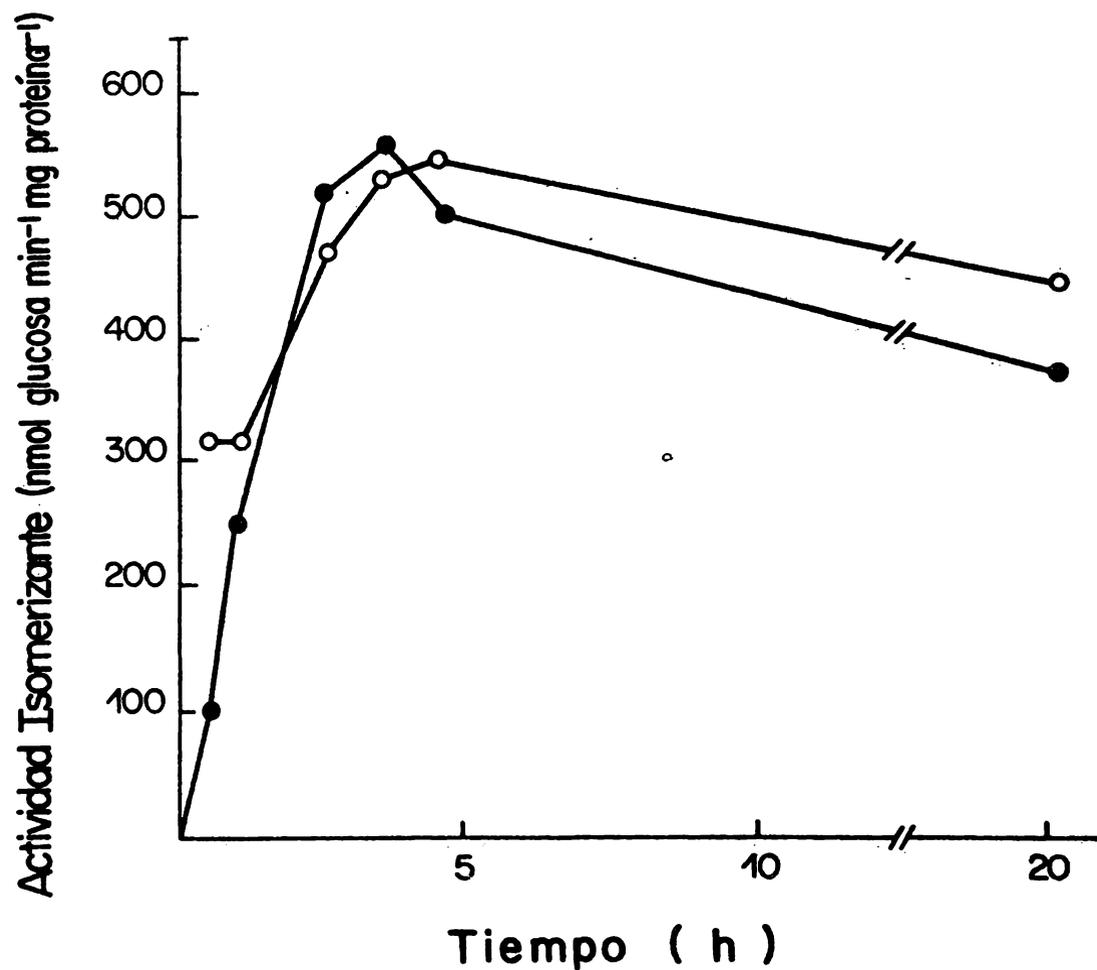


FIGURA 13: Curva de progreso de la reacción de isomerización catalizada por células rotas (●) y células enteras (○) de *B. subtilis* 168, previa fermentación por 18 horas en medio de Luria con xilosa al 0.5%.

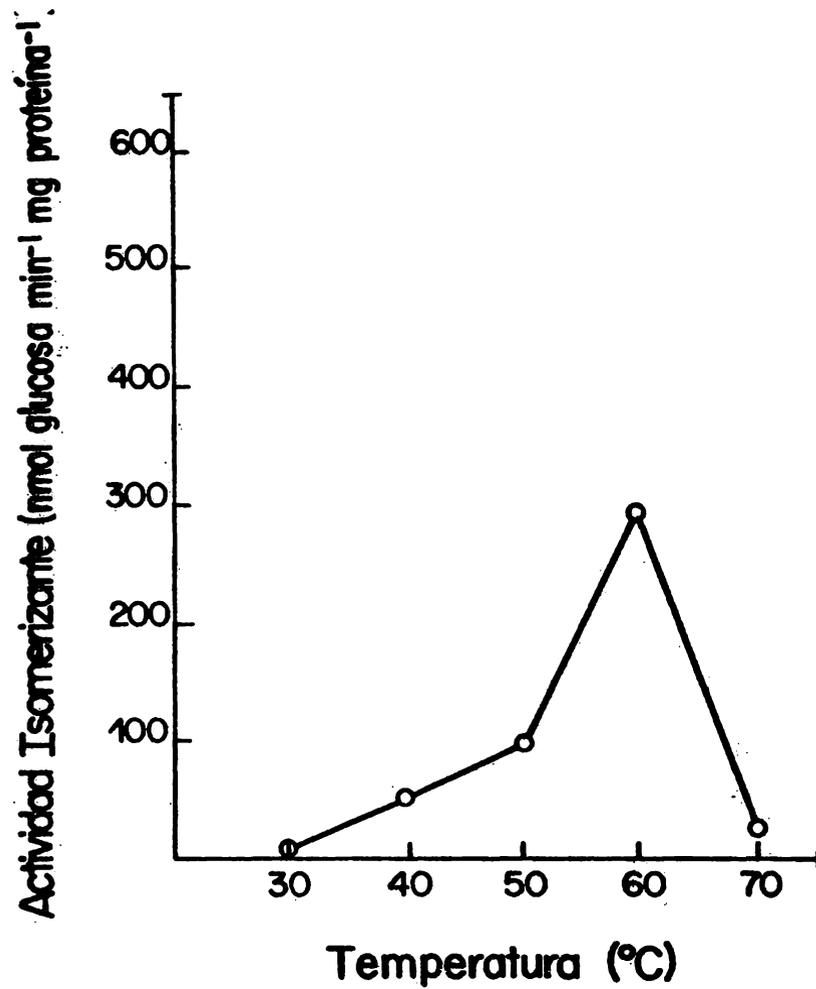


FIGURA 14: Actividad isomerizante presentada a diferentes temperaturas de reacción por células enteras de *B. subtilis* 168.

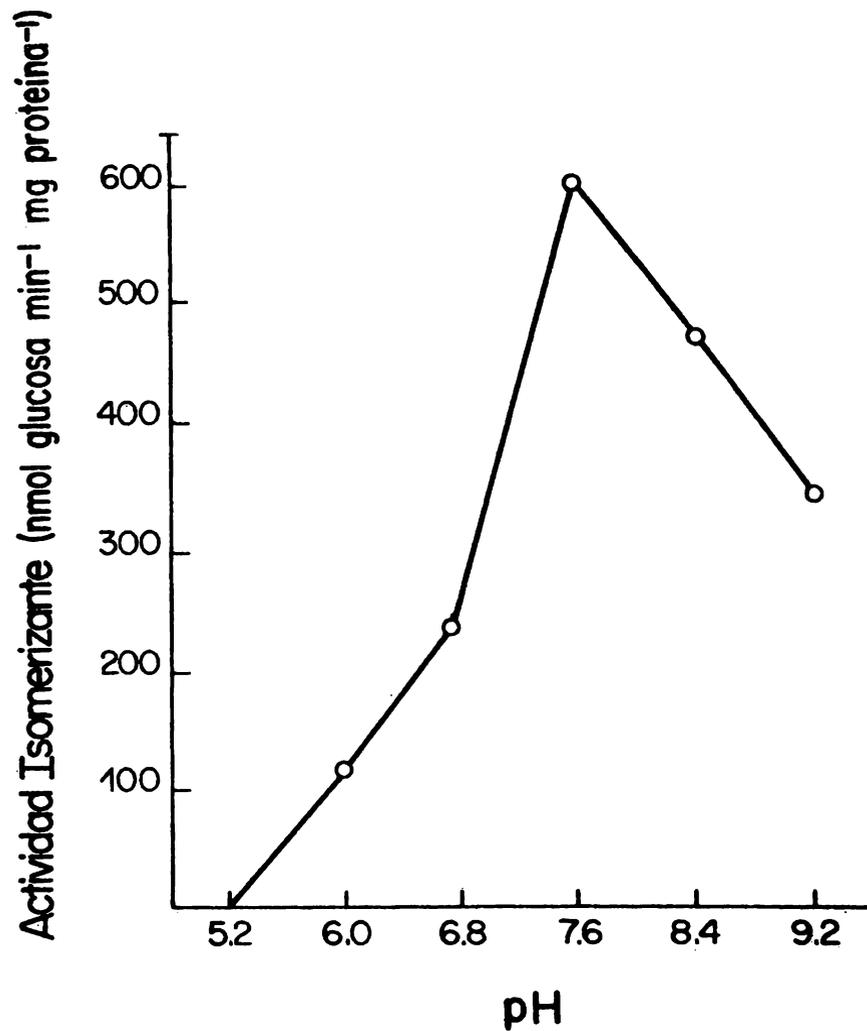


FIGURA 15: Actividad isomerizante a diferentes pH iniciales de reacción por células enteras de *B. subtilis* 168. La solución amortiguadora se preparó con ácido maleico 0.2 M.



FIGURA 17: Actividad isomerizante hacia diferentes concentraciones de glucosa presentada por células enteras de *B. subtilis* 168. La actividad fue determinada por el método de cisteína-carbazol.

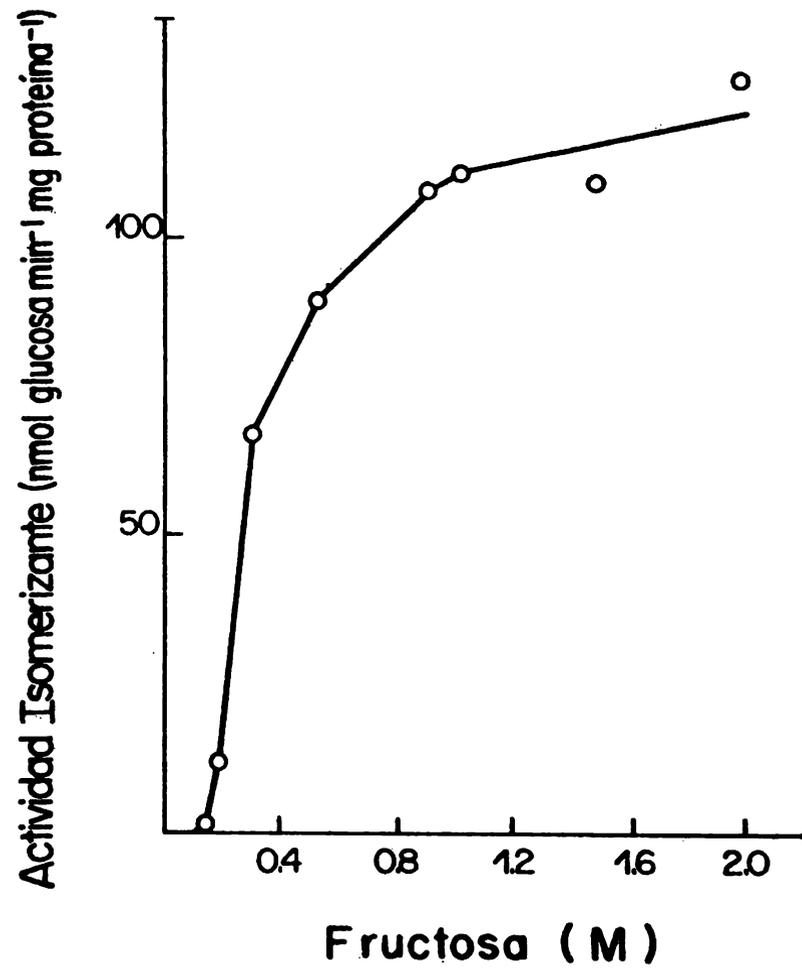


FIGURA 18. Actividad isomerizante hacia diferentes concentraciones de fructosa.

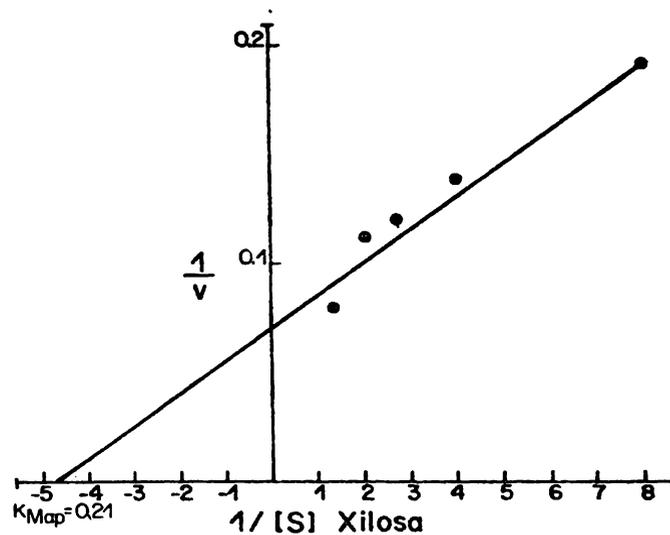
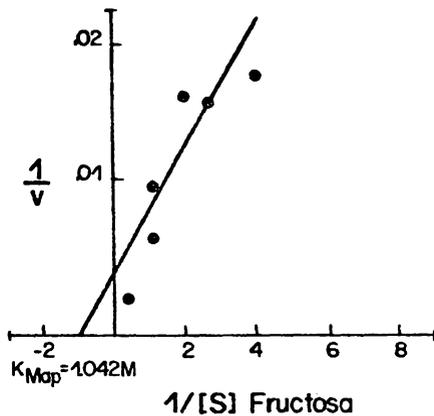
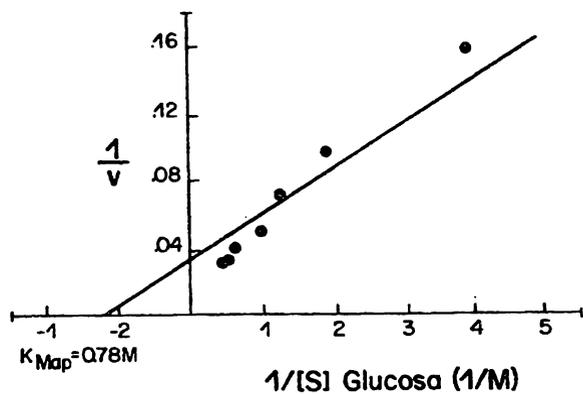


FIGURA 19: Linearizaciones de Lineweaver-Burke para determinar afinidad por glucosa, fructosa y xilosa. Se presentan las rectas ajustadas por el método de mínimos cuadrados.

por

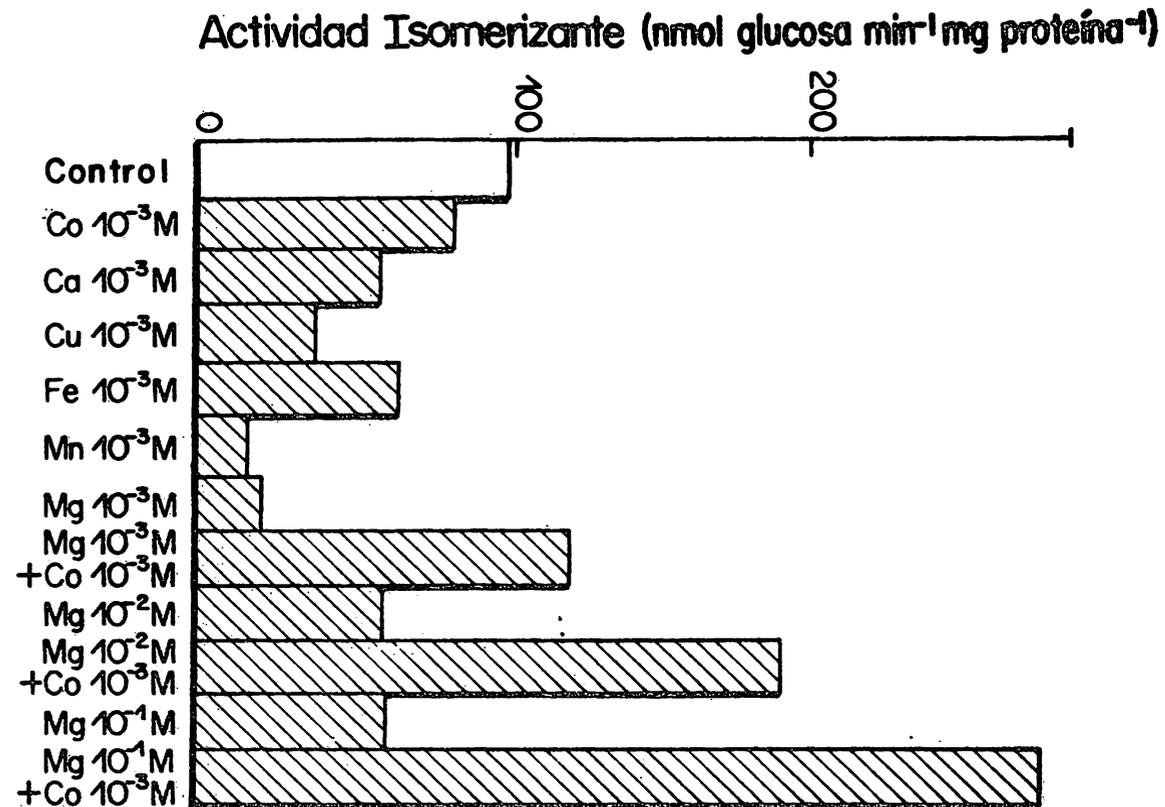


FIGURA 20: Patrón de activación por iones para un extracto de células de *B. subtilis* 168 dializado por 24 horas contra amortiguador de maleatos 0.2 M. Las sales normales fueron sustituidas por las indicadas.

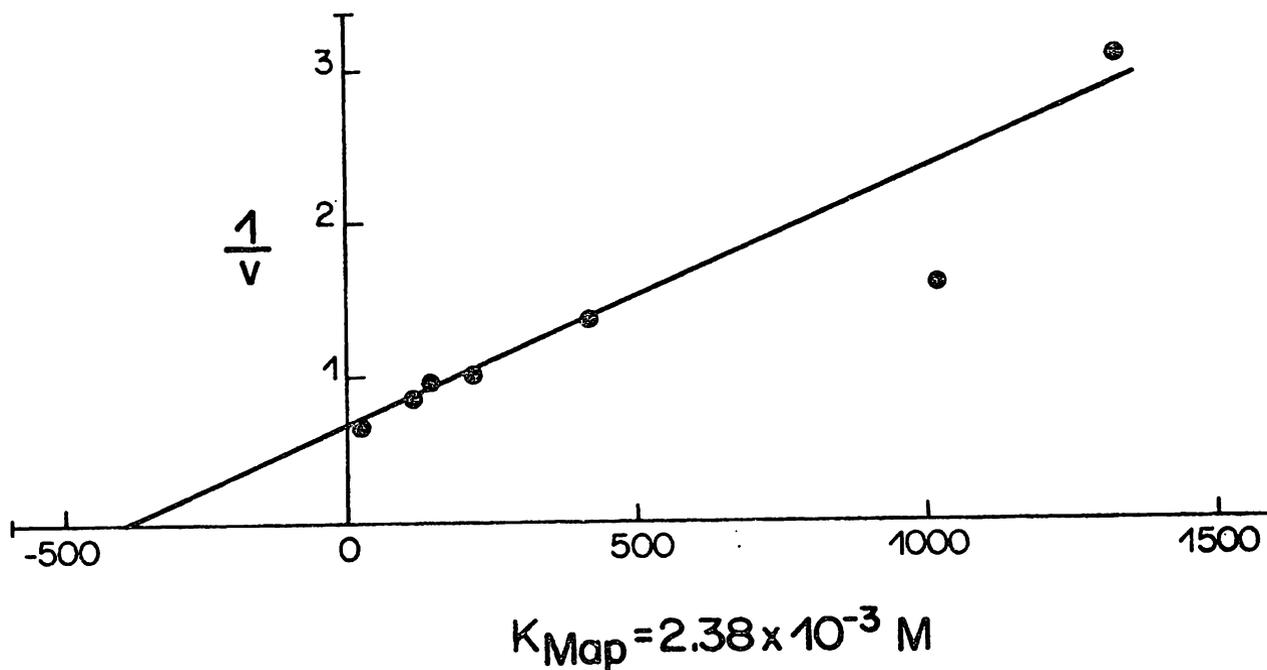


FIGURA 21: Afinidad hacia el ión cobalto. Se siguió el procedimiento descrito en la fig. 20 y se analizó el comportamiento de este ión por la importancia asignada al mismo por otros autores. Las sales normales fueron sustituidas por las concentraciones indicadas de CoCl_2 . Se presenta la curva de Lineweaver Burke ajustada por mínimos cuadrados.

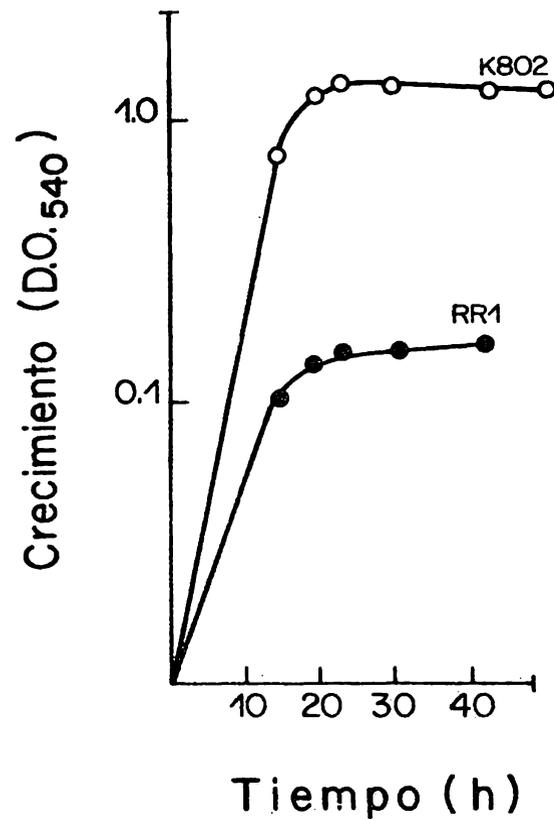


FIGURA 22: Curva de crecimiento en medio mínimo M9 con xilosa 0.5%, provisto con los requerimientos de cada una de las cepas. El polímero RR1 se usa como cepa receptora y K802 es una cepa control que presenta actividad isomerizante.

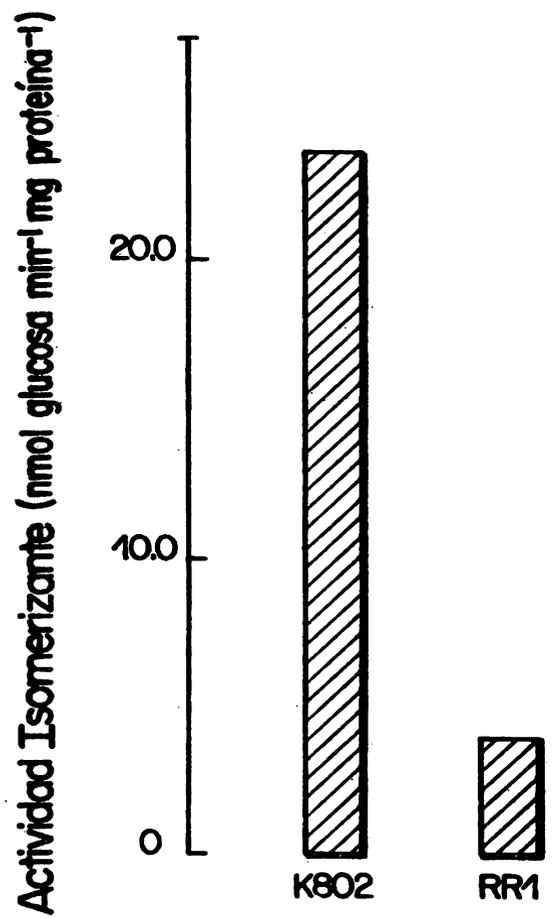


FIGURA 23: Actividad específica isomerizante de E. coli RR1, incapaz de crecer en xilosa y de K802, capaz de hacerlo.

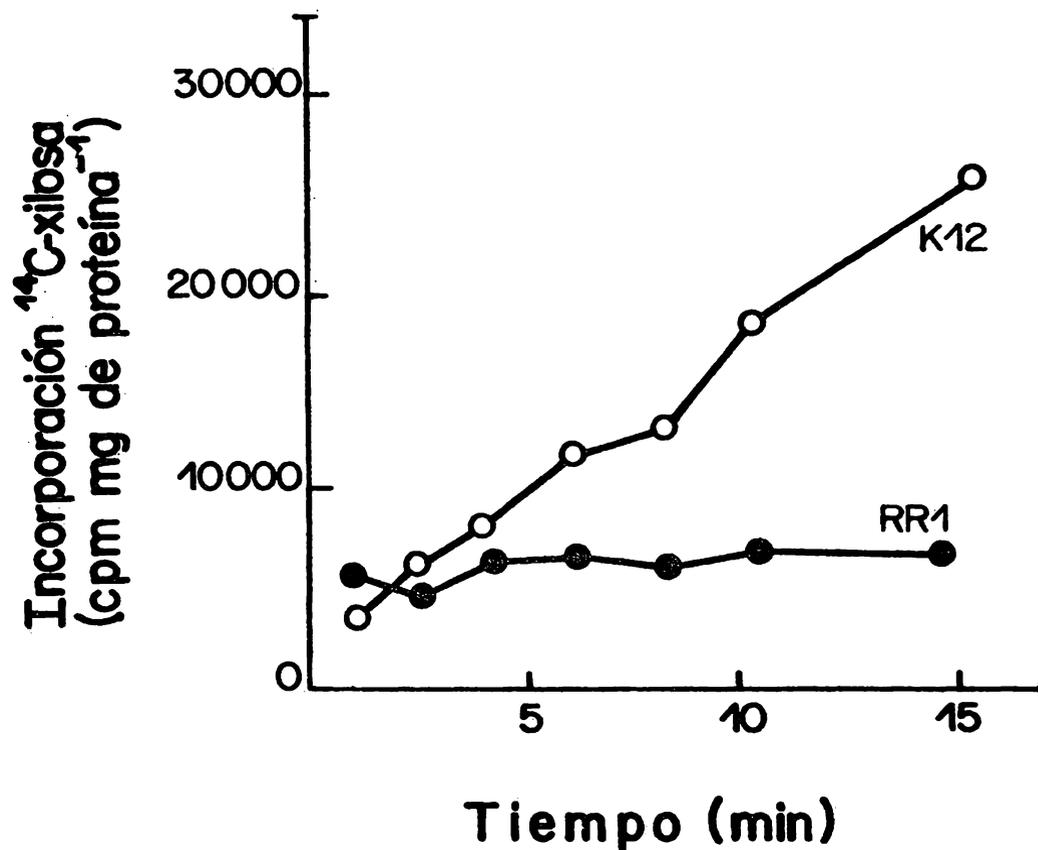
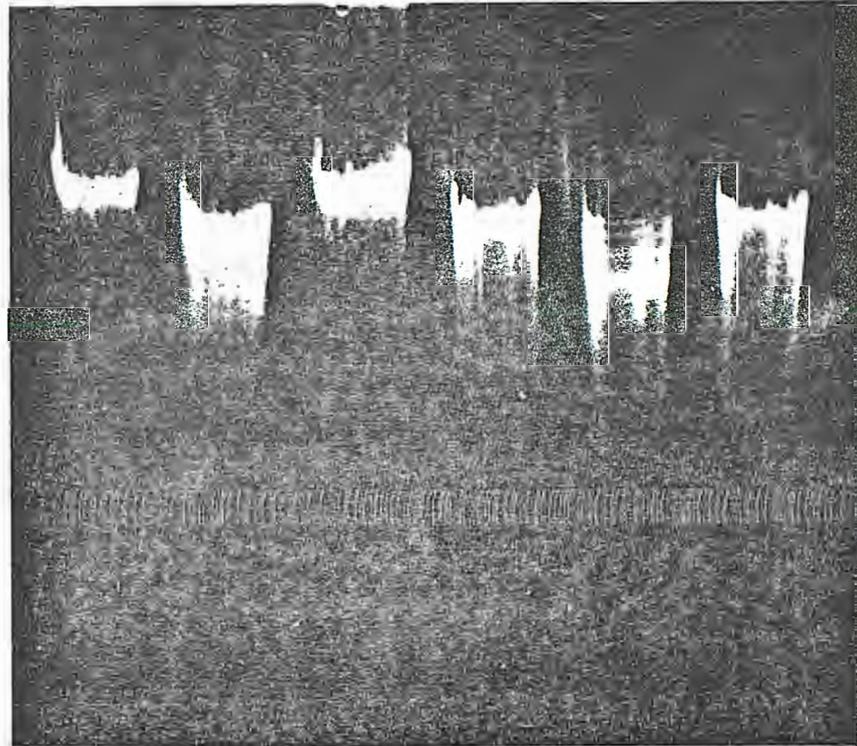


FIGURA 24: Incorporación de xilosa ^{14}C por dos cepas de *E. coli*, una silvestre (K12) capaz de crecer en xilosa como fuente de carbono, y la mutante RR1 que se usará como receptora. El experimento se realizó según se describe en Material y Métodos.



1 2 3 4 5 6

FIGURA 25: Integridad del ADN cromosomal de B. subtilis 168 obtenido por el método de Rodriguez y Tait, 1983 (1). En los siguientes carriles se muestra la sensibilidad a las enzimas de restricción Bam HI (2), Eco RI (3), Pst I (4), Pal I (5) y Hae III (6). En todos los casos 1 μ g de ADN se incubó con 1 μ l de enzima y 1 μ l del amortiguador 10X recomendado por el fabricante. La incubación se llevó a cabo durante 24 h a 37 °C. El caso de Eco RI se explica por mala calidad del lote enzima utilizado, pues con otros no hubo problema.

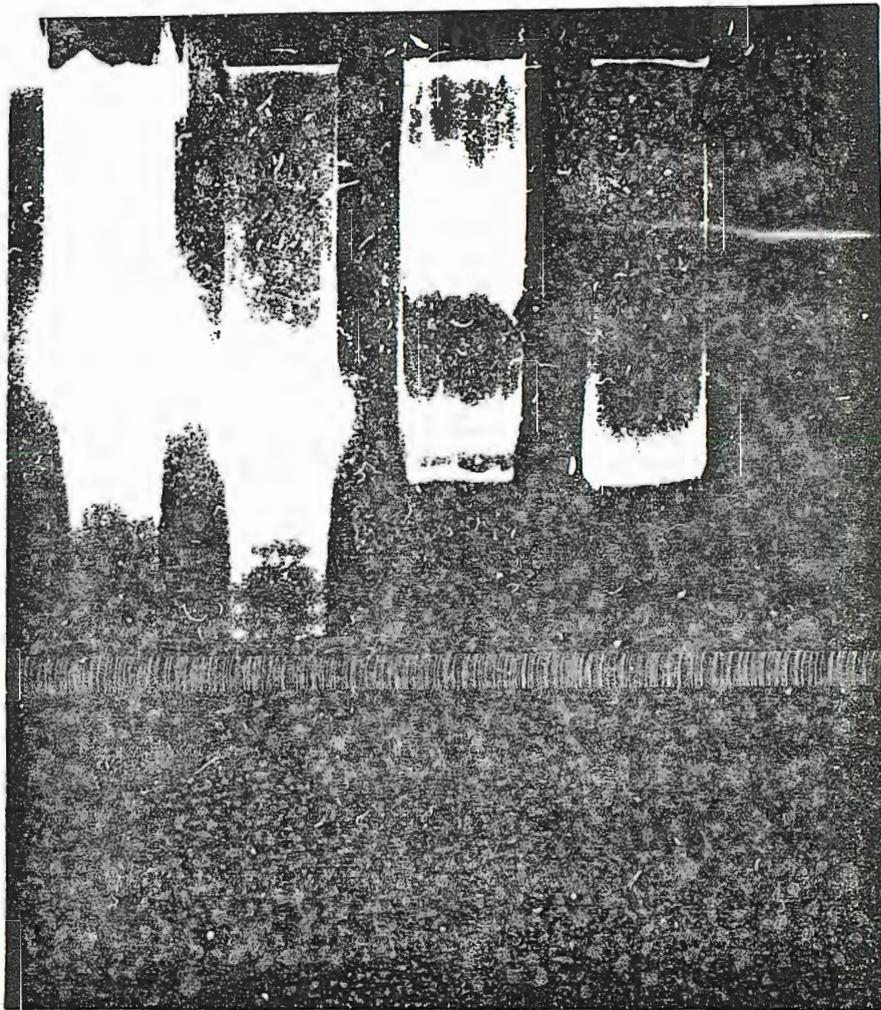


FIGURA 26: ADN cromosomal de B. subtilis 168 sin digerir (1) y digerido con la enzima de restricción Bam HI (2) en condiciones similares a la fig. 25. En seguida se muestra el plásmido pHV 33 sin digerir (3) y digerido con la misma enzima (4). El material proveniente de estas digestiones fue usado para ligarse y para la posterior transformación de E. coli RR1.

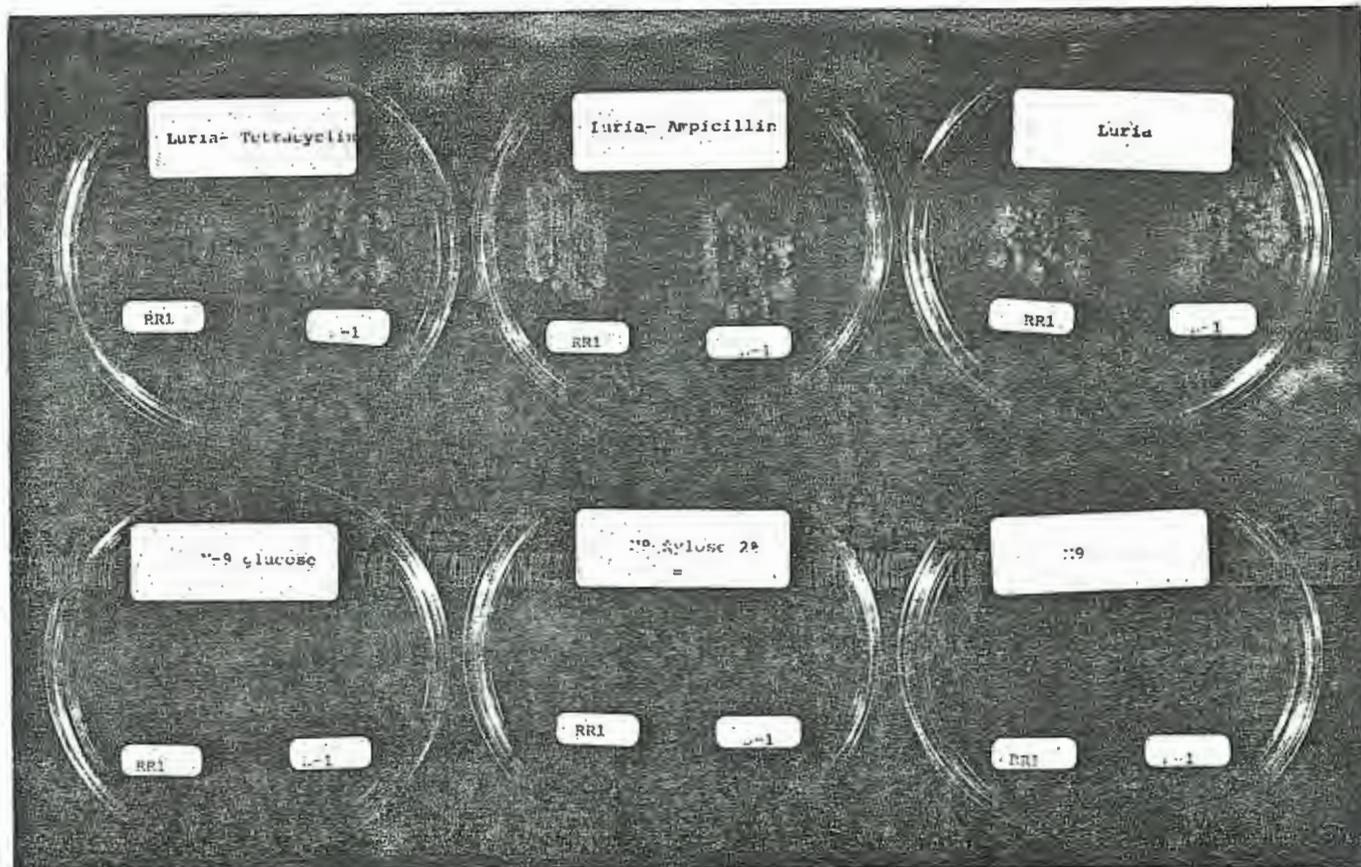


FIGURA 27: Fenotipo de la cepa recombinante B-1 obtenida tras la transformación de E. coli RR1. Se muestra comparado con la cepa receptora. Se empleó medio de Luria solo y con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Ampicilina o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina. El medio M9 se usó sin fuente de carbono, con glucosa 0.5% y xilosa 2.0%, además de los requerimientos de la cepa.

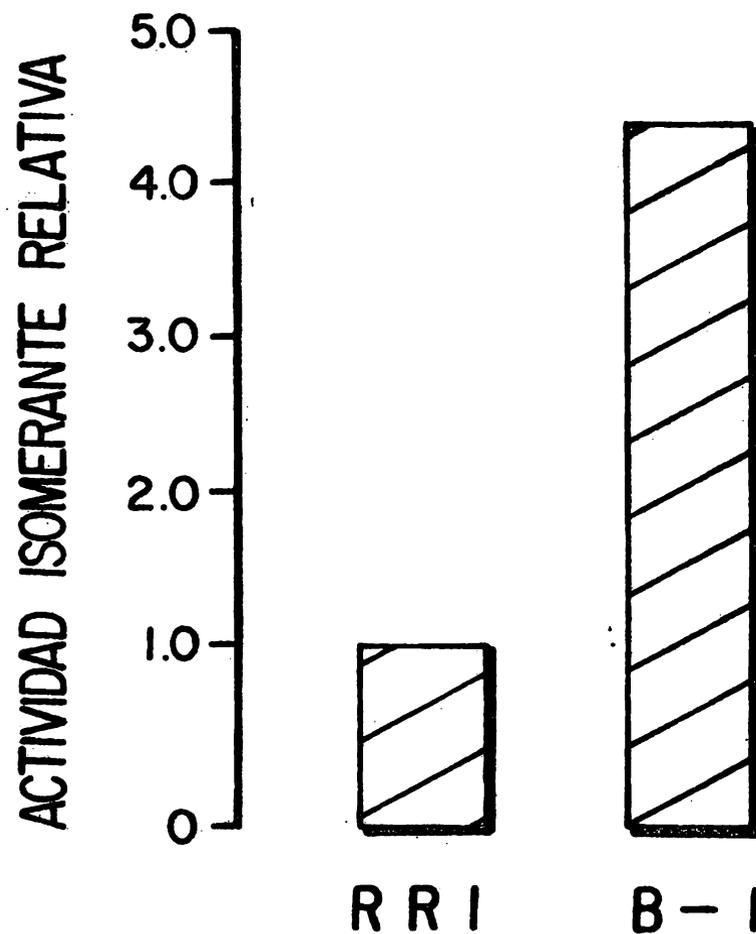


FIGURA 28: Actividad isomerizante relativa de E. coli RR1 y de la cepa recombinante B-1 obtenida de la unión del pHV 33 y del ADN cromosomal de B. subtilis 168. La actividad sobre fructosa se determinó a un extracto celular, proveniente de un cultivo en medio de Luria, con xilosa 1.0% como inductor. Las condiciones de determinación de actividad fueron pH 6.8, y 50 °C.

Actividad específica isomerizante
(nmoles glucosa mg proteína⁻¹ min⁻¹)

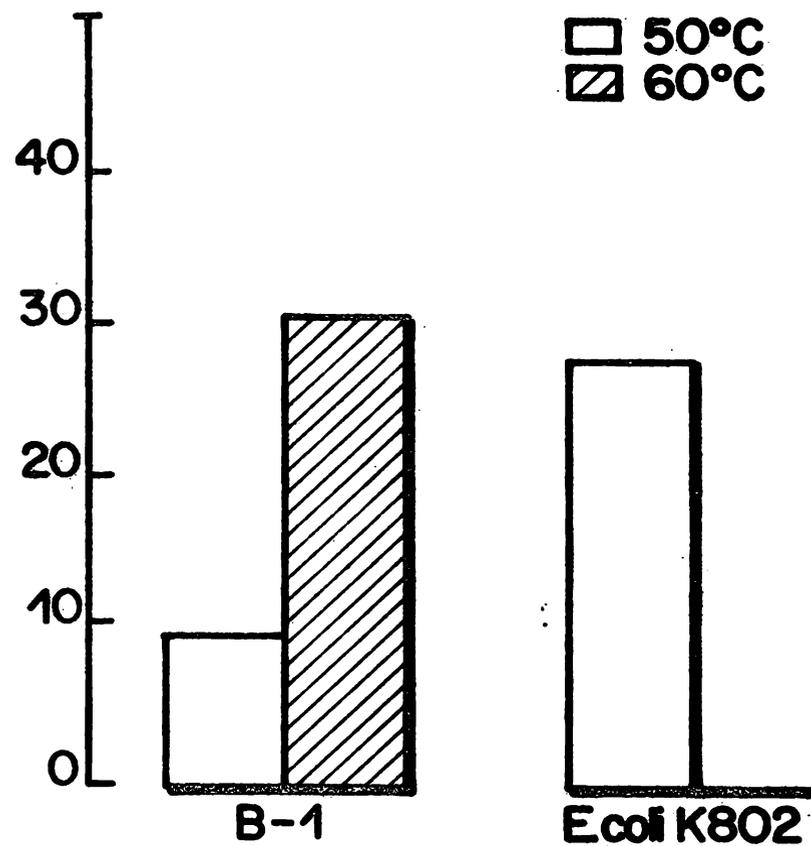


FIGURA 30: Actividad isomerizante a 50°C y 60 °C de las cepas recombinante B1 y la usada como referencia, E. coli K802.

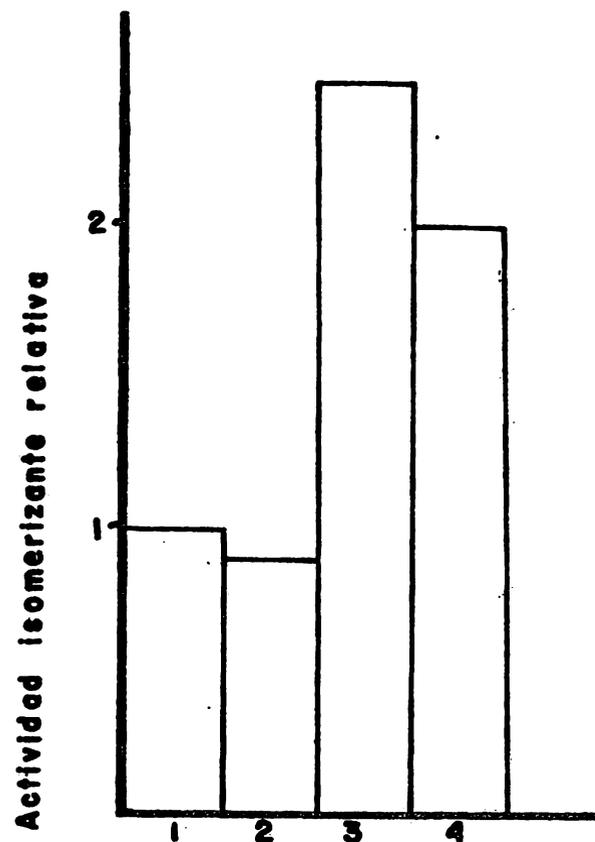


FIGURA 31: Actividad isomerizante relativa de E. coli B-1 en ausencia y en presencia de ampicilina a diversas concentraciones. A la actividad mostrada en ausencia del antibiótico se le dio un valor de 1.0 (1). Se compara con los valores obtenidos en presencia de 100 µg/ml (2), 200 µg/ml (3) y 500 µg/ml (4) de ampicilina (Sigma). La actividad se determinó en las condiciones indicadas para E. coli.

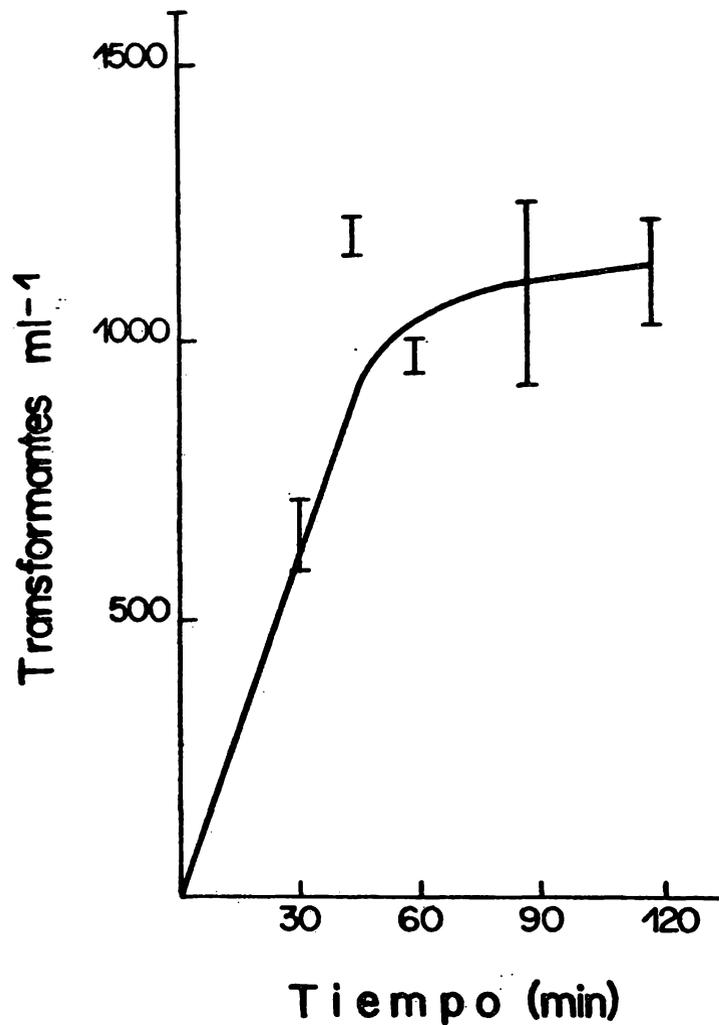


FIGURA 32: Células transformantes en un mililitro de sistema, obtenidas en función de tiempo de incubación, siguiendo el método de Dubnau (1971) como lo describen Rodriguez y Tait (1983). Se utilizaron 2 μ g de pUB 110 y la selección se llevó a cabo en medio de Luria con 7.5 μ g de kanamicina por mililitro. Posteriormente se demostró que la eficiencia de transformación de pHV 33 y pUB 110 son comparables.

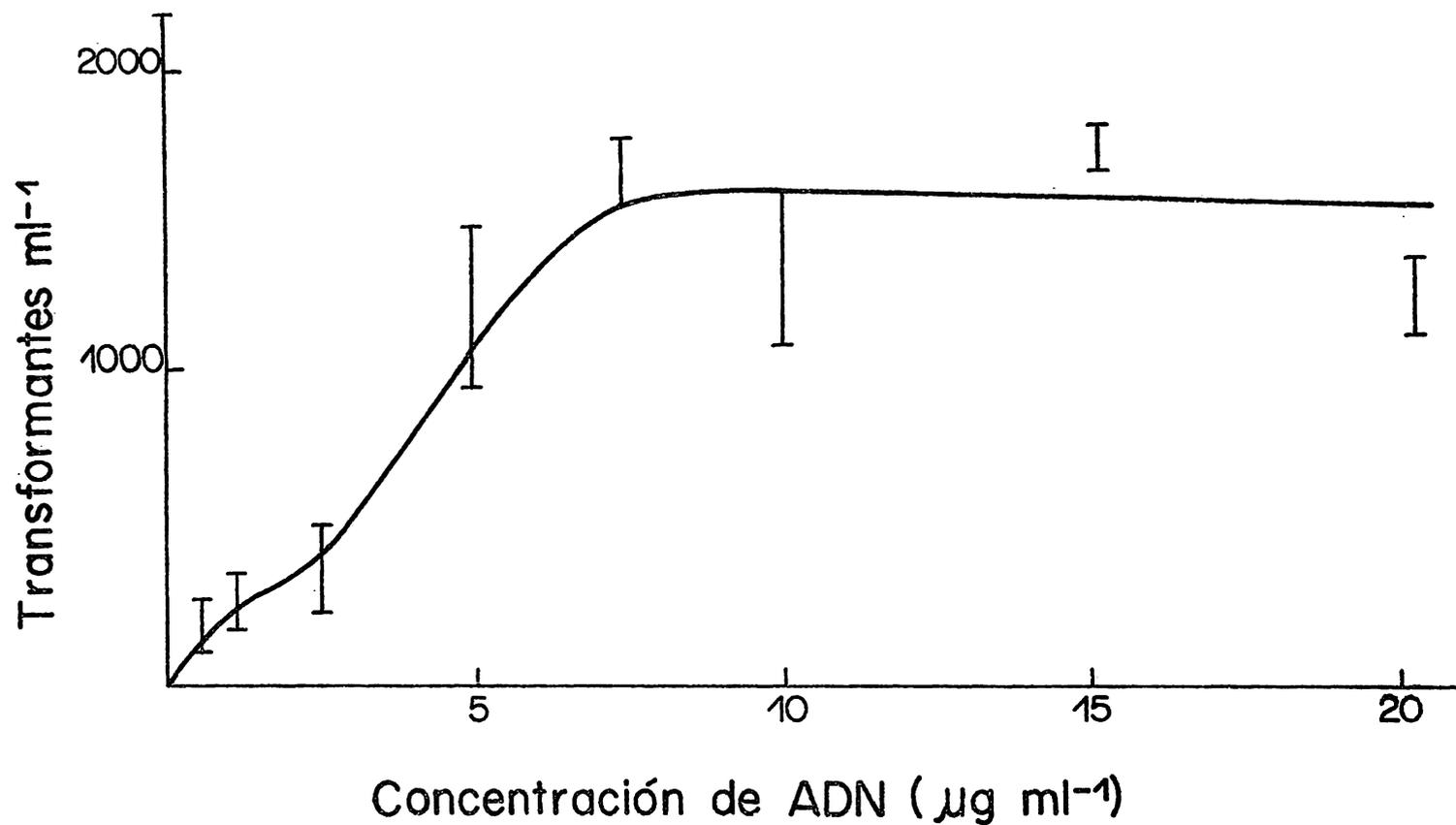


FIGURA 33: Células transformantes en un mililitro de sistema, obtenidas en función de la concentración de ADN, en condiciones similares a las indicadas al pie de la figura 32. El tiempo de incubación fue de 30 min.

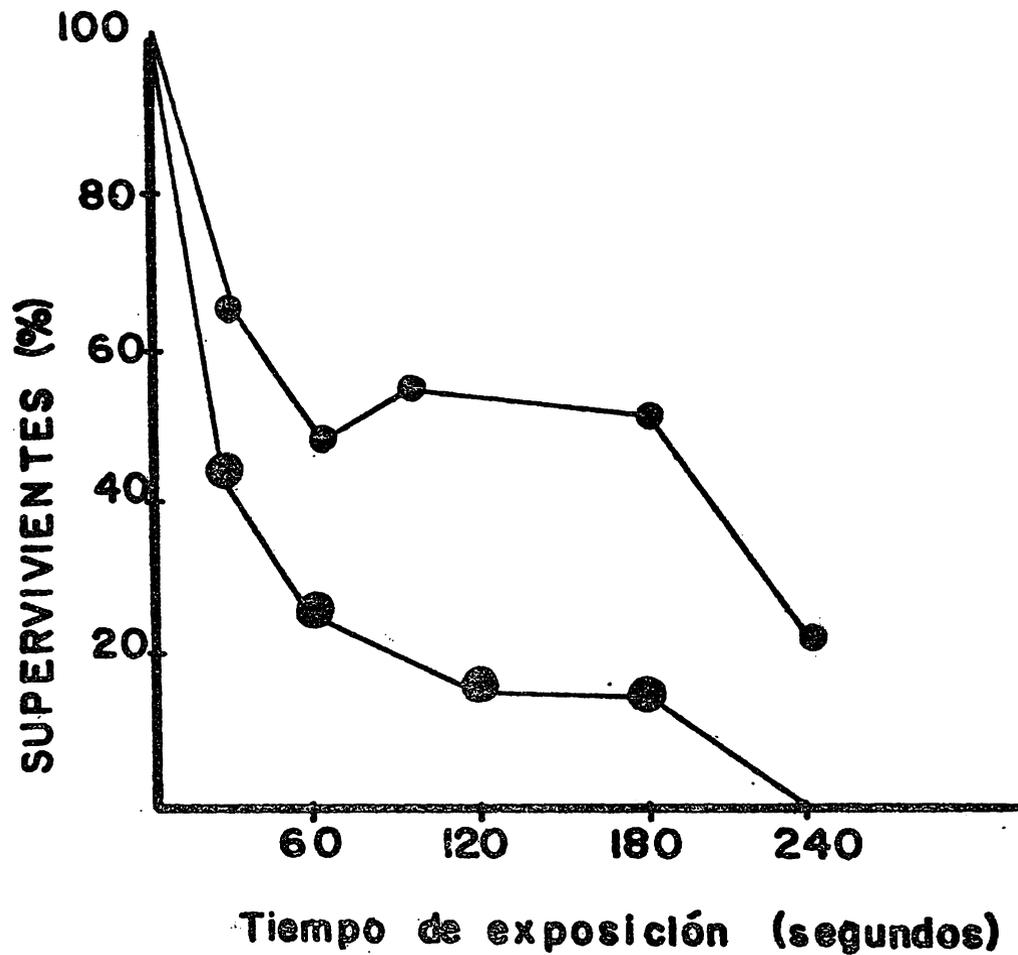


FIGURA 34: Demostración de la presencia de la mutación *recE4* en la cepa de *B. subtilis* IA 422 (◐). Se indican los porcentajes de supervivientes obtenidos tras diferentes tiempos de exposición a luz ultravioleta de onda corta, según se describe en material y métodos. Se presenta el comportamiento de *B. subtilis* 168 (●) como referencia.

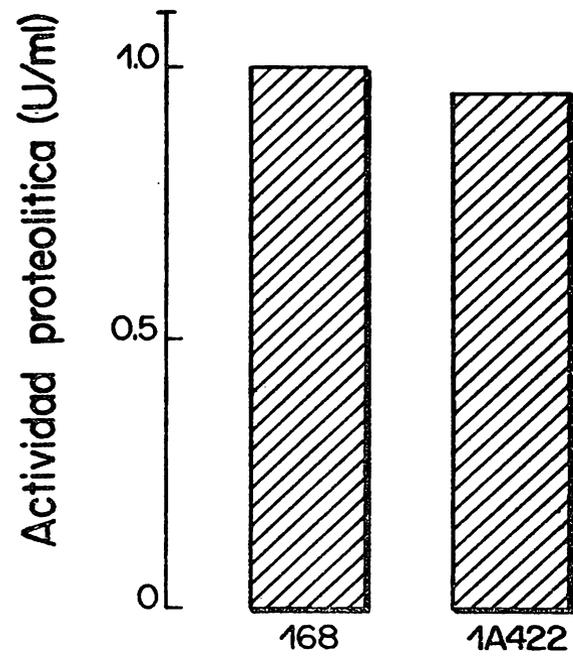


FIGURA 35: Actividad proteolítica presentada por B. subtilis IA 422 y B. subtilis 168.

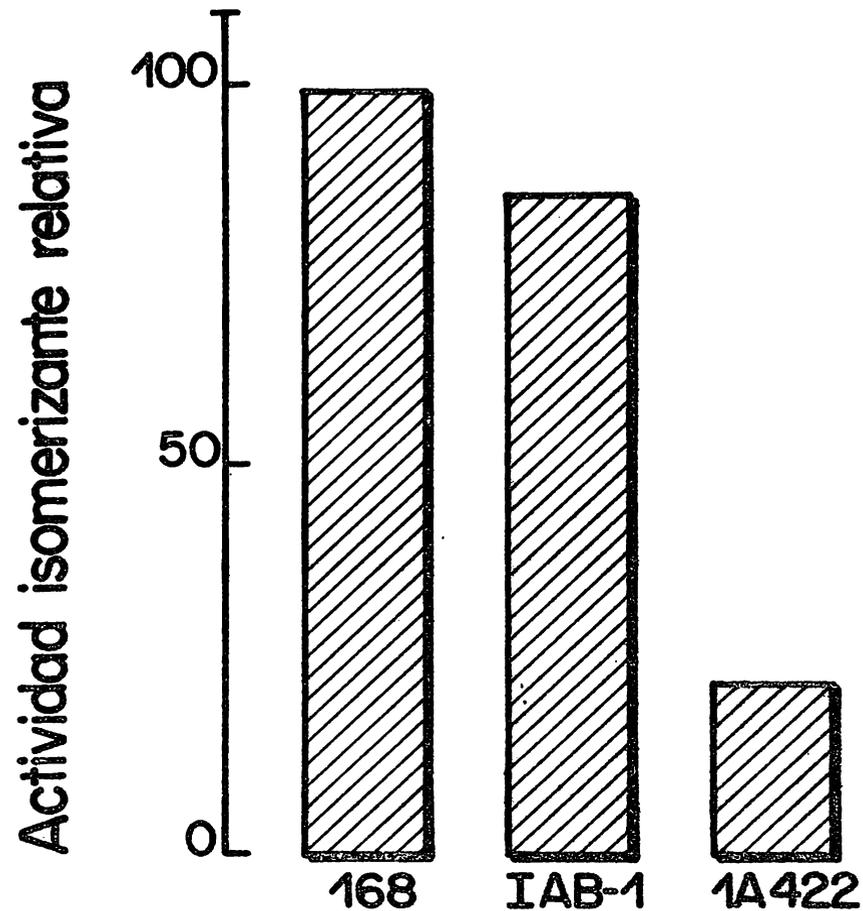


FIGURA 36: Actividad isomerizante en relación al valor presentado por B. subtilis 168, de B. subtilis IA 422. Se muestra también el valor presentado por la cepa IAB-1, obtenida tras transformar a B. subtilis IA 422 con el plásmido recombinante purificado de E. coli B1. La actividad basal presentada por IA 422 le permite crecimiento en medio mínimo con xilosa.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Alexander, N.J., 1986. Genetic manipulation of yeasts for ethanol production from xylose. *Food Technol.* 41(10); 99-103.
- 2) Ambulos, N.P., Chow, J.H., Mongolsuk, L.H., Preis, L.H., Vollmar, W.R. y Lovett, P.S., 1984. Constitutive variants of the pC 194 cat gene exhibit DNA alterations in the vicinity of the ribosome binding site sequence. *Gene* 28;171-176.
- 3) Aubert, E., Fargette, F., Fouet, A., Klier, A. y Rapoport, G. 1982. Use of a bifunctional cosmid for cloning large DNA fragments of B. subtilis. En: Ganesan, A.T., Chang, S. y Hoch, J. (Eds.). *Molecular cloning and gene regulation in Bacilli*. Academic Press, Nueva York; 11-24.
- 4) Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J. y Timmis, K., 1981. Specific purpose cloning vectors II. Broad host range, high copy number RS101 derived vectors and a host vector system for cloning in Pseudomonas. *Gene* 16;237-247.
- 5) Band, L. y Henner, D.J., 1984. B. subtilis requires a stringent Shine Delgarno region for gene expression. *DNA* 3;17-21.
- 6) Barker, G., 1984. Cloning and amplified expression of the tyrosyl tRNA synthetase genes of B. stearothermophilus and E. coli. *Eur. J. Biochem.* 125;357-360.
- 7) Bernier, P., Driguez, H. y Desrochers, M., 1983. Molecular cloning of B. subtilis xylanase gene in E. coli. *Gene* 26;59-65.
- 8) Bibb, M.J. y Cohen, S.N., 1982. Gene expression in Streptomyces: construction and application of promoter probe plasmids in S. lividans. *Mol. Gen. Genet.* 187;265-277.
- 9) Blanco, L., Garcia, J.A. y Salas, M., 1984. Cloning and expression for the protein primed initiation of the B. subtilis phage ϕ 29 DNA replication. *Gene* 29;33-40.
- 10) Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechl, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H., Furlong, L., Grunwald, D., Kiefer, D., Moore, D., Sheldon, E. y Smithies, O., 1977. Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science* 196;161-169.

- 11) Blumenthal, R.M., 1986. E. coli can restrict methylated DNA and may skew genetic libraries Trends Biotechnol. 4;302-304.
- 12) Bolívar, F., Rodríguez, R., Betlach, M. y Boyer, H., 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene 2;75-93.
- 13) Bron, S. y Luxen, E., 1985. Segregational instability of pUB 110 derived recombinant plasmids in B. subtilis. Plasmid 14;235-244.
- 14) Brosius, J., 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. Gene 27;151-160.
- 15) Bucke, C., 1981. Enzymes in fructose manufacture. En: Birch, G., Blakebrough, N. y Parker, K. (Eds.). Enzymes in food processing. Applied Science Publishers, Londres; 51-72
- 16) Bucke, C., 1983. There is more to sweeteners than sweetness. Trends Biotechnol. 1;67-69.
- 17) Burke, W. y Spizizen, J., 1977. Isolation, characterization and activation of the Mg dependent endodeoxyribonuclease from B. subtilis. Biochemistry 16;403-410.
- 18) Calva, E., 1987. Comunicación personal.
- 19) Canosi, V., Morelli, G. y Trautner, T.A., 1978. The relationship between molecular structure and transformation efficiency of some S. aureus plasmids isolated from B. subtilis. Mol. Gen. Genet. 166; 259-267.
- 20) Cantwell, B.A. y McConnell, D.J., 1983. Molecular cloning and gene expression of a B. subtilis B-glucanase gene in E. coli. Gene 23;211-219.
- 21) Chang, A. y Cohen, S.N., 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134;1141-1156.
- 22) Chang, A. y Cohen, S.N., 1979. High frequency transformation of B. subtilis protoplasts by plasmid DNA. Mol. Gen. Genet. 168;111-115.

- 23) Chen, W.P., Anderson, A.W. y Han, Y.W., 1979. Production of glucose isomerase by S. flavogriseus. Appl. Environ. Microbiol. 37;324-331.
- 24) Chen, W.P., 1980. Glucose isomerase: a review. Process Biochem. 15;30-41.
- 25) Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. y Hsu, C.L., 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of E. coli by R factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69;2110-2114.
- 26) Coker, L. y Venkatasubramanian, K., 1985. High fructose corn syrup. En: Cheremisinoff, P.M., y Ouellette, R.P., (Eds.) Bio technology: application and research. Technomic Publishers. Lancaster; 165-177.
- 27) Contente, S. y Dubnau, D., 1979. Characterization of plasmid transformation in B. subtilis: kinetic properties and the effect of DNA conformation. Mol. Gen. Genet. 167;251-258.
- 28) Contente, S. y Dubnau, D., 1979b. Marker rescue transformation by linear plasmid DNA in B. subtilis. Plasmid 2;555-571.
- 29) Cornelis, P., Digneffe, C. y Willemot, K., 1982. Cloning and expression of a B. coagulans amylase gene in E. coli. Mol. Gen. Genet. 186;507-511.
- 30) Cornet, P., Millet, J., Béguin, P. y Aubert, J.P., 1983. Characterization of two cel (cellulose degradation) genes of Clostridium thermocellum coding for endoglucanases. Bio/Technology 1; 589-594.
- 31) Covarrubias, L., Cervantes, A., Covarrubias, A., Soberón, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch, Y. y Bolívar, F., 1982. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR 322 and several deletion derivatives including pBR 327 and pBR 328. Gene 13;25-35.
- 32) Curtiss, R., 1976. Genetic manipulations of microorganisms: potential benefits and biohazards. Ann. Rev. Microbiol. 30; 507-533.
- 33) Danno, G., 1970. Studies on D-glucose isomerizing enzyme from B. coagulans strain HN 68. IV. Purification, crystallization and some physicochemical properties. Agric. Biol. Chem. 34;

1795-1804.

- 34) Danno, G., 1971. Studies on D-glucose isomerizing enzyme from B. coagulans strain HN 68. VI. The role of metal ions on the isomerization of D-glucose and D-xylose by the enzyme. *Agric. Biol. Chem.* 35;997-1006.
- 35) David, J. y Weismeyer, H., 1970. Control of xylose metabolism in E. coli. *Biochim. Biophys. Acta.* 201;497-499.
- 36) DeBoer, H., Comstock, L.J. y Vasser, M., 1984. The lac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80;21-25.
- 37) DeMaeyer, E., Skup, D., Prasad, K., DeMaeyer, J., Williams, B., Meacock, P., Sharpe, G., Pioli, D., Hennam, J., Schuch, W. y Atherton, D., 1983. Expression of a chemically synthesized human alpha interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79;4256-4259.
- 38) Demnerova, K., Popisil, S., Blumauerova, M. y Kas, J., 1979. Genetic improvement of glucose isomerase production in S. nigricans by ultraviolet radiation. *Biotechnol. Lett.* 1;299-304.
- 39) Dennis, K., Srieno, F. y Bailey, J., 1985. Ampicillin effects on five recombinant E. coli strains: implications for selection pressure design. *Biotechnol. Bioeng.* 27;1490-1494.
- 40) de Vos, W. y Venema, G., 1982. Fate of plasmid DNA in competent cells and protoplasts of B. subtilis. En: Ganesan, A.T., Chang, S. y Hoch, J. (Eds.). *Molecular cloning and gene regulation in Bacilli.* Academic Press, Nueva York;211-225.
- 41) de Vos, W. y Venema, G., 1983. Transformation of B. subtilis competent cells: identification and regulation of the recE4 gene product. *Mol. Gen. Genet.* 190;56-64.
- 42) Dische, Z. y Borenfreund, E., 1951. A new spectrophotometric method for the detection of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* 192;583-587.
- 43) Doi, R.H., Wong, S.L. y Kawamura, F., 1986. Potential use of B. subtilis for secretion and production of foreign proteins. *Trends. Biotechnol.* 4;232-236.

- 44) Doi, R.H. y Wong, S.L., 1986b. Multiple prokaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors. *Microbiol. Rev.* 50;227-243.
- 45) Donnelly, C. y Sonenshein, A.L., 1982. Genetic fusion of E. coli lac genes to a Bacillus promoter. En: Ganesan, A.T., Chang, S. y Hoch, J. (Eds.). *Molecular cloning and gene regulation in Bacilli*. Academic Press, Nueva York;63-72.
- 46) Dugaiczyk, A., Boyer, H. y Goodman, A.M., 1975. Ligation of Ligation of Eco RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* 96;171-195.
- 47) Dziezak, J., 1986. Sweeteners in Food Product Development. *Food Technol.* 40(1);112-130.
- 48) Ehrlich, S.D., 1977. Replication and expression of plasmids from S. aureus in B. subtilis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 74;1680-1682.
- 49) Ehrlich, S.D. y Sgaramella, V., 1978. Barriers to the hetero-specific gene expression among prokaryotes. *Trends. Biochem. Sci.* 4;259-261.
- 50) Eitner-Monke, G. y Monteuffel, R., 1986. Expression of the P. mirabilis recA genes in B. subtilis is directed by its own promoter. *J. Basic. Microbiol.* 26;67-74.
- 51) Emr, S.D. y Silhavy, V., 1983. Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80;4599-4603.
- 52) Espinosa, M., Lopez, P. y Lock, S., 1982. Transfer and expression of recombinant plasmids carrying pneumococcal mal genes in B. subtilis. *Gene* 28;301-310.
- 53) Fahnestock, S.R. y Fisher, K., 1987. Protease deficient B. subtilis host strains for the production of staphylococcal protein A. *Appl. Environ. Microbiol.* 53;379-384.
- 54) Farrés, A., Paredes, L., San Martín, A. y Sánchez, S., 1986. Molecular cloning of a glucose isomerase gene. *Proceedings of the I Cuban Seminar on Biotechnology* (en prensa).
- 55) Fayerman, J., 1986. New developments in gene cloning in antibiotic producing microorganisms. *Bio/Technology* 4;786-789.
- 56) Ferrari, E., Hennen, D. y Hoch, J., 1981. Isolation of B. sub

tilis genes from a Charon 4A library. J. Bacteriol. 146;430-432

- 57) Ferreti, L., Mottes, M., Fazio, D. y Sgaramella, V., 1984. Convergent transcription of the E. coli hisG gene cloned in B. subtilis stops in the vicinity of the attenuator. Gene 29;11-19.
- 58) Flock, J., Fotheringham, I., Light, J., Bell, L. y Derbyshire, R., 1984. Expression in B. subtilis of the gene for human urogastrone using synthetic ribosome binding sites. Mol. Gen. Genet. 195;246-251.
- 59) Fouet, A., Klier, A., y Rapoport, G., 1982. Cloning and expression in E. coli of the sucrase gene from B. subtilis. Mol. Gen. Genet. 186;399-404.
- 60) Ganesan, A.T., 1982. Uptake, restriction, modification and recombination of DNA molecules during transformation in B. subtilis. En: Ganesan, A.T., Chang, S. y Hoch, J. (Eds.). Molecular cloning and gene regulation in the Bacilli. Academic Press, Nueva York; 261-268.
- 61) Gold, L., Pribnow, D., Schreder, T., Shinedling, S., Singer, B.S., y Stormo, G., 1981. Translational initiation in prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 35;365-403.
- 62) Gong, C., Chen, L., Flickinger, M., Chang, L. y Tsao, G., 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 41;430-436.
- 63) Gryczan, T. y Dubnau, D., 1978. Construction and characterization of chimeric plasmids in B. subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. 75;1428-1472.
- 64) Gryczan, T., Shivakumar, A.G. y Dubnau, D., 1980. Characterization of chimeric plasmids cloning vehicles in B. subtilis. J. Bacteriol. 141;246-253.
- 65) Gryczan, T. y Dubnau, D., 1982. Direct selection of recombinant plasmids in B. subtilis. Gene 20;459-469.
- 66) Hagan, C.E. y Warren, G.J., 1982. Lethality of palindromic DNA and its use in selection of recombinant plasmids. Gene 19;147-151.
- 67) Hamilton, B.K., Colton, C.K. y Cooney, C.C., 1974. Glucose

isomerase: a case study of enzyme catalyzed process. En: Olson, A. y Cooney, C. (Eds.). Immobilized enzymes in food and microbial processes. Plenum Press, Nueva York;85-131.

- 68) Hardy, K., Stahl, S. y Jupper, J., 1981. Production in B. subtilis of hepatitis B core antigen and of a major antigen of foot and mouth disease virus. *Nature* 293;481-483.
- 69) Hennecke, H., Gunther, I. y Binter, F., 1982. A novel cloning vector for the direct selection of recombinant DNA in E. coli. *Gene* 19;231-234.
- 70) Ho, N.W.Y., Rosenfeld, S., Stevis, P. y Tsao, G., 1983. Purification and characterization of the D-xylose isomerase gene from E. coli. *Enzyme Microb. Technol.* 5;417-420.
- 71) Holland, B., Mackman, N. y Nicaud, I., 1986. Secretion of proteins from bacteria. *Bio/technology* 4;427-431.
- 72) Homler, B., 1984. Properties and stability of aspartame. *Food Technol.* 38;50-55.
- 73) Honigman, A. y Oppenheimer, A.B., 1981. Cloning and characterization of a transcription termination signal in bacteriophage lambda unresponsive to the N gene product. *Gene* 13;289-298.
- 74) Hopwood, D.A., 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 35;237-272.
- 75) Hopwood, D.A., 1984. Gene cloning in Streptomyces. *Trends. Bio technol.* 2;55-61/
- 76) Huitrón, C. y Limón-Lason, J., 1978. Immobilization of glucose isomerase to ion exchange materials. *Biotechnol. Bioeng.* 20;1377-1391.
- 77) Hzuka, H., 1971. Production of extracellular glucose isomerase by Streptomyces. U. S. Patent 3,622,463.
- 78) Imanaka, T., 1983. Host vector systems in thermophilic bacilli and their applications. *Trends Biotechnol.* 1;139-144.
- 79) Inouye, S., Soberón, X., Franceschini, T., Nakamura, K., Itakura, K. e Inouye, M., 1982. Role of positive charge on the amino terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79;3438-3441

- 80) Iordanescu, S., 1977. Relationship between cotransducible plasmids in S. aureus. J. Bacteriol. 129;71-75.
- 81) Joyet, P., Guerineau, M. y Heslot, H., 1984. Cloning of a thermostable α -amylase gene and its expression in E. coli and B. subtilis. FEMS Microbiol. Lett. 21;353-358.
- 82) Jeffries, T.W., 1984. Mutants of P. tannophilus showing enhanced rates of growth and ethanol formation from D-xylose. Enzyme Microb. Technol. 6;254-258.
- 83) Kawamura, F. y Doi, R., 1984. Construction of a B. subtilis double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. J. Bacteriol. 160;442-444.
- 84) Keggins, K., Lovett, P.S. y Duvall, E., 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of Bacillus DNA in B. subtilis and properties of vector plasmid pUB 110. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:1423-1427.
- 85) Kieselburg, M., Weickert, M. y Vary, P., 1984. Analysis of resident and transformant plasmids in B. megaterium. Bio/Technology 2;254-259
- 86) Klessen, C., y Walke, H., 1986. Expression of the streptokinase gene from S. equisimilis in B. subtilis. J. Basic Microbiol. 26;75-81.
- 87) Kurose, N., Murata, K. y Kimura, A., 1985. An E. coli mutant having altered D-xylose uptake activity and cloning of a gene for D-xylose uptake. Agric. Biol. Chem. 49;2597-2603.
- 88) Lawliss, V., Dennis, M., Chen, E., Smith, D. y Henner, D., 1984. Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylose kinase genes of E. coli. Appl. Environ. Microbiol. 47; 15-21.
- 89) Le Hegarat, J.C. y Anagnostopoulos, C., 1977. Detection and characterization of naturally occurring plasmids in B. subtilis. Mol. Gen. Genet. 157;167-174.
- 90) Lovett, P.S., Duvall, E.J. y Keggins, K., 1978. Bacillus pumilus plasmid pPL 10. Properties and insertion into B. subtilis 168 by transformation. J. Bacteriol. 127;817-829.
- 91) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J.

- Biol. Chem. 193;265-275.
- 92) Maleszka, R., Wang, P. y Schneider, H., 1982. A ColE1 plasmid containing E. coli genes complementing D-xylose negative mutants of E. coli and S. typhimurium. Can. J. Biochem. 60;144-151.
 - 93) Malik, V., 1980. Recombinant DNA technology. Adv. Appl. Microbiol. 26;36-151.
 - 94) Mandel, M. y Higa, A., 1970. Calcium dependent bacteriophage infection. J. Mol. Biol. 53;159-162.
 - 95) Marshall, R. y Kooi, R., 1957. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose. Science 125;648-649.
 - 96) McLaughlin, J., Murray, C. y Rabinowitz, J., 1981. Plasmid directed expression of S. aureus B-lactamase by B. subtilis in vitro. J. Biol. Chem. 256;11273-11282.
 - 97) Mermelstein, N.H. (Ed.), 1987. Intense sweeteners: where is the controversy. Food Technol. 41(1); 115-124. 68;3-24.
 - 98) Morrow, D., 1980. Recombinant DNA techniques. Meth. Enzymol. 68;3-24.
 - 99) Mortlock, R.P. y Wood, W.A., 1964. Metabolism of pentoses and pentitols by Aerobacter aerogenes. J. Bacteriol. 88;838-849.
 - 100) Mozhaev, V.V. y Martinek, K., 1984. Structure stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. Enzyme Microb. Technol. 6;50-59
 - 101) Muth, W.L., 1986. Large scale fermentation development of recombinant microorganisms. En: Cheremisinoff, P.N. y Quellet, R.P. (Eds.). Biotechnology: applications and research. Technomics Publishers Co., Lancaster;156-164.
 - 102) O'Connor, C.D. y Humphreys, G.O., 1982. Expression of the EcoRI restriction-modification system and the construction of positive selection cloning vectors. Gene 20;219-229.
 - 103) Old, R.W. y Primrose, S.B., 1981. Principles of gene manipulation. University of California Press, Los Angeles;103.

- 104) Oliver, E.J. y Mortlock, R.P., 1971. Metabolism of D-arabinose by *Aerobacter aerogenes*: purification of the isomerase. *J. Bacteriol.* 149; 391-394.
- 105) Oliver-Lampen, J. y Nielsen, J.K., 1982. Penicillinase and the secretion of proteins by bacilli. *Mol. Gen. Genet.* 184; 99-110
- 106) Orzech McDonald, K. y Burton, W., 1982. Cloning of the *B. subtilis* sulfanilamide resistance gene in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 149; 391-394.
- 107) Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T. y Furuya, A., 1983. Cloning of the genes concerned in phenylalanine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* and its application to breeding of a phenylalanine producing strain. *Agric. Biol. Chem.* 49; 2925-2930.
- 108) Palva, I., Petterson, R., Kalkkenin, N., Lehtovaara, P., Sarvon, M., Sooderlund, H., Tapenin, K. y Kaariainen, L., 1981. Nucleotide sequence of the promoter and NH aminoterminal signal peptide. *Gene* 15; 43-51.
- 109) Palva, I., 1982. Molecular cloning of an alfa-amylase gene from *B. amyloliquefaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene* 19; 81-87.
- 110) Panbengred, W., Kondo, R., Negoro, S., Shinmyo, A. y Okada, H., 1983. Molecular cloning of the genes for xylan degradation of *B. pumilus* and their expression in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 192; 335-341.
- 111) Park, Y. y Nakamura, I., 1974. Producao de glucose isomerase e isomerizacao de glucose a fructose. *Revista Brasileira de Tecnologia* 5; 185-190.
- 112) Pettersen, R.F., Lundstrom, K., Chattopadhyaya, J.B., Josephson, S., Philipson, L., Kaariainen, L. y Palva, I., 1983. Chemical synthesis and molecular cloning of a STOP oligonucleotide encoding an UGA translation terminator in all three reading frames. *Gene* 24; 15-27.
- 113) Pitcher, W., 1986. Genetic modification of enzymes used in *Environ, Microbiol.* 49; 1094-110.
- 114) Pinches, A., Louw, M.E. y Watson, F.G., 1986. Growth, plasmid

instability and alfa amilase production in batch fermentation using a recombinant B. subtilis strain. *Biotechnol. Lett.* 7; 621-626.

- 115) Ramaley, R.F., 1979. Molecular biology of extracellular enzymes. *Adv. Appl. Microbiol.* 25;37-56.
- 114) Rapoport, G., Klier, A., Billault, A., Fargette, F. y Dedonder, R., 1979. Construction of a colony bank of E. coli containing hybrid plasmids representative of the B. subtilis 168 genome. *Mol. Gen Genet.* 176;239-245.
- 115) Raynal, A., y Guerineau, M., 1984. Cloning and expression of the structural gene for B-glucosidase of K. fragilis in E. coli and S. cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* 195;108-115.
- 116) Robbins, P.W., Wirth, D.F. y Hering, C., 1981. Expression of the *Streptomyces* enzyme endoglicosidase H in E. coli. *J. Biol. Chem.* 256; 10640-10644.
- 117) Rodgers, W.H., Springer, W. y Young, F.E., 1982. Cloning and expression of S. fradiae neomycin resistance gene in E. coli. *Gene* 18;133-141.
- 118) Rodríguez, R. y Tait, R.C., 1983. Recombinant DNA techniques: an introduction. Addison-Wesley Publishing Co., Reading;236.
- 119) Rosenberg, M. y Court, D., 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13;319-354.
- 120) Rosenfeld, S., Stevis, P. y Ho, N., 1984. Cloning and characterization of the xyl genes from E. coli. *Mol. Gen. Genet.* 194; 410-415.
- 121) Sakaguchi, K., 1982. Construction of various host vector systems and the variation of enzyme levels. En: Chibata, I., (Ed.) *Enzyme Engineering VI*. Plenum Press, Nueva York;479-489.
- 122) Sánchez, S. y Smiley, K., 1975. Properties of D-xylose isomerase from S. albus. *Appl. Microbiol.* 30;750-754.
- 123) Sánchez, S. y Quinto, C., 1975. D-glucose isomerase; constitutive and catabolite repression resistant mutants of S. phaeochromogenes. *Appl. Microbiol.* 30;750-754.
- 124) Sandhu, J. y Kennedy, J.F., 1984. Molecular cloning of B.

polymyxa B-D-xylanase gene in E. coli. Enzyme Microb. Technol. 6;271-275.

- 125) Seo, J. y Bailey, J., 1985. Effects of recombinant plasmid content and cloned gene product formation in E. coli. Biotechnol Bioeng. 27;1668-1674.
- 126) Soberón, X., Covarrubias, L. y Bolívar, F., 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR 322 and pBR 325. Gene 9;287-305.
- 127) Somers, E., 1974. The toxic potential of trace metals in foods: a review. J. Food. Sci. 39;215-217.
- 128) Steffen, D. y Schleif, R., 1977. In vitro construction of plasmids resulting in overproduction of the proteins of the araC genes in E. coli. Mol. Gen. Genet. 157;341-344.
- 129) Stevis, P. y Hol, N., 1985. Overproduction of D-xylose isomerase in E. coli by cloning the D-xylose isomerase gene. Enzyme Microb. Technol. 7;592-596.
- 130) Suekane, M., Tamura, M. y Tomimura, C., 1978. Physicochemical and enzymatic properties of purified glucose isomerase from S. olivochromogenes and B. stearothermophilus. Agric. Biol. Chem. 42;909-917.
- 131) Sullivan, M., Yasbin, R. y Young, F.E., 1984. New shuttle vector for B. subtilis and E. coli which allow rapid detection of inserted fragments. Gene 29;21-26.
- 132) Takasaki, Y. y Kosugi, Y., 1969. Streptomyces glucose isomerase. En: Perlman, D. (Ed.). Fermentation advances. Academic Press, Nueva York;561-570.
- 133) Tanaka, T., 1979. Restriction and plasmid mediated transformation in B. subtilis. Mol. Gen. Genet. 175;235-237.
- 134) Tsumura, N., y Sato, T., 1965. Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose VI. Properties of the enzyme from S. phaeochromogenes. Agric. Biol. Chem. 29;1129-1134.
- 135) Ueng, P., VBolpp, K.J., Tucker, J.V., Gong, C.S. y Chen, L.F., 1985. Molecular cloning of the E. coli gene encoding xylose isomerase. Biotechnol. Lett. 7;153-158.

- 136) Uhlin, B. y Nordstrum, K., 1977. R plasmid gene dosage effects in E. coli K12 copy number mutants of the R plasmid R1drd-19. Plasmid 1;1-7.
- 137) Ulmanen, I., Lundstrom, K., Lehtovaara, P., Sarvas, M., Ruuhonen, M. y Palva, I., 1985. Transcription and translation of foreign genes in B. subtilis by the aid of a secretion vector. J. Bacteriol. 162;176-182.
- 138) Vaheri, M. y Kauppinen, V., 1977. Improved microbial glucose isomerase production. Process Biochem. 9;5-8.
- 139) Venema, G., 1978. Bacterial transformation. Adv. Microb. Physiol. 19;245-311.
- 140) Vieira, J. y Messing, J., 1982. The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19;259-268.
- 141) West, R.W. y Rodriguez, R.L., 1982. Construction and characterization of E. coli promoter probe plasmid vectors. III. pBR 322 derivatives with deletions in the tetracycline resistance promoter regions. Gene 20;291-304.
- 142) Wilhelm, M. y Hollenberg, C., 1984. Selective cloning of B. subtilis xylose isomerase and xylulose kinase in E. coli by IS5 mediated expression. EMBO J. 3;2555-2560.
- 143) Workman, W., McLinden, J. y Dean, D., 1986. Genetic engineering applications to Biotechnology in the genus Bacillus. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 3;199-234.
- 144) Wovcha, M., Steuerwald, D. y Brooks, K., 1983. Amplification of D-xylose and D-glucose isomerase activities in E. coli by gene cloning. Appl. Environ. Microbiol. 45;1402-1404.
- 145) Yamanaka, L., 1968. D-xylose isomerase of L. brevis. Biochim. Biophys. Acta. 151;670-680.
- 146) Yoshimura, S., Danno, G. y Nataka, M., 1966. Studies in glucose isomerizing activity of D-xylose grown cells from B. coagulans strain HN68 I. Description of the strain and conditions for the formation of the activity. Agric. Biol. Chem. 30;1015-1023.
- 147) Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T. y Oshima, Y., 1983. Distribution of heterogeneous and homologous plasmids in Bacil

lus spp. Appl. Environ. Microbiol. 45;1733-1740.

- 148) Young, F.W., 1980. Impact of cloning in B. subtilis on fundamental and industrial microbiology. J. Gen. Microbiol. 119;1-15.
- 149) Zabriskie, D.W. y Arcuri, E.J., 1986. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. Enzyme Microb. Technol. 8; 706-717.

BIBLIOTECA
JUAN A. ESCALANTE H.
UNIDAD ACADÉMICA DE
LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO / CCH
U N A M