

300627

90  
2ej



**UNIVERSIDAD LA SALLE**  
**ESCUELA DE QUIMICA**  
**CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.**

**“CLONACION MOLECULAR DEL  
GENE DE GLUCOSA ISOMERASA”**

**TESIS PROFESIONAL**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A**  
**LETICIA PAREDES GONZALEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

APENDICE	1
TABLAS Y CUADROS	2
I RESUMEN	4
II INTRODUCCION	8
2.1 Azúcar y edulcorantes	8
2.2 Tipos de edulcorantes	9
2.3 Características de diversos edulcorantes	10
III ANTECEDENTES	19
3.1 Jarabes fructosados	19
3.2 Glucosa isomerasa	21
IV OBJETIVOS	29
V INGENIERIA GENETICA	30
5.1 Generalidades	30
5.2 Metodología general de la Ingeniería Genética	30
5.3 DNA	31
5.4 Vehículos moleculares	31
5.5 Enzimas de restricción	34
5.6 Unión	37

5.7 Cepa receptora	38
VI MATERIAL Y METODOS	44
6.1 Material	44
6.1.1 Microorganismos	44
6.1.2 Medios de cultivo	44
6.1.3 Soluciones amortiguadoras	46
6.1.4 Soluciones	48
6.1.5 Material	53
6.1.6 Equipo	54
6.2 Métodos	56
6.2.1 Extracción de plásmido	56
6.2.2 Separación por columna	58
6.2.3 Purificación por ultracentrifugación	59
6.2.4 Diálisis	59
6.2.5 Gel de agarosa para electroforesis	60
6.2.6 Digestión de DNA	61
6.2.7 Unión de fragmentos de DNA	62
6.2.8 Transformación	63
6.2.9 Selección de recombinantes	65
6.2.10 Determinación de actividad	66
6.2.11 Curva de crecimiento	67
6.2.12 Determinación de proteína	68
6.2.13 Determinación de afinidad por el sustrato	68
6.2.14 Determinación de glucosa	68

VII	RESULTADOS	70
	7.1 Obtención de DNA donador de la información	70
	7.2 Purificación del vehículo molecular	71
	7.3 Digestión del vehículo y del DNA donador	72
	7.4 Unión de los fragmentos de DNA	73
	7.5 Características de la cepa receptora	74
	7.6 Transformación	75
	7.7 Reconocimiento de recombinantes	76
	7.8 Caracterización de la cepa recombinante	77
	7.9 Genética	80
VIII	DISCUSION	96
IX	CONCLUSION Y RECOMENDACIONES	99
X	BIBLIOGRAFIA	102

## APENDICE

Ap <sup>r</sup>	Resistencia a ampicilina
Tc <sup>r</sup>	Resistencia a tetraciclina
Cm <sup>r</sup>	Resistencia a cloranfenicol
xil <sup>+</sup>	capaz de crecer en xilosa como fuente de carbono
m <sup>-</sup>	sistemas de modificación de DNA inactivo
r <sup>-</sup>	sistemas de restricción de DNA inactivos
Km	constante de Michaelis - Menten
LB	medio de Luria
MCL	medio completo para levaduras
DTT	Ditiotreitol
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
NTG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

## INDICE DE TABLAS

Tabla I	Consumo industrial de azúcar	16
Tabla II	Aplicación de los Jarabes de almidón en diversos alimentos	17
Tabla III	Clasificación y poder edulcorante de diversos compuestos	18
Tabla IV	Microorganismos productores de glucosa isomerasa	28
Tabla V	Plásmidos comúnmente utilizados como vectores moleculares	41
Tabla VI	Diferentes enzimas de restricción y su acción sobre secuencias específicas	42
Tabla VII	Resultados de la transformación de la cepa receptora <u>Escherichia coli</u> K 802 1-25	88
Tabla VIII	Incremento en la biomasa de diferentes cepas de <u>Escherichia coli</u>	90
Tabla IX	Afinidad de la glucosa isomerasa por la D- fructosa	92

## FIGURAS

Figura I	Producción y consumo de azúcar en México de 1975 a 1984	15
Figura II	Producción de Jarabes fructosados	25
Figura III	Producción de jarabes con alto contenido de fructosa	26
Figura IV	Relación costo/producción de diferentes enzimas	27
Figura V	Esquema general de clonación	40
Figura VI	Acción de la enzima ligasa	43

Figura VII	Electroforesis de DNA cromosómico de <u>Actinoplanes missouriensis</u> donador de la información	82
Figura VIII	Electroforesis de DNA del plásmido PBR 329	83
Figura IX	Electroforesis de la digestión de DNA donador y del plásmido	84
Figura X	Acción de la ligasa	85
Figura XI	Curva de crecimiento de <u>Escherichia coli</u> K 802 y la derivada <u>Escherichia coli</u> K 802 1-25	86
Figura XII	Actividad específica de glucosa isomerasa en las cepas <u>E. coli</u> K 802 y <u>E. coli</u> K 802 1-25	87
Figura XIII	Curva de crecimiento de las cepas recombinantes obtenidas	89
Figura XIV	Actividad específica de la glucosa isomerasa de las cepas <u>E. coli</u> K 802, K 802 1-15 y 503	91
Figura XV	Digestión del plásmido recombinante	93
Figura XVI	Curva de crecimiento de diferentes cepas de <u>E. coli</u>	94
Figura XVII	Actividad isomerizante de diversas cepas de <u>E. coli</u>	95

## I RESUMEN

Se sabe que la enzima glucosa isomerasa es de gran importancia para la fabricación de jarabes fructosados, por lo que se -- han realizado diversos esfuerzos para sobreproducirla.

El objetivo del presente trabajo fué clonar la información genética que codifica para la síntesis de la enzima glucosa isomerasa, a partir de Actinoplanes missouriensis en el vehículo molecular de la serie pBR (329), e introducir esta información en una cepa receptora de crecimiento rápido, y se utilizó para ello la metodología de la ingeniería genética. Esta metodología consiste básicamente en obtener la información genética deseada a partir del DNA aislado del microorganismo de interés, cortarlo con enzimas de restricción, clonar esta información en un vehículo molecular, e introducir esta molécula en el microorganismo receptor para su expresión.

Como microorganismo donador del material genético se utilizó al actinomiceto Actinoplanes missouriensis, debido a que la enzima glucosa isomerasa que sintetiza presenta características de interés comercial con respecto a su actividad, temperatura, pH óptimo y requerimiento de iones.

Como vehículo molecular se utilizó al plásmido pBR 329, el cual confiere resistencia a tres antibióticos: ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol, además es autorreplicable, multicopia,

y posee un sitio único de corte para la enzima de restricción - Eco RI (enzima empleada en este trabajo) en el gene que codifica para la resistencia a cloranfenicol.

Una vez que se obtuvo el DNA del Actinoplanes missouriensis y que se purificó el plásmido pBR 329, se realizaron diversos ensayos para determinar las condiciones óptimas de digestión para ambos, lo cual se verificó por medio de una electroforesis.

Posteriormente se establecieron las condiciones necesarias para la unión del DNA fragmentado con el vehículo molecular, para lo cual se utilizó la enzima ligasa del fago T4. Las combinaciones posibles que pueden obtenerse en este paso son tres: a) el plásmido ligado a sí mismo, b) el plásmido ligado a un fragmento de DNA donador, c) la unión entre sí de fragmentos de DNA donador.

Las diferentes moléculas recombinantes se introdujeron en la cepa receptora Escherichia coli K 802 1-25 por medio de una transformación, y se reconocieron aquellas células que aceptaron el plásmido por su crecimiento en medio completo suplementado con un antibiótico, que en este caso fué la ampicilina.

Para la obtención de las células que contienen el plásmido con la información clonada, las células que crecen en presencia del primer antibiótico, son replicadas a otra caja con el mismo medio pero con un segundo antibiótico (cloranfenicol), y todas aquellas que sean sensibles a éste, se les denomina células re-

combinantes. La sensibilidad se debe a que el inserto interrumpe la información que codifica la resistencia al cloranfenicol.

En uno de los intentos que se realizaron para obtener una cepa recombinante productora de glucosa isomerasa, se encontró una proporción del 2.5% de cepas recombinantes. De éstas, el 20% (3 colonias) fueron capaces de crecer en xilosa y se les denominó 291, 374 y 503 respectivamente.

Se determinó su crecimiento en medio mínimo suplementado con xilosa como fuente de carbono, y sólo una de ellas (503) -- creció rápidamente. También se determinó la actividad específica de glucosa isomerasa, y nuevamente en la cepa 503 fue mayor que en las otras cepas.

En función de éstos resultados se decidió trabajar con la cepa 503 para caracterizar la actividad de la enzima que producía.

Se determinó la afinidad de la enzima por fructosa en la cepa 503 y se comparó con otras cepas y se observó que su valor de  $K_m$  fue muy similar al que se obtuvo en la cepa donadora de la información.

Para verificar si en realidad el plásmido de la cepa 503 era el responsable del crecimiento en xilosa, se extrajo y purificó; y posteriormente se introdujo de nuevo en la cepa receptor

ra Escherichia coli K 802 1-25. En esta ocasión se obtuvieron 80 colonias y todas presentaban el siguiente fenotipo: Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>, Cm<sup>s</sup> y xil<sup>+</sup>. De estas recombinantes se escogieron dos las denominadas 15 y 16, a las que determinó de nuevo el crecimiento y actividad específica de la glucosa isomerasa.

En estas cepas la actividad resultante fué menor que la cepa donadora, pero superior a la del microorganismo receptor.

Por otra parte, con el plásmido de la cepa 503 se efectuó un análisis de restricción en el cual se pudo observar la presencia de un inserto, que parece contener la información necesaria para la síntesis de la enzima glucosa isomerasa.

## II INTRODUCCION

El dulzor es una cualidad de algunas sustancias que el hombre ha asociado con el placer. Al igual que lo ocurrido con los desarrollos tecnológicos relevantes, históricamente el aumento en el consumo del azúcar se ha visto influenciado también por -- dos factores: el progreso y la guerra; por ejemplo, cuando una -- comunidad comienza a desarrollarse una de las primeras necesidades que busca satisfacer es su requerimiento por el dulce. Por otra parte, importantes descubrimientos y desarrollos tecnológicos son consecuencia de las dos principales guerras mundiales, -- como ejemplo están: el desarrollo de la tecnología fermentativa para la síntesis de penicilina por una parte, o bien la culminación del radar, o la energía nuclear por otra (19).

### 2.1 Azúcar y edulcorantes

Por su disponibilidad y economía, el hombre ha utilizado -- tradicionalmente a la sacarosa como fuente del dulce. Sin embar-- go, en los últimos años la demanda mundial del azúcar se ha in-- crementado notablemente, y México no es la excepción como se i-- llustra en la figura I (65); de tal suerte, que la búsqueda de sus-- titutos de la sacarosa con elevado poder edulcorante representa un reto de investigación y desarrollo tecnológico de interés nacional. Muy diversas son las causas que han propiciado incremen-- tos en la demanda por el dulce, por un lado el sector industrial ha incrementado su uso para la producción de refrescos, confite--

ría, repostería, productos farmacéuticos y alimentos enlatados entre otros (tabla I). Por otra parte, el consumo del azúcar para uso doméstico representa un mercado creciente para el dulce.

La búsqueda de sustitutos del azúcar con elevado poder edulcorante, se ha visto estimulada también por recomendaciones de - asociaciones dentales (1, 46), además de otros factores tales como la intolerancia que algunas personas presentan de manera natural a la glucosa (28, 38) o bien para satisfacer ciertos gustos locales (41), y por la necesidad de aplicación de edulcorantes - específicos a diversos procesos industriales (26, 47).

Entre las tecnologías desarrolladas para estos fines, se encuentra la obtención de edulcorantes a partir del almidón, tales como la dextrosa, los jarabes glucosados, los jarabes fructosados y los oligosacáridos (11, 54). En la actualidad los edulcorantes derivados del almidón tienen una gran aplicación industrial (tabla II) y año con año aumenta la demanda por los mismos.

## 2.2 Tipos de edulcorantes

Existen en el mercado distintos tipos de edulcorantes, y dentro de éstos hay muchas variedades. En general los edulcorantes pueden ser divididos por su origen en Naturales y en Sintéticos, (35) (tabla III) y su poder edulcorante es independiente de su origen.

Para otros autores, los edulcorantes pueden ser divididos

y clasificados en Nutritivos y no Nutritivos (1, 28, 36, 60).

A continuación se enumeran varios de los edulcorantes empleados en la industria junto con algunas de sus propiedades:

### 2.3 Características de diversos edulcorantes

**Sacarosa:** Compuesta por una unidad de glucosa y una de fructosa, obtenida de la caña de azúcar o de tubérculos como la remolacha. En forma de cristales tiene una amplia aplicación en la manufactura de alimentos y su poder edulcorante se utiliza como referencia para establecer el dulzor de otros compuestos. (21).

**Azúcar invertido:** La sacarosa es fácilmente hidrolizada en sus componentes (glucosa y fructosa) obteniéndose un jarabe conocido como azúcar invertido, ya sea por un tratamiento ácido o enzimático (con la enzima invertasa), este jarabe se encuentra en alimentos naturales como la miel, frutas y se emplea en la manufactura de algunos alimentos procesados por las propiedades que les imparte a los mismos, tales como su poder edulcorante, consistencia, higroscopía, contribución a los sólidos totales y su coloración (21).

**Glucosa:** Azúcar simple (monosacárido), hexosa, usada ampliamente en la manufactura de alimentos por las propie

dades que les imparte tales como el poder ser fermentables, incremento del sabor, aporte nutritivo, dulzor, presión osmótica, viscosidad, higroscopia, se obtiene principalmente por la hidrólisis completa - del almidón (21).

**Fructosa:** Monosacárido, hexosa, presente en una gran variedad de frutas, vegetales, cereales, miel; se obtiene en forma de cristales, es higroscópica, es el carbohidrato más dulce, que se conoce, junto con la sacarina ejerce un efecto sinérgico, incrementando el poder edulcorante a tal punto que puede ser sustituida el 50% de la sacarina. Por ser un edulcorante caro, su principal aplicación está en preparaciones farmacéuticas como soluciones intravenosas, y es recomendada especialmente en las dietas de personas diabéticas porque aparentemente no requiere de insulina para su transporte, se obtiene principalmente del azúcar invertido en forma de cristales (2, 36, 49).

**Maltosa:** Azúcar de malta, constituida por dos unidades de glucosa; mezclada con dextrosa es usada en panadería y en alimentos para niños, es menos dulce que la sacarosa, se obtiene del almidón por un tratamiento enzimático (con la enzima  $\beta$ -amilasa) en forma de cristales o de jarabes, se aplica en la industria cervecera, en la producción de los vinos, y principalmente en -

Japón ya que satisface los gustos locales en lo que respecta al sabor y poder edulcorante (41).

**Lactosa:** Azúcar de leche, formada por una molécula de glucosa y otra de galactosa, obtenida de la leche, se utiliza en la industria farmacéutica, en la formulación de leches infantiles, en panadería, ayuda a la absorción de calcio y fósforo, no posee sabor propio<sup>1</sup> e incrementa el contenido de sólidos, la textura, viscosidad, y acentúa los sabores, el inconveniente que presenta su uso es que en grandes cantidades y concentraciones cristaliza, además de que algunas personas presentan intolerancia a la lactosa por carecer de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (47).

**Jarabe fructosado:** Obtenido por la hidrólisis del almidón, primero como jarabe glucosado y posteriormente isomerizado a jarabe fructosado (por método químico o enzimático), su principal aplicación se encuentra en la fabricación de refrescos, en panadería, postres congelados, frutas enlatadas, mermeladas, jaleas, confitería (58).

**Monelina:** Compuesto por dos cadenas polipeptídicas de distinto tamaño y de secuencias conocidas, y asociadas no covalentemente, su peso molecular es aproximadamente de 11,000 daltonos, es casi 2,500 veces más dulce que

la sacarosa, la fruta de donde se extrae es una especie de cereza que crece en el Africa (35, 26).

**Taumatina:** Formada por una cadena sencilla polipeptídica compuesta por 193 aminoácidos, contenida en una fruta africana llamada "katemfo", es casi 1,600 veces más dulce que la sacarosa, además de que su poder edulcorante incrementa el sabor de otros alimentos (20, 35, 36).

**Aspartamo:** Obtenido por la unión de los aminoácidos fenilalanina y ácido aspártico, en 1981 fue aprobada en los Estados Unidos para su uso comercial, es un edulcorante sintético no cariogénico, y el inconveniente que presenta para su aplicación industrial es que su precio es muy alto (27, 34).

**Sorbitol:** Alcohol hexahídrico, soluble en agua, con sabor dulce, se encuentra en varios frutos y se puede sintetizar a partir de la hidrogenación a presión de la dextrosa, se utiliza para suavizar los dulces, es inhibidor de la cristalización de la sacarosa, usado como aditivo en alimentos dietéticos en una concentración no mayor del 7% (23, 36).

**Sacarina:** Edulcorante no nutritivo, es el anhídrido del ácido sulfimido orto benzóico, sintetizado químicamente como un polvo cristalino blanco de sabor muy dulce, se

utiliza principalmente como sustituto del azúcar en la fabricación de jarabes, bebidas refrescantes, en alimentos dietéticos y en farmacia, su carácter cancerígeno aún no ha sido completamente demostrado (35)

**Ciclamato:** Bajo este nombre se agrupan a agentes edulcorantes sintéticos, no nutritivos como: ciclamato de sodio, calcio y potasio, se obtiene del cicloexilamino, pero en 1970 fué prohibido su uso en los Estados Unidos ya que se encontró que los ciclamatos forman ciclohexilamina que es un compuesto tóxico que causa alteraciones genéticas y cáncer en embriones de pollo y rata (35).

Entre las industrias alimenticias que consumen mayor cantidad de edulcorantes figuran en orden al volúmen que emplean: la refresquera, panadera, confitera, alimentos enlatados, láctea y cervecera (11).

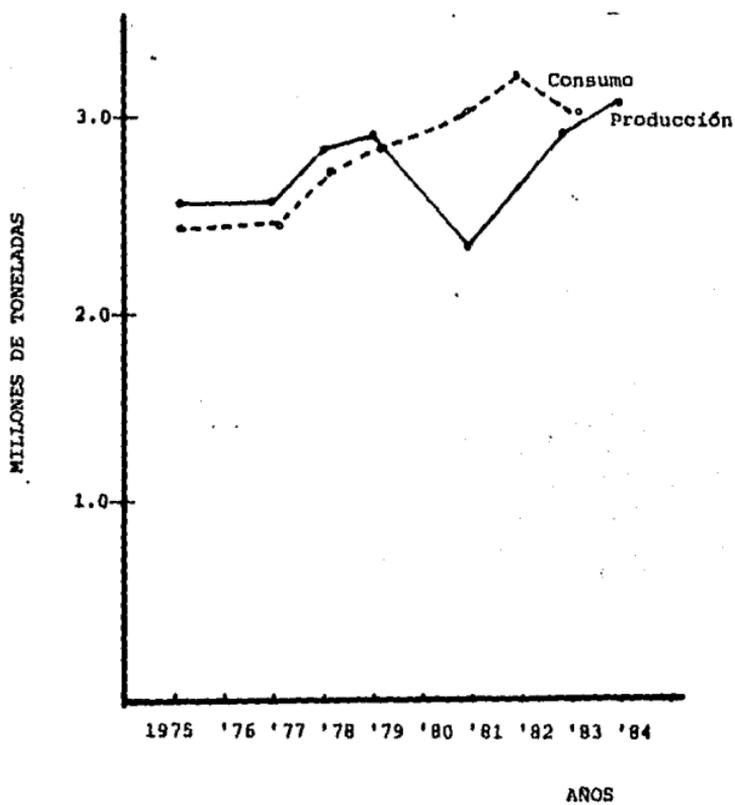


Figura I Producción y consumo de azúcar en México de 1975 a 1984 (65).

TABLA I

## CONSUMO INDUSTRIAL DE AZUCAR (11)

Industria	Porcentaje
Refresquera	55%
Dulcera	14%
Panificadora	12%
Empacadora	5%
Láctea, Farmacéutica, Vitivinícola	25%

## TABLA II

Aplicación de los jarabes de almidón  
en diversos alimentos (37)

Alimentos para niños

Panadería

Cervecería

Frutas enlatadas

Refrescos

Confitería

Jarabes de mesa

Frutas congeladas

Vinos y licores

Helados

Mermeladas y jaleas

Productos cárnicos

Leches condensadas

TABLA III

Clasificación y poder edulcorante  
de diversos compuestos (35)

Origen	Edulcorante	Poder edulcorante
Naturales	Sacarosa*	1.0
	Lactosa	0.4
	Glucosa	0.7
	Fructosa	1.1
	Jarabe glucosado	0.7
	Jarabe fructosado	1.0
	Sorbitol	0.5
	Monelina	2,500
	Taumatina	1,600
Azúcar invertido	0.7-0.9	
Sintéticos	Sacarina	200 - 700
	Ciclamato	30 - 80
	Aspartamo	100 - 120
	Dihidrochalcone	2,000
	Asilsulfame-K	130

\* Su poder edulcorante se definió como 1.0 y se usó como referencia.

### III ANTECEDENTES

#### 3.1 Jarabes fructosados

De los edulcorantes antes mencionados como posibles sustitutos de la sacarosa, el ejemplo que nos pareció más atractivo para la industria alimentaria fué el de los jarabes fructosados. Dentro de las características más importantes que presentan están su poder edulcorante, no tienen sabor característico, su presentación es líquida, son menos viscosos que otros jarabes con similar poder edulcorante, no tienen problemas de cristalización sirven como preservadores ya que incrementan la presión osmótica además de que el proceso de producción es sencillo como se ilustra en la figura II. Todas estas características hacen que su aplicación en la industria alimentaria resulte muy atractiva.

Estos jarabes se utilizan en bebidas suaves, postres congelados, frutas enlatadas, mermeladas, jaleas, aderezos, confitería, postres y vinos (35), e imparten a los alimentos las siguientes propiedades (59):

- a) dulzura y acentuación del sabor
- b) contribuyen a la estabilidad del color y dan brillantez a mermeladas y jaleas.
- c) previenen la sensación arenosa de los helados ocasionada por la cristalización de la sacarosa
- d) modifican y controlan la descongelación de los alimentos congelados

- e) controlan la humedad, higroscopía y viscosidad de los dulces
- f) mejoran la resistencia al deterioro microbiano porque aumentan la presión osmótica
- g) a los alimentos fritos les disminuye la sensación de la grasa
- h) imparten atributos tales como cuerpo, cohesividad, suavidad.

Existen en el mercado (no en México) tres tipos diferentes de jarabes fructosados con 42%, 55% y 90% de contenido de fructosa (11, 35) que se conocen como jarabes con alto contenido de fructosa (High Fructose Corn Syrup: HFCS), y el procedimiento por el cual se obtienen se muestra en la figura III.

Comercialmente los jarabes fructosados se producen a partir del almidón (figura II) obteniéndose primeramente un jarabe glucosado el cual posteriormente se isomeriza para incrementar el contenido de fructosa. Este paso puede llevarse a cabo por métodos químicos (catálisis alcalina) o por métodos enzimáticos (utilizando alguna isomerasa) (11), la primera alternativa presenta el problema de utilizar cofactores tóxicos (boranos) y de que pueden producirse compuestos no metabolizables como la psicosa (10, 32) o colores no deseables que para su eliminación se requieren de procesos complicados y costosos. La psicosa además confiere un sabor degradable al producto. Con respecto a la segunda opción, es la más utilizada aunque el elemento clave es el costo de la enzima.

Entre las opciones sugeridas para solucionar o disminuir es te inconveniente la utilización de la enzima inmovilizada ha resultado una buena alternativa con el desarrollo de reactores cada vez más eficientes para el proceso (11). La otra posibilidad ha sido el mejoramiento genético de la fuente de la enzima, -- orientación a la cual se han encaminado los esfuerzos dentro de la línea de trabajo del laboratorio y cuyos resultados se presentan en este trabajo.

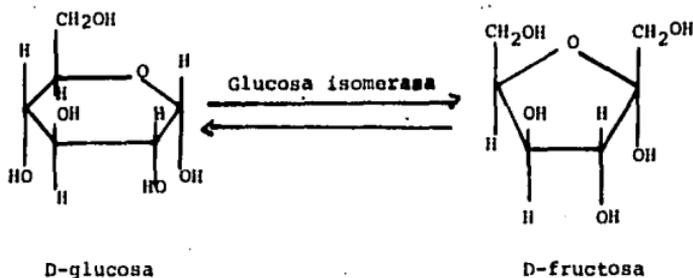
### 3.2 Glucosa isomerasa

En México, existen fuentes de almidón con un importante potencial para su aplicación industrial (como ejemplo la industria lización de la yuca), y si a esto aunamos que el proceso de fabricación de los jarabes fructosados es bien conocido, entonces existen todas las condiciones propicias para que puedan ser producidos y utilizados en la industria nacional.

Como ya se había mencionado, el factor limitante principal de éste proceso es la fuente de la enzima y aunque se conocen las características y propiedades de los microorganismos productores, no se ha podido aún abatir el costo de la enzima para su aplicación en la producción de dichos jarabes.

La enzima utilizada para la fabricación de los jarabes fructosados se conoce industrialmente como glucosa isomerasa, (D-xilosa cetol isomerasa E.C. 5.3.1.5); y actúa sobre aldosas de -

cinco o seis átomos de carbono cuyos grupos hidroxilo estén insertados en la posición "cis", como la D-glucosa, D-xilosa, D-fructosa, D-ribosa, etc. La reacción llega a su equilibrio y se detiene cuando alcanza una concentración paroximadamente igual de D-glucosa y D-fructosa (64).



Un aspecto fundamental en la producción de enzimas con fines comerciales es el de la productividad. En la figura IV se presenta la relación costo/producción de la enzima glucosa isomerasa comparada con otras enzimas de aplicación industrial. Como se puede observar, aún cuando es producida en cantidades limitadas (70 toneladas anuales), su cotización en el mercado es de los más altos (56 millones de dólares anuales) (24).

Para la aplicación de ésta enzima a escala industrial, se necesita de una fuente eficiente de la enzima. Se han encontrado alrededor de 65 microorganismos diferentes (tabla IV) (17) - capaces de producir esta enzima, pero sólo algunos de estos tienen interés comercial (66).

El hecho de que la enzima sea producida en pequeñas cantidades por algunos microorganismos representa un inconveniente, ya que los costos de producción aumentan debido a los requerimientos para el crecimiento de los microorganismos que la producen. La enzima es inducible por xilosa que es una fuente de carbono cara, y su producción se ve afectada por la presencia de otras fuentes de carbono fácilmente utilizables como lo es la glucosa (sensible a represión catabólica) (55).

Uno de los microorganismos productores de glucosa isomerasa que más ha llamado la atención es el actinomiceto Actinoplanes missouriensis, el cual produce una isomerasa estable, activa a los 90°C, no requiere de iones cobalto, tiene gran afinidad por la glucosa, y la produce en forma constitutiva, aunque el inconveniente que presenta es que crece muy lentamente (18).

Entre las alternativas empleadas para disminuir los costos de producción de la enzima están:

- i) uso de inductores baratos como son los materiales que contienen xilanos (17).
- ii) estrategias genéticas como:
  - a) genética tradicional: obtención de mutantes constitutivas e insensibles a represión catabólica (55).
  - b) recombinación in vitro de ácido desoxirribonucleico.

Esta última alternativa es muy interesante por ser reportada como una estrategia para la sobreproducción de enzimas y otros

productos biológicos (amilasa, insulina) (10), y representa una opción atractiva para poder alcanzar nuestros objetivos.

FIGURA II

## Producción de Jarabes fructosados (59)

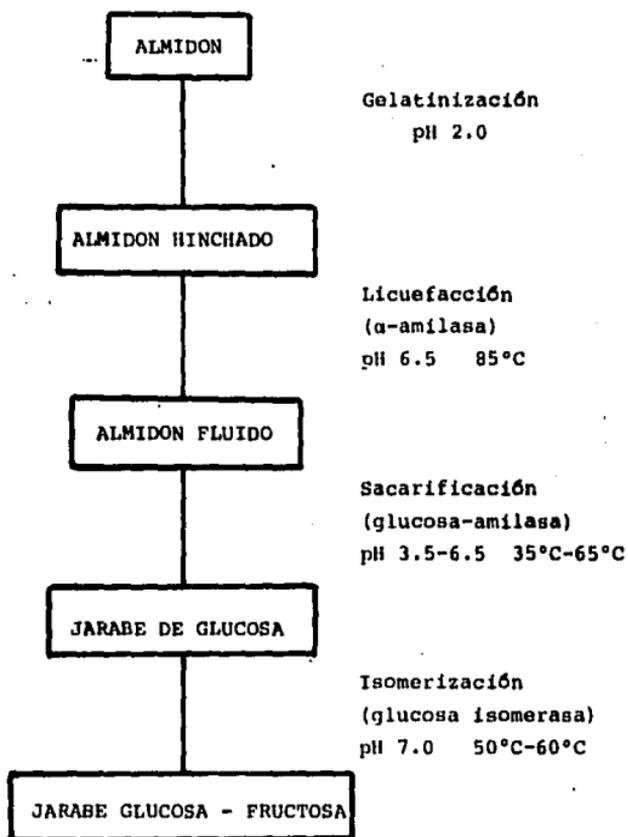


FIGURA III

Producción de jarabes con alto contenido de fructosa (11)

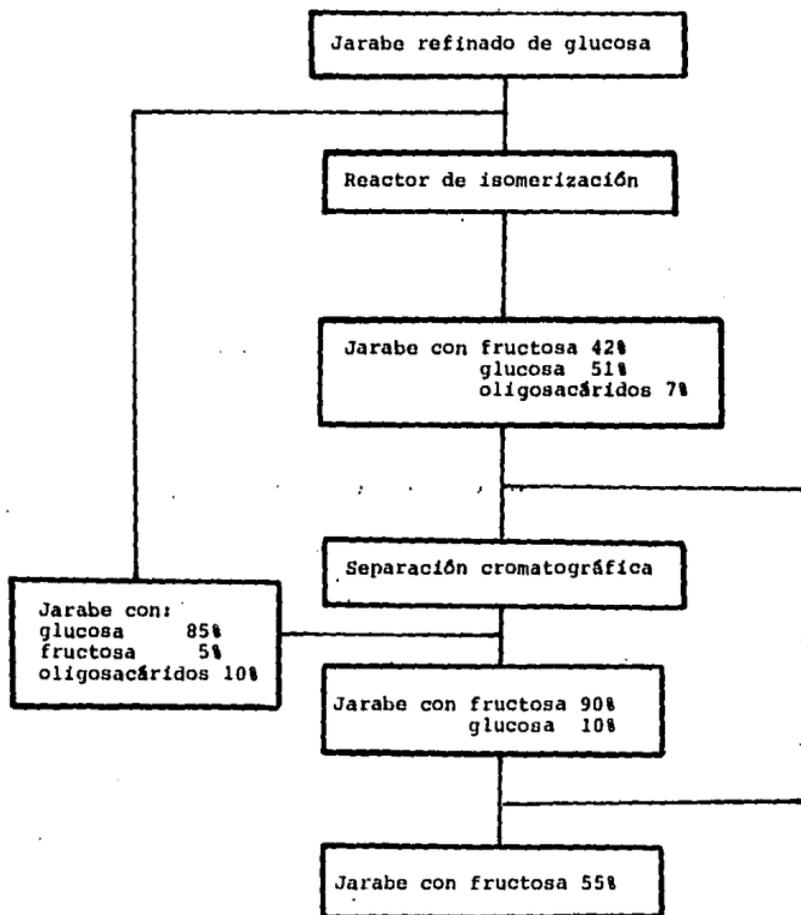


Figura IV Relación costo/producción de diferentes enzimas (24)

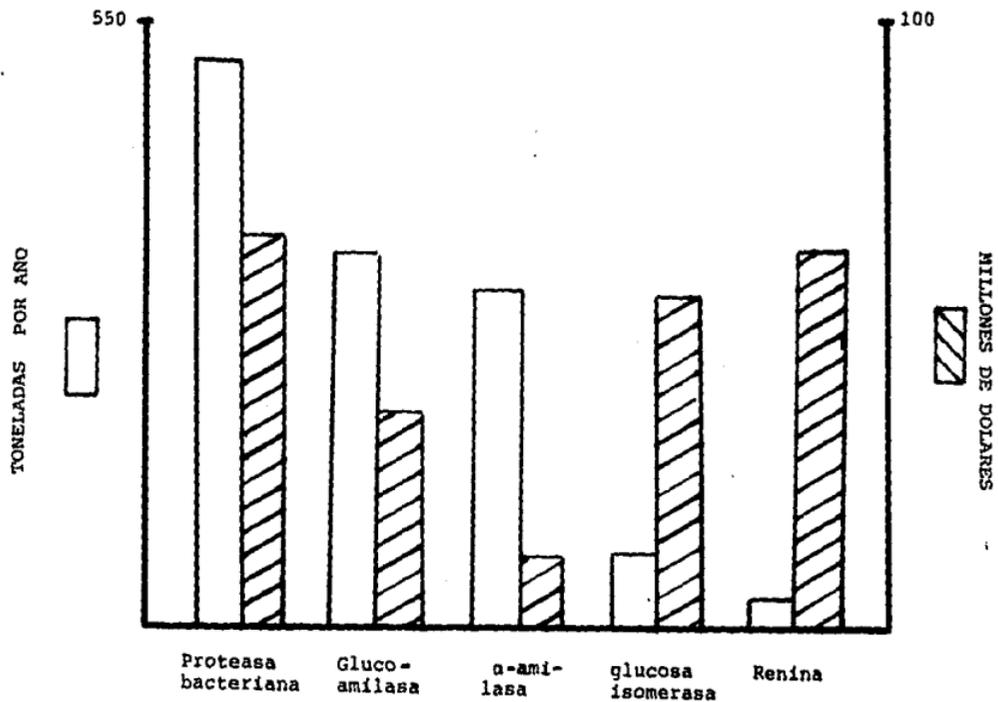


TABLA IV

Microorganismos productores de glucosa isomerasa (17)

Actinoplanes missouriensis NRRL B 3342

Enterobacter aerogenes

Arthrobacter sp. NRRL B 3724, 3725, 3726, 3727 y 3728

Lactobacillus brevis

Leuconostoc mesenteroides

Streptomyces sp.

Streptomyces albus

Streptomyces flavogriseus

Streptomyces venezuelae ATCC 21113

Streptomyces phaeochromogenes SK NRRL B 3559, ATCC 15486

Bacillus coagulans

## IV OBJETIVOS

Con la finalidad de obtener un microorganismo en el que se combinaran las características de alta producción de la enzima, un rápido crecimiento y que la enzima que sintetice tenga las mejores características en cuanto a termoestabilidad, afinidad por el sustrato, especificidad, pH óptimo y requerimiento de co factores, los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Realizar la clonación molecular del gene que codifica la enzima glucosa isomerasa del microorganismo Actinoplanes missouriensis NRRL B 3342 en el vehículo molecular pBR 329.
- 2) Introducir la molécula recombinante en una cepa derivada de Escherichia coli K 802
- 3) Seleccionar aquellas células sospechosas de que hayan adquirido la información de interés.
- 4) Lograr la expresión de la información clonada.
- 5) Caracterizar aquellas cepas que presentan positiva la actividad enzimática de isomerasa.

## V INGENIERIA GENETICA

Para alcanzar los objetivos propuestos se decidió utilizar la metodología de la Ingeniería Genética Molecular, también conocida como recombinación in vitro de ácidos nucleicos, clonación molecular o implantación genética (8, 51).

### 5.1 Generalidades

Una de las mayores controversias en la historia de las ciencias biológicas se mantiene actualmente en relación con la tecnología del DNA recombinante, debido a que junto a los grandes beneficios para la humanidad, la manipulación de los genes también puede implicar riesgos desconocidos.

El principio de esta nueva tecnología, más popularmente conocida como Ingeniería Genética, podemos ubicarlo en 1953 cuando James Watson y Francis Crick dieron a conocer el modelo sobre la estructura y replicación del material genético (hecho por el cual recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina diez años más tarde). Desde entonces el desarrollo del campo de la genética y de la biología ha sido vertiginoso; como resultado de ello, no sólo conocemos detalladamente los fundamentos moleculares de la vida, sino que podemos manipular la información genética y dirigirla a nuestro provecho (51).

### 5.2 Metodología general de la Ingeniería Genética

La técnica experimental de la Ingeniería genética se puede definir brevemente como sigue: dos o más fragmentos de DNA son unidos (recombinados) in vitro mediante el uso de una serie de enzimas. Uno de los fragmentos de DNA llamado vector o vehículo molecular es capaz de replicarse en alguna célula huésped y el otro llamado "pasajero" o "clonado" es pasivamente replicado por el vehículo (8).

Existen una serie de elementos necesarios para poder realizar la recombinación de ácidos nucleicos como son: la cepa donadora de DNA que contiene la información que se desea clonar, el vehículo molecular, las enzimas de restricción, la ligasa y la cepa receptora.

El proceso general de la metodología de la Ingeniería genética se ilustra en la figura V (8).

### 5.3 DNA

En el DNA se encuentra toda la información genética de la célula y el orden de las bases determina cuales proteínas habrán de sintetizarse (67).

Una molécula de DNA contiene una serie de genes y el conjunto de DNA de una célula se le denomina genoma.

### 5.4 Vehículos moleculares

Un vehículo molecular o vector es aquella molécula que posee la habilidad de replicarse y expresar su fenotipo dentro de una célula huésped o receptora y dicha replicación es independiente del genoma celular. Se conocen dos tipos generales de vehículos: los fagos lambdoides o bacteriofagos, y los plásmidos.

Los primeros son vehículos moleculares naturales que en un principio se utilizaron como tales aprovechando su característica de poder infectar a la célula bacteriana, por ejemplo están los derivados del fago lambda llamados carontes; pero su uso se ha restringido debido a que presentan serios inconvenientes como es que el número de enzimas de restricción con las que pueden ser cortados es limitado ya que puede inactivar algún gene que requiera el fago para subsistir.

Por su gran versatilidad, los vehículos moleculares que con mayor frecuencia se emplean para experimentos de clonación son los plásmidos, los cuales se pueden definir como elementos génicos extracromosómicos, capaces de replicarse de manera autónoma y con una gran estabilidad. Los plásmidos se encuentran ampliamente distribuidos entre las bacterias y su número puede variar entre una y varias copias. Poseen secuencias específicas de reconocimiento para una o varias enzimas de restricción, y algunos de sus genes pueden codificar para resistencia a determinados antibióticos, propiedad que puede ser empleada para procesos de selección es decir, cuando un fragmento de DNA es insertado en alguno de los genes que codifican para tal resistencia, la infor-

mación se ve interrumpida y por lo tanto, la célula que adquiriera el plásmido recombinante perderá la capacidad de crecer en ese - antibiótico. A este fenómeno se le conoce como "inactivación in sersional" y es la forma de reconocer aquellas células que con-- tienen plásmido recombinado (un plásmido recombinado es aquel -- que tiene un fragmento de DNA pasajero insertado).

Otra característica de algunos plásmidos, es que se repli-- can en forma "relajada", se les denomina de ésta forma a aque-- llos plásmidos que se replican en forma autónoma del DNA y de es ta forma pueden llegar a constituir hasta un tercio del DNA celu lar total (8).

Otra característica deseable del vehículo es que sólo tenga un sitio único de acción para diferentes enzimas de restricción, ya que de otro modo podría destruirse o alterar los sitios de re plicación. Es importante hacer notar que en la actualidad existe un gran número de plásmidos que confieren resistencias a dife rentes antibióticos.

Se han diseñado y construido sistemas definidos de recombi-- nación para *Escherichia coli* (13) y el género *Bacillus* (4, 5, 39). Otros sistemas están aún en estudio y evaluación como es el caso de Streptomyces (3, 10) y levaduras (62, 63).

En la tabla V se enumeran diferentes vehículos o plásmidos con sus respectivas características.

## 5.5 Enzimas de restricción

La obtención de los fragmentos de DNA y del vehículo puede realizarse por medio de métodos físicos (sonicación, homogeneización) o enzimáticos. El inconveniente que presentan los métodos físicos es que pueden romper los genes de interés, por otra parte, no se podría recuperar el fragmento a partir de un plásmido recombinado por carecer de sitios de corte con enzimas específicas, además de que para poder clonarlo habría la necesidad de agregar extremos cohesivos a el fragmento para poder introducirlo al vehículo, y no se podría realizar el análisis de secuenciación del gen clonado.

Por estos motivos, se prefiere utilizar el método enzimático. Este se realiza por medio de enzimas de restricción que son endonucleasas que reconocen secuencias específicas de bases que se encuentran distribuidas al azar dentro de la molécula de DNA. Este procedimiento se conoce con el término de "digestión" y da como resultado una mezcla de fragmentos de distinto tamaño de cadena de doble hélice que para aumentar la eficiencia en la clonación de un gen determinado puede ser separado por medio de una electroforesis siempre y cuando se conozca el tamaño aproximado del fragmento que se desea clonar.

La idea de utilizar enzimas de restricción surgió cuando se encontró que las células bacterianas eran capaces de alterar, -- romper o modificar el DNA extraño que se introducía en ellas, em

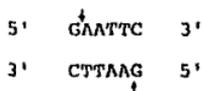
pleando el sistema enzimático de restricción y modificación (53).

En la tabla VI se enumeran algunos ejemplos de los microorganismos productores de este tipo de enzimas, así como las secuencias que reconocen.

Se conocen alrededor de 250 enzimas de restricción sintetizadas por diferentes microorganismos, que pueden ser divididos en forma general en dos grupos (53):

- a) Endonucleasas del tipo I.- Proteínas mutimérica, capaces de modificar y romper el DNA, requieren de iones  $Mg^{++}$ , ATP y de un cofactor llamado S-adenosilmetionina.
- b) Endonucleasas del tipo II.- Proteínas monoméricas, pequeñas, requieren de iones  $Mg^{++}$  y reconocen secuencias específicas y producen fragmentos de DNA con extremos cohesivos.

Los sitios que reconocen las enzimas de restricción del tipo II corresponden a cuatro, cinco o seis pares de bases de longitud, y la mayoría de estos pares muestran simetría entre una cadena y otra del DNA, es decir, la secuencia de nucleótidos de una cadena de DNA es igual a la secuencia nucleotídica de la cadena complementaria cuando cada cadena es leída en la dirección 5' a 3'. Por ejemplo, el sitio de reconocimiento para Eco RI es:



la enzima corta en los puntos indicados por las flechas, quedando los extremos de la siguiente forma:



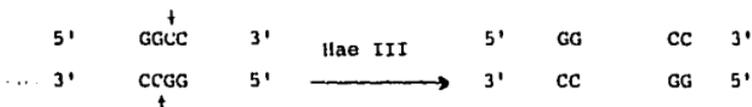
La frecuencia de aparición de los sitios de corte para una enzima dentro de una cadena de DNA se puede calcular por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{frecuencia de sitio} = 1/4^N$$

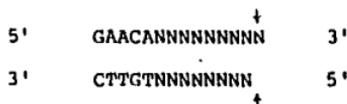
donde N = longitud de la secuencia del sitio de corte, por ejemplo, para una secuencia de 4 nucleótidos la probabilidad será de 1 sitio cada 256 pares de bases, y así respectivamente para cada número de nucleótidos reconocidos. Usando este principio es posible determinar el número de sitios de corte esperados dentro de una molécula de DNA de tamaño conocido:

$$\text{tamaño de molécula (en pares de bases)} \times \text{frecuencia de sitio de corte} = \text{número de sitios probables}$$

Existe otra clase de enzimas de restricción que no generan los extremos cohesivos, sino que cortan la cadena de DNA en el eje de simetría dando como resultado los extremos "rasurados" como ejemplo la enzima Hae III reconoce:



Otro tipo de corte lo representa la enzima Mbo II, la que reconoce la secuencia GAACA (nótese la falta de simetría), y corta entre ocho y nueve residuos posteriores a donde se presenta la secuencia reconocida:



## 5.6 Unión

Una vez obtenido los fragmentos de DNA (tanto del vehículo como del pasajero), se procede a unirlos. La enzima que realiza esta función es una polinucleótido (DNA) ligasa, la cuál cataliza la formación de la unión fosfodiéster entre los extremos 3' (grupo hidroxilo) y 5' (grupo fosfato) de dos nucleótidos adyacentes, reestableciéndose la continuidad estructural de la cadena del DNA.

Se conocen dos enzimas con actividad de ligasa, una proveniente del fago T4, y otra de Escherichia coli, la primera requiere ATP, mientras que la segunda requiere de NAD<sup>+</sup> para poder actuar.

La forma en que actúan ambas se muestra en la figura VI y sólo la ligasa del fago T4 es capaz de unir a los extremos "rasurados" (48).

## 5.7 Cepa receptora

Se conoce con este nombre aquel microorganismo al que se le introduce la información clonada para su posterior expresión (14, 48, 53).

La cepa empleada como receptora debe de carecer o por lo menos tener alterados sus sistemas de restricción y/o modificación ya que de otra forma, la molécula que se le introduzca sería des~~truida~~ trufda.

La cepa que con mayor frecuencia se emplea como receptora - es Escherichia coli, ya que este microorganismo es capaz de "tomar" DNA proveniente del medio ambiente en que se encuentra, o - de ser infectado por un bacteriofago, además de que tanto su genética, como su bioquímica son muy conocidas, su tiempo de duplicación es corto (aproximadamente 20 min.), carece de sistemas de modificación y/o restricción, y requiere de medios sencillos y baratos para crecer, pero presenta el inconveniente de producir metabolitos tóxicos, (15) por lo que su uso está prohibido por - la FDA para el área de alimentos y medicamentos.

Cabe aclarar que una célula receptora es capaz de aceptar - una molécula recombinante solamente.

En la actualidad se ha estudiado la posibilidad de sustituir a Escherichia coli por otros microorganismos como posibles cepas

receptoras, como son la bacteria Bacillus subtilis (39) y la levadura Sacharomyces cerevisiae (33, 44, 62, 63).

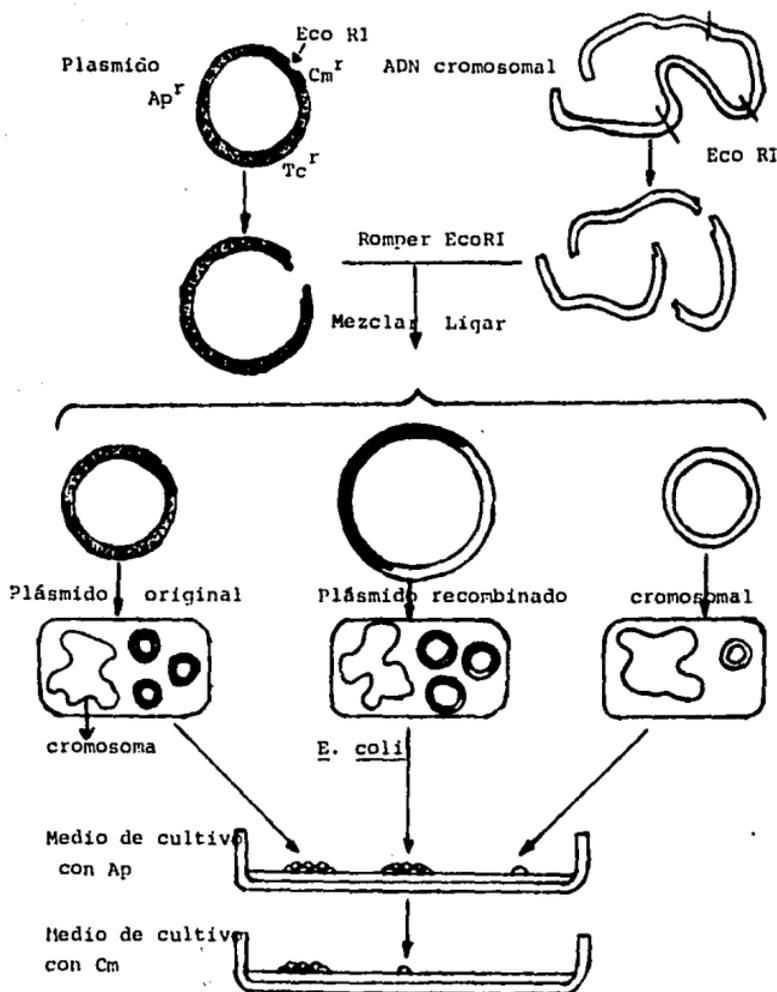


Figura VI Esquema General de Clonación (8)

TABLA V

Plásmidos comunmente usados como vectores moleculares (8)

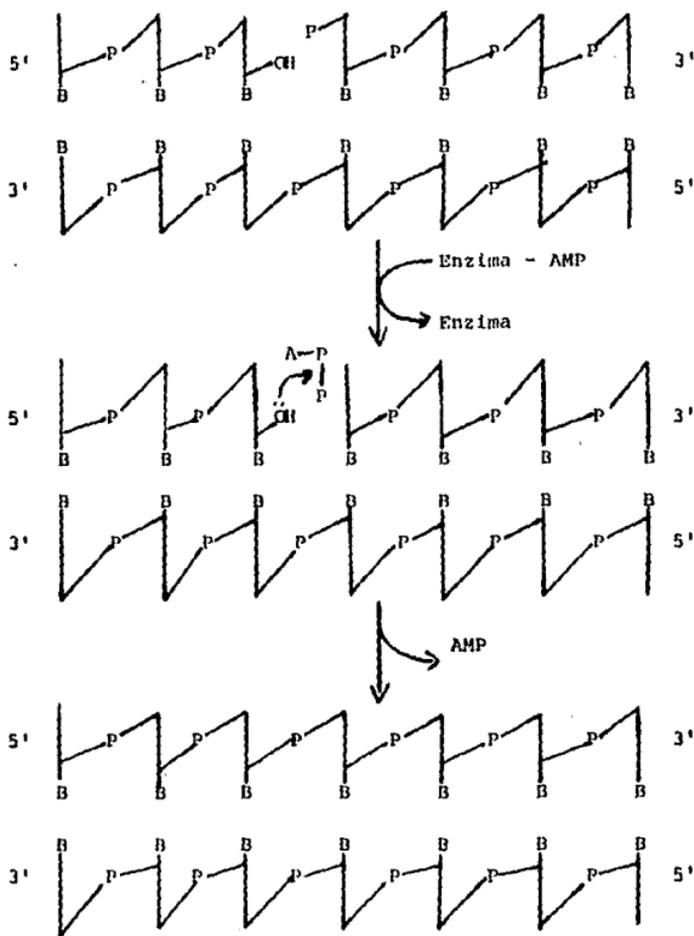
Nombre	Marcadores genéticos	Enzimas con sitio único de restricción	Peso molecular $\times 10^{-6}$
pSC 101	Tc <sup>r</sup>	Eco RI	5.6
pBR 322	Tc <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	Eco RI Hind III Bam HI Sal I Pst I Ava I Pvu II	2.8
pBR 328	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Eco RI Bam HI Hind III Sal I Pst I Pvu I Pvu II Bal I Ava I	3.1
pMB 9	Tc <sup>r</sup> inmunidad a colicina E1	Eco RI Hind III Bam HI Hpa I Sal I	3.5

TABLA VI

Diferentes enzimas de restricción y su acción sobre secuencias específicas (14)

Microorganismo productor	Nombre	Secuencia reconocida
<u>Arthrobacter luteus</u>	Alu I	AG + CT
<u>Bacillus amiloliquefaciens</u>	Dam HI	G + GATCC
<u>Escherichia coli</u> RY 13	Eco RI	G + AATTC
<u>Haemophilus aegyptius</u>	Hae III	GG + CC
<u>Providencia stuartii</u> 164	Pst I	CTGCA + G
<u>Haemophilus influenzae</u> R	Hind III	A + AGCTT
<u>Streptomyces albus</u> G	Sal I	G + TCGAC

FIGURA VI Acción de la DNA ligasa (48)



## VI MATERIAL Y METODOS

## 6.1 MATERIAL

## 6.1.1 Microorganismos

6.1.1.1 Como microorganismo donador de la información se seleccionó al actinomiceto Actinoplanes missouriensis NRRL 3646

6.1.1.2 El plásmido pBR 329 se aisló a partir de la cepa de Escherichia coli GM 31

6.1.1.3 Como microorganismo receptor de la molécula recombinante se usó una mutante derivada de la cepa Escherichia coli K 802 a la que denominamos Escherichia coli K 802 1-25

## 6.1.2 Medios de cultivo

## 6.1.2.1 Medio completo para levaduras (MCL) (57)

Componente	conc. (g/l.)
Extracto de levadura	10
Bactopeptona	20
xilosa*	3
glucosa*	7

Se esteriliza en autoclave a 15 lb por 15 min.

\*se esterilizan por separado

## 6.1.2.2 Medio de Luria (LB) (45).

Componente	conc. (g/L)
- Extracto de levadura	5
Triptona	10
NaCl	10

se esteriliza en autoclave a 15 lb por 15 min.

## 6.1.2.3 Medio mínimo M9 (12)

Componente	volúmen (ml)
Requerimiento de la cepa	4
MgSO <sub>4</sub> 0.1 M	10
CaCl <sub>2</sub> 0.01 M	10
glucosa 20%	20
sales M9 10X *	100
casaminoácidos 20% **	20
agua destilada	835

\* se esterilizan por separado

° sólo se agregan cuando se va a purificar el plásmido.

## 6.1.3 Soluciones amortiguadoras

## 6.1.3.1 Solución amortiguadora Tris Boratos 10X (6)

Componente	conc. (g/L)
------------	-------------

Tris	108
------	-----

EDTA	9.3
------	-----

Acido Bórico	55
--------------	----

No se ajusta el pH, se esteriliza por filtración con membrana millipore 0.45  $\mu$  y se diluye 1:10 al usarlo.

## 6.1.3.2 Solución amortiguadora fosfatos 0.12 M

Componente	conc (g)
------------	----------

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.64
--------------------------	------

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.09
--------------------------	------

se preparan 100 ml del dibásico y se ajusta el pH a 7.8 con el monobásico disuelto en 20 ml de agua destilada.

## 6.1.3.3 Solución amortiguadora A 50 (6)

Componente	conc. (g/L)
------------	-------------

Tris	6.057
------	-------

NaCl	29.220
------	--------

$\text{Na}_2\text{N}_3$	0.065
-------------------------	-------

se ajusta el pH a 8.0 con HCl 10N, se esteriliza por filtración con membrana millipore 0.45  $\mu$

#### 6.1.3.4 Solución amortiguadora Maleatos (29)

Componente	conc. (g/L)
Acido maleico	23.2

se ajusta el pH a 6.8 con NaOH 10N, se esteriliza por filtración con membrana millipore 0.45  $\mu$

#### 6.1.3.5 Solución amortiguadora para la enzima Eco RI (61)

Componente	conc.
Tris	1 M
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
NaCl	1 M

se ajusta el pH a 7.5 y se esteriliza por filtración en membrana millipore 0.45  $\mu$  y se diluye 1:10 al usarse.

#### 6.1.3.6 Solución amortiguadora TE 1X (6)

Componente	conc. (mM)
Tris	10
EDTA	10

se ajusta el pH a 8.0 con NaOH 10N

## 6.1.3.7 Solución amortiguadora T (6)

Componente	conc. (mM)
------------	------------

Tris	20
EDTA	1
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5

se ajusta el pH 8.0 con HCl 1N

## 6.1.3.8 Solución amortiguadora para la enzima ligasa (9)

Componente	conc. (mM)
------------	------------

Tris	0.66
MgCl <sub>2</sub>	66.0
DTT	100.0
ATP	4.0

se ajusta el pH a 7.6 y se guarda en oscuridad, ya que el ATP se hidroliza fácilmente.

## 6.1.4 Soluciones

## 6.1.4.1 Solución de cofactores para determinación de actividad isomerizante (55)

Salas	conc. (M)
-------	-----------

HgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.06
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.006

no necesitan de esterilización, se guarda en refrigeración.

6.1.4.2 Solución de requerimiento para la cepa E. coli  
K 802 (6)

Componente	conc. (g)
------------	-----------

---

metionina	10
-----------	----

agua destilada	10 ml
----------------	-------

se esteriliza por filtración en membrana millipore 0.45  $\mu$  y se toman 4 ml. de esta solución - por cada litro de medio mínimo M9

6.1.4.3 Solución de fructosa 2M (29)

Componente	conc. (g)
------------	-----------

---

Fructosa	90.08
----------	-------

solución amortiguadora maleatos	250 ml
---------------------------------	--------

se esteriliza por filtración con membrana millipore 0.45  $\mu$

6.1.4.4 Solución de Ioduro de Propidio (6)

Componente	conc. (mg)
------------	------------

---

PdI	2
-----	---

agua destilada	1 ml
----------------	------

no es necesario esterilizarlo

## 6.1.4.5 Solución salina

Componente	conc. (g)	
------------	-----------	--

	50 mM	5 M
NaCl	0.585	73.12

se disuelven en 1000 ml. de agua destilada y se esterilizan en autoclave a 15 lb por 115 min.

## 6.1.4.6 Solución NaOH 10N

NaOH	400 g
agua destilada	1000 ml

## 6.1.4.7 Solución HCl 1N

HCl	83.3 ml
agua destilada	1000 ml

## 6.1.4.8 Solución Stop Mix (6)

Componente	conc.
------------	-------

Urea	5 M
Sacarosa	50 g
EDTA	50 mM
azul de bromofenol	0.1g

## 6.1.4.9 Solución de bromuro de etidio (6)

Componente	conc. (g)
------------	-----------

Bromuro de etidio	2.0
agua destilada	50 ml

no hay necesidad de esterilizarla

## 6.1.4.10 Solución de sales m9 10X (12)

Componente	conc. (g/L)
------------	-------------

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	132
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	70
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	30
$\text{NaCl}$	5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	10

## 6.1.4.11 Solución de cloruro de calcio 30 mM (42)

$\text{CaCl}_2$	3.327 g
agua destilada	1000 ml

se esteriliza en autoclave a 15 lb por 15 min.

## 6.1.4.12 Solución de detergente Tritón (6)

Componente	conc. (ml)
Tritón 100X	3
EDTA 0.25 M	75
Tris 1M pH 8.0	15
agua destilada	7

## 6.1.4.13 Solución de lisozima (6)

Componente	conc. (mg)
Lisozima	50
Tris 0.025 M pH 8.0	10 ml

se guarda en alícuotas pequeñas, en refrigeración y se esteriliza por filtración en membrana millipore 0.45  $\mu$

## 6.1.4.14 Solución de antibióticos (6,7)

Antibiótico	conc. (mg/L)
Ampicilina (Sigma)	100
Tetraciclina (Sigma)	10
Cloranfenicol (Sigma)	50
Espectinomicina (Trobin Upjohn)	300

se utilizan por separado, se disuelven en 10 ml de agua destilada y se esteriliza por filtración en membrana millipore 0.45  $\mu$

## 6.1.5 Material

### 6.1.5.1 Material de vidrio

- diverso material de vidrio de laboratorio
- matraces nefelométricos
- perlas de vidrio de diferentes diámetros
- tubos corex de 30 ml
- celdas de cuarzo
- asa para platear
- botella para homogenizar células
- celdas de espectofotómetro

### 6.1.5.2 Material de plástico Nalgene

- probetas de diferentes volúmenes
- vasos de precipitados de diferentes volúmenes
- pipetas desechables de 1.0, 5.0 y 10.0 ml
- cajas petri de 13 x 85 mm
- tubos con tapón de rosca para centrifuga
- puntas de pipetas automáticas de diferentes capacidades
- tubos eppendorff para 500 y 200  $\mu$ l
- tubos de nitrocelulosa para ultracentrifuga
- bolsas de diálisis
- picetas
- botellas para centrifuga de 250 ml
- charolas para baños

## 6.1.5.3 Aparatos

- centrifuga Sorval RC 5
- ultracentrifuga Beckman L8 M
- centrifuga de mesa marca Lourdes
- baño maría con agitación de temperatura constante La-line instruments Inc.
- espectrofotómetro Bausch and Lomb
- incubadora de temperatura constante y agitación New Brunswick Scientific
- refrigerador
- congelador
- columna Pharmacia Fine Chemicals
- colector de fracciones Buchler LC100
- pipetas automáticas de diferentes capacidades Quickpette
- cámara de electroforesis Bio-Rad Laboratories
- homogenizador marca Braun
- potenciómetro marca Beckman 3500
- balanza analítica Sartorius 2432
- autoclave de vapor
- tanque de CO<sub>2</sub>
- agitadora rotatoria
- homba de vacío
- fuente de poder E. C. Apparatus
- cámara fotográfica Polaroid
- sistema de filtración millipore de 10 y 250 ml
- lámpara de luz UV UVSL-25

- rotor SS34 para centrifuga sorval
- rotor GSA para centrifuga sorval
- agitador de tubos Vortex
- mesa para platear
- balanza grantaria OHAUS
- agitadores magnéticos
- bomba peristáltica Pharmacia Fine Chemicals

## 6.2 METODOS

## 6.2.1 Extracción del plásmido (6,31)

- 1) En un matraz de 50 ml. con 10 ml. de medio LB suplementado con ampicilina (100 mg/L) se sembró al microorganismo E. coli GM 31 portador del plásmido pBR 329, el cual se incubó durante 12 horas a 37°C con agitación constante.
- 2) Con este cultivo se inocularon 4 matraces Fernbach con un litro de medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos, se dejaron en agitación a 37°C durante 3 a 5 horas (hasta que las células alcanzaron una lectura de D.O. entre 0.17 y 0.2 a 450 nm).
- 3) En este punto se agregó espectinomomicina (300 mg/L) para obtener el "relajamiento" del plásmido. Se continúa incubando durante 18 horas a 37°C, con agitación constante.
- 4) Después de este tiempo, el cultivo se centrifuga en botellas a 10,000 rpm en rotor GSA durante 10 min. para obtener el paquete celular.
- 5) Las células se resuspenden en una solución de sacarosa 25%, Tris pH 8.0 50 mM, EDTA 1 mM pH 8.0 en una proporción de 10 ml. por litro inicial de medio en baño de hielo.
- 6) Conservando la suspensión celular en baño de hielo, se agregan en el siguiente orden (concentraciones por litro de medio inicial):
 

EDTA 0.25 M pH 8.0	2 ml.
Lisozima	1 ml. (5 mg/ml Tris pH 8.0 0.025M)

RNAasa

0.1 ml.

- 7) Se mezcla suavemente y se deja reposar en baño de hielo por espacio de 15 min. (hay formación de esferoplastos).
- 8) Se agregan 3 ml. de detergente tritón y se deja reposar por espacio de 15 min. en baño de hielo (los esferoplastos son lisados).
- 9) Se centrifuga en tubo con tapón de rosca en rotor SS34 a 17,000 rpm durante 40 min a 4°C.
- 10) Inmediatamente después de sacar de la centrifuga se decanta la fase superior (de consistencia espesa) midiendo el volumen obtenido.
- 11) Una vez conocido el volumen, se agrega 2/3 del mismo de agua estéril, y del nuevo volumen obtenido se agrega 2/3 de fenol saturado, agitando suavemente.
- 12) Se agrega el mismo volumen que se agregó de fenol pero de cloroformo, se mezcla y se centrifuga en botellas en rotor GSA a 4°C a 6,500 rpm durante 10 min.
- 13) Se separa la fase superior, se mide el volumen y se agrega otro volumen igual de cloroformo, se centrifuga a 6,500 rpm durante 10 min. a 4°C.
- 14) Se separa la fase superior, se mide el volumen y se agrega 1/25 del volumen de una solución 5M de NaCl y 2 volúmenes de etanol frío.
- 15) Se deja precipitar durante 12 horas a -20°C.
- 16) Se centrifuga a 15,000 rpm durante 20 min., se elimina el sobrenadante y el precipitado se deja secar al aire.

- 17) Se resuspende en 4 ml. de una solución amortiguadora TE 1X estéril.
- 18) Se guarda en refrigeración.

#### 6.2.2 Separación por columna (6).

- 1) En una columna de Biogel A 50 de aproximadamente 45 cm. de altura por 5 cm. de diámetro, se colocan sucesivamente 2 ml. del plásmido extraído.
- 2) Se agrega con cuidado la solución amortiguadora A 50 hasta llenar la parte restante de la columna.
- 3) La entrada de la columna se conecta a una bomba peristáltica y la salida a un colector de fracciones con un flujo y velocidad tal para que cada muestra sea de 4 ml.
- 4) Se deja transcurrir el tiempo necesario para obtener 40 tubos con muestra.
- 5) Se lee el contenido de cada tubo en el espectrofotómetro a 260 nm (UV) y cuando haya un incremento en la lectura se separan los tubos con dicho incremento.
- 6) Los tubos separados se colectan y se mide el volumen total, dicho volumen se separa en tubos corex para dejar precipitando con 2 volúmenes de etanol frío, y 1/25 de una solución 5M de NaCl, durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 7) Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 14,000 rpm durante 10 min. a  $4^{\circ}\text{C}$  y se elimina el sobrenadante.
- 8) Se deja secar el precipitado obtenido y se resuspende en 5 ml. de una solución amortiguadora TE 1X.
- 9) Se separa en fracciones pequeñas (50 a 60  $\mu\text{l}$ ) y se guar-

da en refrigeración.

### 6.2.3 Purificación por ultracentrifugación. (6, 43)

- 1) Se preparan 6 tubos de 5 ml. de nitrocelulosa agregándoles: 2.2 g de CsCl (muy exacto) y 2.1 ml. de DNA en solu  
ción TE 1X.
- 2) En la oscuridad se agrega a cada tubo 150  $\mu$ l de la solu  
ción de Ioduro de propidio.
- 3) Se colocan los tubos en los soportes del rotor SW 50.1 -  
de la ultracentrífuga y se balancean con aceite mineral
- 4) Se centrifugan a 36,000 rpm durante 20 horas a 20°C.
- 5) Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, se sa-  
can los tubos de su soporte y el gradiente formado podrá  
ser visible con luz UV, la banda superior y más intensa  
será la que contenga el plásmido de interés.
- 6) Se perforan los tubos con una aguja en la parte inferior  
se permite salir gota a gota los gradientes formados y  
cuando toca el turno a la banda de interés se colecta en  
un tubo de plástico estéril, en este paso se recomienda  
el uso de guantes, ya que el Ioduro de propidio puede im  
pregnarse en la piel.
- 7) Esta fracción se pasa por una columna de resina Dowex  
W-XB de 5 cm. de largo por 0.8 cm. de diámetro, para re-  
mover el Ioduro de propidio, y se colecta de nuevo en o-  
tro tubo de plástico estéril y se guarda en refrigeración.

### 6.2.4 Diálisis (6)

- 1) En una bolsa de diálisis se coloca el volumen medido de

DNA obtenido anteriormente.

- 2) Se esterilizan 16 litros de una solución amortiguadora TE pH 8.0 y se colocan 4 litros de ésta en un vaso de precipitado con agitación, se le coloca dentro la bolsa de diálisis con la muestra y se deja dializando en frío (4°C) durante 4 horas.
- 3) Una vez transcurrido el tiempo, se hace un cambio de la solución por otros 4 litros, y se deja dializando en frío por espacio de otras 4 horas.
- 4) Al término de éstas, se hace otro cambio similar al del paso anterior, y se deja en frío dializando durante toda la noche.
- 5) Se hace otro cambio de solución amortiguadora con otro volumen igual y se deja por espacio de 2 horas más.
- 6) Una vez transcurrido este tiempo, se mide el volumen residual de la bolsa de diálisis y se pasa a tubos corex.
- 7) Se agregan 2 volúmenes de etanol frío, y 1/25 del volumen de NaCl 5M, se deja precipitando en frío durante la noche a -20°C.
- 8) Se centrifuga a 15,000 rpm en rotor SS34 por espacio de 15 min. a 4°C, se elimina el sobrenadante.
- 9) El precipitado se deja secar a temperatura ambiente.
- 10) Se resuspende en 0.5 ml. de una solución amortiguadora T 1X y se guarda en refrigeración en alícuotas pequeñas.

#### 6.2.5 Gel de agarosa para electroforesis (6)

- 1) Se pesan 0.380 g de agarosa
- 2) Se colocan en un matraz de 250 ml. y se agregan 50 ml.

de una solución amortiguadora boratos 1X.

- 3) se calienta hasta que se disuelve la agarosa
- 4) una vez disuelta y en caliente se vacía a la cámara de electroforesis previamente armada.
- 5) se deja enfriar, se quita el "neine" y se colocan las --muestras a correr junto con el marcador, que en este caso es una solución de stop mix.
- 6) se aforan los carriles con un poco de la solución amortiguadora de boratos, se agrega el resto en la parte superior e inferior de la cámara.
- 7) se deja correr a 150 volts durante 1.5 horas, con sistema de enfriamiento por agua.
- 8) se saca el gel de la cámara, y se coloca en una solución de bromuro de etidio durante 4 min.
- 9) una vez transcurrido el tiempo se saca y se pasa a una charola con agua destilada durante 10 min.
- 10) se tira el agua y se agrega agua fresca, dejando de nuevo el gel por espacio de 10 min.
- 11) una vez hechos los lavados, se observa con una lámpara de luz UV, lo que permitirá apreciar las bandas o "barridos" del DNA en el gel.
- 12) si se desea se puede sacar una fotografía del gel.

#### 6.2.6 Digestión del DNA (G)

- 1) se toma un control del sistema de digestión el cual contendrá todos los elementos menos la enzima de restricción.
- 2) es recomendable trabajar con volúmenes pequeños para que

la enzima y el DNA no se encuentren diluidos.

3) un ejemplo de un sistema de digestión será:

	Control	Digestión
plásmido	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
enzima*	-	4 $\mu$ l
amortiguador	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
agua estéril	<u>16 <math>\mu</math>l</u>	<u>12 <math>\mu</math>l</u>
volúmen total	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

\*en este trabajo se empleó la enzima Eco RI

4) se deja actuar a 22°C durante 20 horas .

5) se recomienda verificar la "digestión" por medio de un gel.

#### 6.2.7 Unión de los fragmentos de DNA

1) se inactiva la enzima de restricción por medio de calor, sumergiendo el tubo con la mezcla de digestión en agua a 62°C durante 72 segundos.

2) de la mezcla de reacción se toma una alícuota para transformar con ella y de este modo conocer la cantidad de -- plásmido que no se digirió.

3) se deben eliminar las sales, para ello se precipita con 2.5 volúmenes de etanol frío dejando en hielo seco con e tanol durante toda la noche, se centrifuga a 15,000 rpm durante 10 min., se vacía con cuidado y se deja secar.

4) se lava con 500  $\mu$ l de etanol frío al 70% por cada 10  $\mu$ l de volúmen inicial, agregándolas con cuidado del lado con trario a la pastilla formada, se vacía inmediatamente.

- 5) se resuspende la pastilla en agua estéril, la necesaria para que el volumen final tenga una concentración de 0.1  $\mu\text{g}$  por  $\mu\text{l}$ .
- 6) a esta mezcla se le agrega la enzima ligasa (10/ $\mu\text{g}$  DNA) (conc. en exceso) y su respectivo amortiguador 10X para que su concentración final sea 1X.
- 7) como ejemplo se tiene el siguiente sistema:

20 $\mu\text{l}$	volumen de digestión	(2 $\mu\text{g}$ de DNA)
<u>- 2 <math>\mu\text{l}</math></u>	muestra de digestión	(0.2 $\mu\text{g}$ de DNA)
18 $\mu\text{l}$	volumen residual	(1.8 $\mu\text{g}$ de DNA)

los 18  $\mu\text{l}$  de volumen residual se precipitan, lavan etc. y se resuspenden en:

1.8  $\mu\text{g}$  de DNA aprox. en 18  $\mu\text{l}$  de agua estéril, nuestro sistema quedaría entonces:

18 $\mu\text{l}$	volumen residual
1.8 $\mu\text{l}$	ligasa
2.5 $\mu\text{l}$	sol. amortiguador 10X
<u>2.7 <math>\mu\text{l}</math></u>	sol. amortiguadora TE 1X
25 $\mu\text{l}$	volumen total

- 8) se deja actuar toda la noche a 12°C o a 22°C durante 3 horas.
- 9) la reacción se para sumergiendo el tubo durante 3 min. en baño de agua a 68°C.

#### 6.2.8 Transformación (42)

- 1) en un tubo con 10 ml. de medio de LB se coloca una asada del microorganismo receptor.

- 2) se deja crecer toda la noche a 37°C con agitación constante
- 3) de este inóculo se toman 0.3 ml. y se inoculan 30 ml. de me dio fresco de JB, se incuban a 37°C hasta que la lectura de absorbancia a 540 nm sea de 0.2 a 0.3 de D.O., usando como blanco medio de luria estéril sin inocular (esto sucede aproximadamente 2 horas después de haber inoculado).
- 4) se vacía el cultivo a tubos de centrifuga estériles y se centrifuga a 4°C a 10,000 rpm durante 10 min. para obtener el paquete celular.
- 5) se desecha el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en 30 ml. de una solución estéril y fría de NaCl 10 mM (para eliminar residuos del medio de cultivo).
- 6) se centrifuga de nuevo a 4°C a 10,000 rpm por 10 min.
- 7) se elimina el sobrenadante y el paquete celular se resuspende en 15 ml. de CaCl<sub>2</sub> 30 mM estéril y frío (esta solución permeabiliza la membrana).
- 8) se deja en contacto durante una hora en baño de hielo.
- 9) se centrifuga 10 min. a 10,000 rpm a 4°C y la pastilla de bc adquiere una forma semejante a un corazón (esto indica que el CaCl<sub>2</sub> actuó sobre la membrana).
- 10) se decanta y se resuspenden las células cuidadosamente en 3 ml. de CaCl<sub>2</sub> 30 mM estéril y frío, se conserva en un ba ño de hielo, cuidando que el contacto entre el CaCl<sub>2</sub> y las células no se prolongue demasiado para evitar la extrema sensibilización de la pared.
- 11) Se agregan 100 µl de DNA\* a 0.2 ml. de células resuspendidas en CaCl<sub>2</sub>, tomando un control con 100 µl de CaCl<sub>2</sub> sin DNA.

\*estos 100  $\mu$ l pueden tener diferentes concentraciones de DNA y se recomienda que ésta concentración no sea mayor de 200 ng (0.2  $\mu$ g).

- 12) se deja en hielo durante una hora.
- 13) una vez transcurrido el tiempo, se da un choque térmico a 42°C durante 72 segundos.
- 14) se pone en hielo durante 5 min.
- 15) se agrega a cada tubo 3 ml. de medio de Luria estéril.
- 16) se incuban con agitación a 37°C durante dos horas
- 17) se platea 0.2 ml. de estos tubos en cajas con el medio de selección.
- 18) se incuban las cajas a 37°C durante toda la noche.

#### 6.2.9 Selección de recombinantes (6).

- 1) Para conocer la viabilidad celular del procedimiento de transformación, en forma paralela se realiza un control con  $\text{CaCl}_2$  sin DNA. De esta condición se hacen diluciones sembrando 0.2 ml. en medio de luria de las diluciones altas, se incuban toda la noche a 37°C y se cuentan las colonias obtenidas.
- 2) de los tubos con medio de luria se siembran alícuotas de 0.2 ml. a cajas con medio completo suplementado con ampicilina, las cuales se incuban a 37°C durante toda la noche.
- 3) las colonias que crecieron en el medio completo más ampicilina son replicadas a cajas con medio completo suplementado con cloranfenicol, numerando cada colonia que se replica. Se dejan incubar a 37°C durante toda la noche.

- 4) las colonias que no hayan crecido en el medio suplementado con cloranfenicol son replicadas a cajas con medio mínimo M9 con xilosa como fuente de carbono. Se dejan incubar a 37°C durante 48 horas.
- 5) las colonias que hayan crecido en el medio mínimo con xilosa como fuente de carbono, son probadas en cajas de medio completo más ampicilina, para poder realizar pruebas posteriores.

#### 6.2.10 Determinación de la actividad enzimática (29,55,56).

- 1) Preinóculo: en un tubo con tapón de rosca con 10 ml. de medio de luria, se coloca una asada de las colonias sospechosas (un tubo por cada colonia), y se dejan incubar a 37°C durante toda la noche con agitación constante.
- 2) se inocula con esta muestra matraces Erlenmeyer de un litro con 250 ml. de medio de LB suplementado con xilosa (0.5%) se deja durante toda la noche con agitación a 37°C
- 3) se centrifugan y se resuspenden en 50 ml. de una solución amortiguadora de maleatos pH 6.8
- 4) se centrifugan y se resuspenden el vacueto en 30 ml. de la solución amortiguadora de maleatos pH 6.8.
- 5) se rompen las células por homogenización en un homogenizador Braun durante 45 segundos con perlas de vidrio de 0.1 y 0.45 mm de diámetro.
- 6) se centrifuga el homogenizado a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min.
- 7) se conserva el sobrenadante en un baño de hielo.

- 8) se preparan los sistemas de reacción en tubos de 10 ml. con los siguientes elementos:

Solución de fructosa 2M	2.5 ml.
Solución de sales cofactores	0.5 ml.
Sobrenadante	2.0 ml.
volumen total	5.0 ml.

- 9) se incuban los sistemas a 50°C en baño maría durante una hora.
- 10) las muestras se congelan para detener la reacción sumergiendo los tubos en hielo seco con etanol.
- 11) se les determina glucosa por el método de glucostat. (ver método 6.2.14).

#### 6.2.11 Curva de crecimiento

- 1) se prepara un inóculo en tubos de tapón de rosca con 10 ml. de medio de LB, a 37°C durante toda la noche.
- 2) el cultivo obtenido se centrifuga y la pastilla se resuspende en 5 ml. de la solución salina 10 mM estéril
- 3) se centrifuga y la pastilla se resuspende en 5 ml. de la solución salina.
- 4) se inoculan con esta suspensión de células los matraces nefelométricos de 250 ml. con 50 ml. de medio mínimo M9 suplementado con xilosa como fuente de carbono (0.5%).
- 5) se incuban los matraces a 37°C con agitación constante.
- 6) se toman lecturas a 540 nm cada hora en el espectrofotómetro calibrando con medio mínimo M9 sin inocular.
- 7) se grafican los datos en papel semilogarítmico (D.O.vs.T).

### 6.2.12 Determinación de protefna (40).

- 1) del sobrenadante obtenido después de la homogenización se toman alícuotas de 200  $\mu$ l, a las cuáles se les determina concentración de proteínas por el método de Lowry (40), utilizando como referencia una solución de albúmina sérica bovina.

### 6.2.13 Determinación de la afinidad por el sustato

- 1) se sigue el mismo procedimiento que para la determinación de actividad isomerizante (ver 6.2.10).
- 2) los sistemas de reacción serán ahora con diferentes concentraciones de fructosa (0.25M, 0.5M, 1.0M, 2.0M y 3.0M) usandolas en la misma proporción

solución de fructosa	2.5 ml.
solución de sales cofactores	0.5 ml.
sobrenadante	2.0 ml.
volumen total	5.0 ml.

- 3) se incuban los tubos a 50°C durante una hora
- 4) se congelan las muestras para detener la reacción
- 5) se determina glucosa (ver 6.2.14)
- 6) se grafican los resultados de actividad específica (mg de glucosa/mg de protefna/min.).
- 7) se grafican 1/V vs 1/(S) para determinar  $K_m$  gráficamente

### 6.2.14 Determinación de glucosa (GB)

- 1) de los sistemas de reacción se toman 200  $\mu$ l, se colocan en tubos de 10 ml. agregándoles 5 ml. de la solución de glu-

postat, se agitan y se dejan reposar alrededor de 30 min. leyendo a 594 nm el color desarrollado.

- 2) se ajusta el espectrofotómetro con una solución estandar de glucosa de concentración conocida.

## VII RESULTADOS

### 7.1 Obtención del DNA donador de la información

Extracción del DNA cromosómico se realizó basándose en la técnica reportada por Marmur en 1961, con modificaciones de Cantoni 1967 y Hopwood 1975 (6).

La técnica de Marmur se basa en la eliminación de las proteínas celulares mediante extracciones con fenol y cloroformo y la degradación del RNA por medio de una ribonucleasa. Además, debido a que la pared celular de este microorganismo es difícil de romper, para lograrlo hubo necesidad de utilizar detergente, enzimas y cambios de temperatura.

En el momento en que se inició este proyecto, se contaba en el laboratorio con una cantidad suficiente de DNA cromosómico en las condiciones requeridas de concentración e integridad para ser utilizado. En la figura VII se muestra la fotografía de una electroforesis en un gel de agarosa del DNA cromosómica disponible y de ésta podemos concluir que no está degradado, y sí lo suficientemente puro para poder ser empleado en la realización de éste proyecto (carril A). Adicionalmente, como control de pureza, y sensibilidad a las enzimas de restricción en el carril B de dicha electroforesis puede observarse la digestión de dicho DNA con la enzima de restricción Bam III, la cual ha sido reportada en otros trabajos de clonación en los que se

han utilizado los vehículos moleculares de los cuales proviene el plásmido pBR 329.

## 7.2 Purificación del vehículo molecular.

Con la finalidad de obtener una cantidad suficiente del plásmido con el cual se realizó este trabajo (pBR 329) se empleó la técnica del lisado claro (31). Para ello, la cepa portadora del vehículo (E. coli GN 31) fué criada en medio mínimo suplementado con casaminoácidos (20%), y el plásmido fué amplificado empleando el antibiótico espectinomina (300 mg/L), obteniéndose al final del proceso un rendimiento de 125 mg por cada litro de medio de cultivo.

En la figura VIIJ se puede apreciar la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 0.85%, conteniendo tres concentraciones diferentes del plásmido obtenido en el laboratorio. La presencia de varias bandas en cada carril significa que el plásmido se encuentra en forma jultimérica (conglomerado de plásmidos), las siguientes bandas corresponden a otras formas tales como la dímérica (dos plásmidos unidos), la monomérica circular y la forma lineal, respectivamente.

Entre más se desplace una banda hacia el extremo inferior del gel, significa que la forma se va simplificando y en algunos casos el tamaño de los fragmentos de DNA va disminuyendo.

### 7.3 Digestión del vehículo y del DNA donador

Para poder formar una molécula recombinante, es necesario cortar el vehículo y el DNA donador mediante la acción de una enzima de restricción.

Seleccionamos a la enzima de restricción Eco RI porque el vehículo que utilizamos posee un sitio único de corte para esta enzima, justamente en el gene que codifica para la resistencia al cloranfenicol, lo que se traduce en un procedimiento de fácil detección de las moléculas recombinantes. Por otra parte, el DNA donador es sensible a esta enzima, y además, disponíamos de una cantidad suficiente de la enzima para poder realizar este trabajo.

Probamos la sensibilidad del plásmido de poder ser cortado por la enzima Eco RI y los resultados se muestran en la fotografía número IX.

Como se puede apreciar en esta fotografía, cuando el plásmido es "digerido", con la enzima mencionada, la banda o bandas que lo integran disminuyen de intensidad o desaparecen, obteniéndose por otro lado una nueva banda localizada más abajo, ésta se debe a que el plásmido se abre y por ello se desplaza más sobre el gel.

Con respecto al DNA donador, se puede apreciar un "barrido" de la banda original, lo que se debe interpretar como la fragmentación del mismo en pedazos de diversos tamaños y peso molecular por efecto de la enzima de restricción.

#### 7.4 Unión de los fragmentos de DNA

Una vez establecidas las condiciones de "digestión" tanto para el plásmido como para el DNA donador, el siguiente paso fué unirlos para formar las moléculas recombinantes; para ésto se utilizó la enzima ligasa T4 y se siguió la técnica descrita por Dugaiczky y Goodman en 1975 (21), para unir fragmentos de DNA digeridos con Eco RI.

Este procedimiento experimental puede dar origen al menos a tres posibilidades de unión: el plásmido unido a un fragmento de DNA donador, el plásmido unido a sí mismo, y fragmentos de DNA unidos entre sí.

Para aumentar la probabilidad de unión entre el vehículo y el DNA donador, trabajamos con una mezcla que contenía plásmido y DNA en una proporción de 1:10 respectivamente. Dicha reacción se llevó a cabo en un sistema conteniendo la enzima en una relación de 1  $\mu$ l por cada 3  $\mu$ g de DNA total, (20U/ $\mu$ l de ligasa) a 12°C y pH 8.0 durante 16 horas de incubación. En este sentido la eficiencia de la enzima fué previamente constatada ligando una muestra digerida de DNA cromosómico (figura X).

Los resultados de este procedimiento experimental fueron evaluados en un paso posterior al determinar el número de células recombinantes por cada  $\mu\text{g}$  de DNA de plásmido.

#### 7.5 Características de la cepa receptora

Entre las propiedades deseables para una cepa que será empleada como receptora de la molécula recombinante está el contar con sistemas inactivos de modificación ( $m$ ) y restricción ( $r$ ). Tal característica es importante para prevenir la digestión o alteración de la información genética que se desea introducir. En nuestro laboratorio ya contábamos con una cepa receptora de Escherichia coli denominada K 802 con fenotipo  $r^-$ ,  $m^-$ . Adicionalmente, esta cepa es sensible a los antibióticos ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol, situación que permite el reconocimiento de las transformaciones que hayan adquirido con el plásmido pBR 329 en su forma íntegra o recombinada, la propiedad de ser resistentes a alguno de estos antibióticos.

Por otro lado, y con el fin de reconocer a la recombinante deseada (productora de glucosa isomerasa) fue necesario disponer de una mutante no productora de dicha enzima a partir de la cepa K 802. Para ello, se aisló una cepa incapaz de utilizar D-xilosa como única fuente de carbono para crecer (25). Dicho carbohidrato requiere ser isomerizado por esta enzima a su cetosa correspondiente (xilulosa) antes de servir como fuente de carbono para la célula. De este modo, la mutante ofrece un mé-

todo de reconocimiento positivo para el aislamiento de la recombinante mencionada.

Una colonia aislada con estas características, denominada K 802 1-25, fué incapaz de crecer en D-xilosa. Este fenotipo, fué observado aún en elevadas concentraciones del carbohidrato (figura XI). Adicionalmente, y de acuerdo a su comportamiento, la actividad isomerizante observada en esta mutante, disminuyó entre un 75 y 80% en relación a la cepa K 802 (figura XII).

#### 7.6 Transformación

Una vez ligados entre sí los fragmentos de DNA donador con el plásmido pBR 329, se procedió a introducir por transformación, las moléculas resultantes a la cepa receptora previamente obtenida (K 802 1-25).

En el presente estudio, la transformación fué realizada de acuerdo al método reportado por Cohen en 1972 (13), el cual involucra un tratamiento de las células receptoras con cloruro de calcio 30 mM para permeabilizarlas a la entrada de las moléculas de DNA.

Adicionalmente a la exposición de la cepa receptora a las moléculas formadas de DNA, se incluyeron diversos controles para determinar la eficiencia del procedimiento. Así, por ejemplo, se añadieron condiciones con el plásmido original, con el

plásmido digerido y con el plásmido digerido y ligado a sí mismo, adicionando una condición sin DNA para eliminar problemas secundarios resultantes de la exposición de la cepa receptora al cloruro de calcio.

En la Tabla VII se muestran los resultados obtenidos después de transformar la cepa receptora de Escherichia coli K 802 1-25. Como puede observarse, en esta misma tabla, la eficiencia de transformación (número de células transformadas por cada  $\mu\text{g}$  de DNA de plásmido) fué proporcional a la integridad del plásmido empleado. Asimismo, fué posible obtener, dentro de las células transformantes, un número determinado de recombinantes.

#### 7.7 Reconocimiento de recombinantes

##### 7.7.1 Por su resistencia y sensibilidad a distintos marcadores.

De entre las transformantes obtenidas, las recombinantes pueden ser fácilmente distinguidas por su sensibilidad al antibiótico cloranfenicol, resultante a su vez, de la inactivación insercional conferida por la incorporación de un fragmento de DNA donador en el gene que codifica para la resistencia a dicho metabolito. Este fenotipo, como se comprende, deriva de haber empleado la enzima Eco RI para digerir, así como el plásmido pBR 329.

Mediante este procedimiento fué posible aislar un total de 5 recombinantes, las cuales corresponden a un 2.8% en relación al número de transformantes totales (tabla VII).

#### 7.7.2 Por su crecimiento en placas con xilosa como fuente de carbono.

Con el fin de distinguir a las recombinantes deseadas, las copas sospechosas obtenidas fueron a su vez replicadas en medio mínimo con xilosa como fuente de carbono.

Como resultado de este procedimiento, de las cinco recombinantes probadas, tres colonias presentaron el fenotipo buscado: xil<sup>+</sup>, r<sup>-</sup>, m<sup>-</sup>, Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>S</sup>, este número corresponde a el 1.68% en relación al número de transformantes totales. A estas cepas se les denominó 294, 374 y 503 respectivamente.

Posteriormente se procedió a caracterizar a las recombinantes sospechosas con el fin de determinar si efectivamente habían adquirido la información genética que codifica para la enzima isomerasa, o bien si se trataban de colonias revertantes o mutantes regulatorias.

### 7.8 Caracterización de las recombinantes obtenidas

#### 7.8.1 Por su crecimiento en medio mínimo líquido con xilosa como única fuente de carbono.

Para este objetivo las tres recombinantes sospechosas fueron crecidas en medio mínimo suplementado con 0.5% de xilosa como única fuente de carbono.

Como puede observarse en la figura XIII las cepas recombinantes presentan una disminución significativa en la velocidad específica de crecimiento en relación a la cepa K 802. Aún y cuando todas las recombinantes y la cepa K 802 alcanzan su idiofase alrededor de las 12 horas, el crecimiento máximo obtenido en dos de ellas fué menor y solamente la cepa 503 se aproximó a la cepa de referencia en su crecimiento. En base a estos resultados esta última cepa fué seleccionada para continuar con los estudios de caracterización.

Hay que destacar sin embargo, que en relación a la cepa K 802 la mutante K 802 1-25 solamente incrementó su biomasa en un 4%, mientras que las recombinantes 294 y 374 la incrementaron en un 20% y la recombinante 503 en un 70%. Este comportamiento puede ser observado en la tabla VIII.

#### 7.8.2 Actividad isomerizante

Con el fin de profundizar en la caracterización de la cepa recombinante 503, su actividad isomerizante fué determinada midiendo su propiedad para convertir la fructosa a glucosa. Para ello, la cepa fué crecida durante 14 horas a 37°C en medio completo suplementado con D-xilosa al 0.5% como inductor.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la figura XIV. Como puede notarse, la cepa 503 presenta un incremento de casi 5 veces en su actividad con respecto a la cepa receptora K 802 1-25, y de 2.5 veces en comparación a la cepa K 802.

### 7.8.3 Afinidad por el sustrato

Con el fin de discernir si la actividad que estaba siendo expresada correspondía a la cepa donadora de la información o solamente era una reversión de la cepa receptora a su estado original, se determinaron los valores de Km para fructosa, tanto en la cepa recombinante 503, como en la cepa original K 802. Asimismo en este experimento se incluyó al microorganismo donador de la información (Actinoplanes missouriensis). Para ello las células fueron crecidas durante 14 horas a 37°C de temperatura en medio completo suplementado con D-xilosa al 0.5%.

Como puede observarse, (tabla IX), el valor de Km que presenta la recombinante es más semejante al valor presentado por el microorganismo donador de la información que el mostrado por la cepa receptora. La afinidad de la isomerasa de Actinoplanes missouriensis por su sustrato, resultó mayor que la observada en la cepa receptora, información que es congruente con la capacidad de la enzima para isomerizar fructosa.

## 7.9 Genética

### 7.9.1 Presencia del inserto

Para verificar si el plásmido era recombinante, se procedió a digerirlo de nuevo con la enzima Eco RI para extraer el fragmento que pudo haberse insertado en el vehículo.

Con la mezcla de digestión se hizo un gel de agarosa al 0.85% cuya fotografía se muestra en la figura XV.

Como se puede apreciar, en el carril que corresponde al plásmido recombinante digerido aparecen dos bandas, una de ellas corresponde al vehículo abierto, y la otra a un fragmento de DNA de aproximadamente 800 pares de bases (calculado por el desplazamiento de la banda en el gel comparando con un control de peso molecular conocido, el dato no se muestra), que bien pudiera contener la información necesaria para la síntesis de la glucosa isomerasa.

### 7.9.1 Retransformación

Para comprobar si era la presencia del plásmido quien estaba confiriendo a la cepa receptora (E. coli K 802 1-25) la propiedad de crecer en xilosa, se procedió a extraer el plásmido recombinante a la cepa 503, con el fin de volver a transformar la misma cepa receptora K 802 1-25. De esta transformación se

obtuvieron 80 colonias y todas presentaban el siguiente fenotipo: Ap<sup>r</sup>, Cm<sup>s</sup>, Tc<sup>r</sup>, xil<sup>+</sup>, de éstas, se seleccionó una de ellas (denominada No. 15) con el fin de volver a determinarle su capacidad de crecimiento en xilosa, figura XVI, así como su actividad isomerizante. En esta ocasión, la actividad obtenida para la cepa 15 fué casi 2 veces mayor que la cepa original y 5 veces mayor que la cepa receptora. Esto se esquematiza en la figura XVII.



Fig. VII Electroforesis en gel de agarosa del DNA cromosomal de

Actinoplanes missouriensis

Carril A) contiene 1  $\mu\text{g}$  de DNA extraído de acuerdo a una modificación del método de Marmur 1961, Carril B) contiene 1  $\mu\text{g}$  de este mismo DNA pero digerido con Bam HI durante 14 horas a 37°C en un sistema de reacción compuesto por 1  $\mu\text{g}$  de DNA, 1  $\mu\text{g}$  de solución amortiguadora Tris (10 mM) EDTA (1 mM) pH 8.0, 1  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora para Bam HI (10X) 1  $\mu\text{l}$  de Bam HI (10/  $\mu\text{l}$ ) y 10  $\mu\text{l}$  de agua estéril.

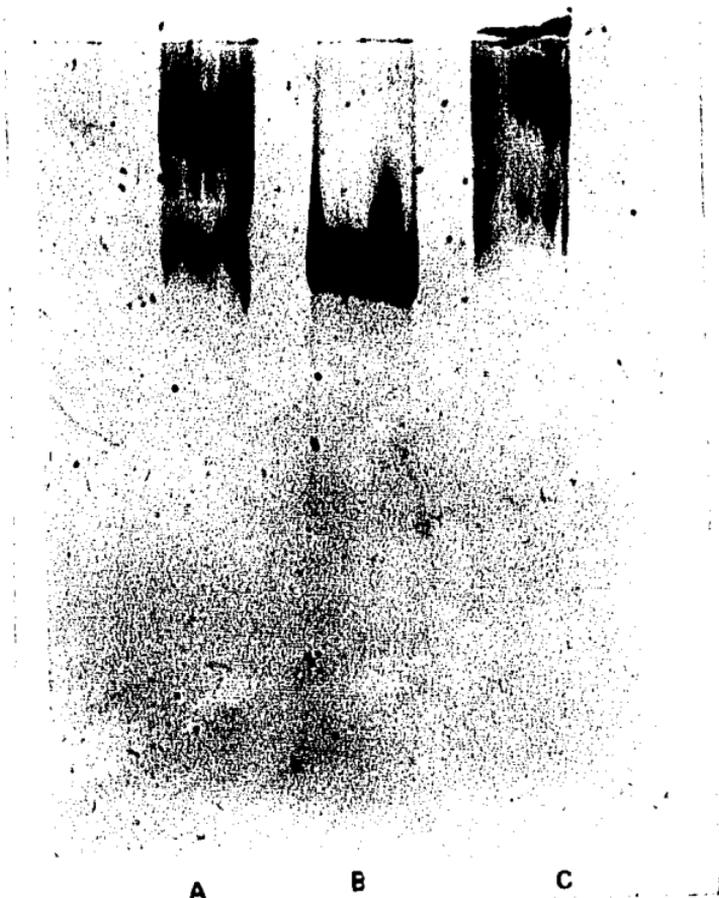


Fig. VIII Electroforesis en gel de agarosa del plásmido

pBR 329 extraído y purificado

Se aplicaron al gel 1, 5 y 10  $\mu$ l de una solución del plásmido conteniendo 1  $\mu$ g/ $\mu$ l en los carriles A, B y C respectivamente

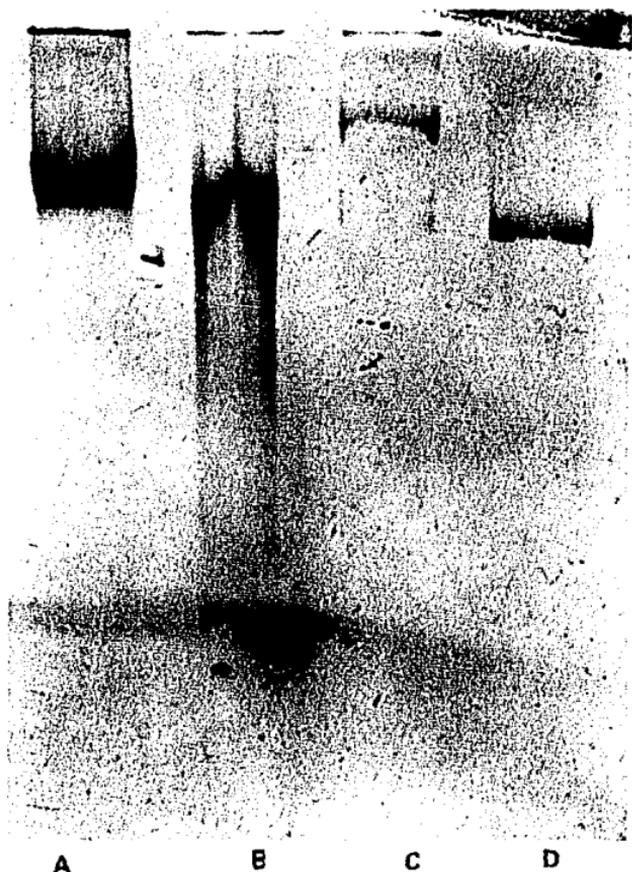


Fig. IX Electroforesis en gel de agarosa de muestras de DNA cromosómico de Actinoplanes missouriensis y de plásmido -- pBR 219.

Carriles B y D) muestras de DNA cromosómico y de plásmido digeridos con la enzima de restricción Eco RI respectivamente, en un sistema de reacción compuesto por 1  $\mu$ l de DNA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l de enzima (10/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de solución amortiguadora para Eco RI (10X) y 6  $\mu$ l de agua estéril. Carriles A y C) conteniendo 1  $\mu$ g de DNA cromosómico y de plásmido sin digerir respectivamente.

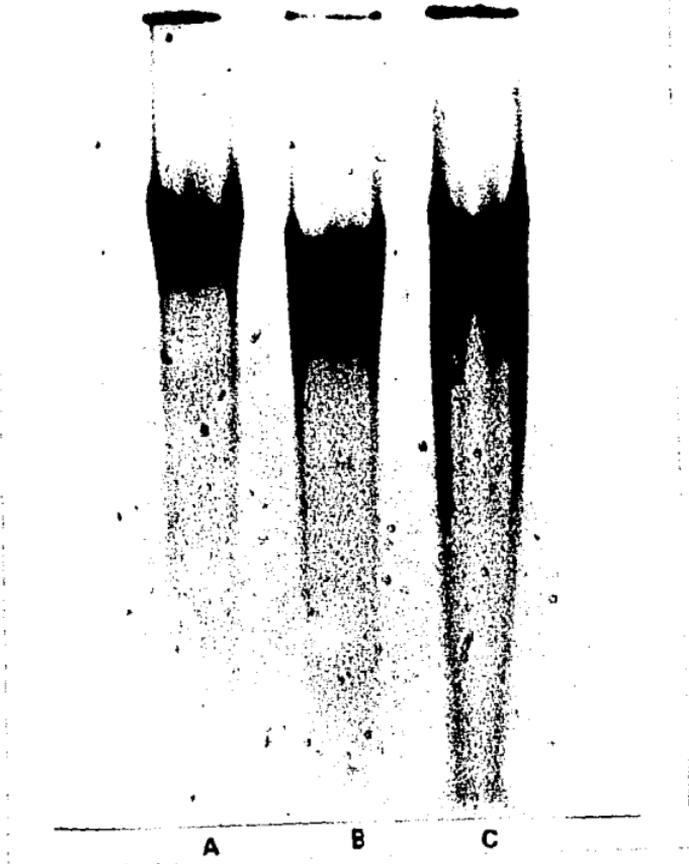


Fig. X Unión de los fragmentos de DNA

Carril A) DNA cromosómico sin digerir (1  $\mu$ g)

Carril B) DNA cromosómico (1  $\mu$ g) digerido con Bam HI  
en una proporción de 1U/ $\mu$ g de DNA.

Carril C) DNA cromosómico (1  $\mu$ g) ligado con enzima liga  
sa T4 de BRL (1  $\mu$ l) a 4°C durante 16 horas.

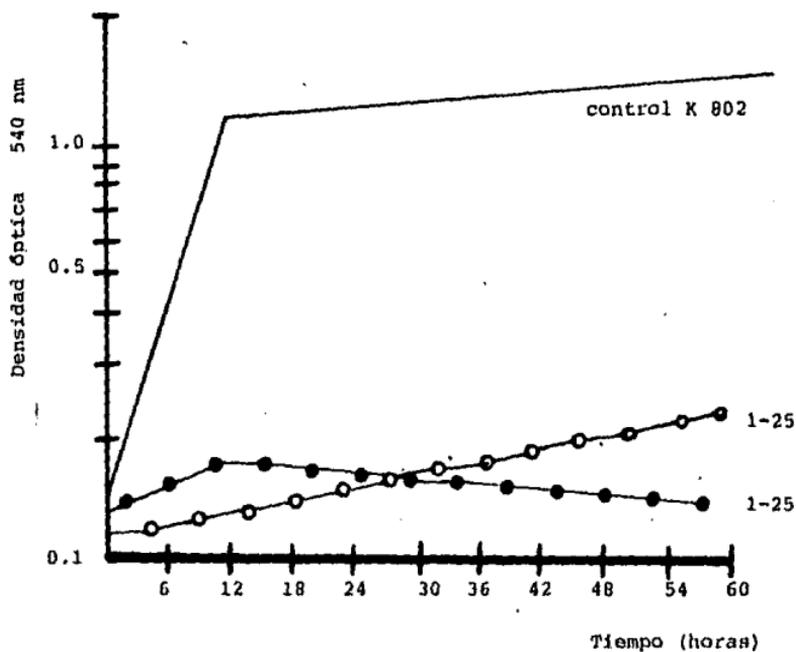


Figura XI. Curva de crecimiento de dos cepas de Escherichia coli  
 Curva de crecimiento de las mutantes K 802 y K802 1-25  
 (x11) en medio mínimo suplementado con dos concentra-  
 ciones de D-xilosa. Al 0.5% (●) y al 3% (○).

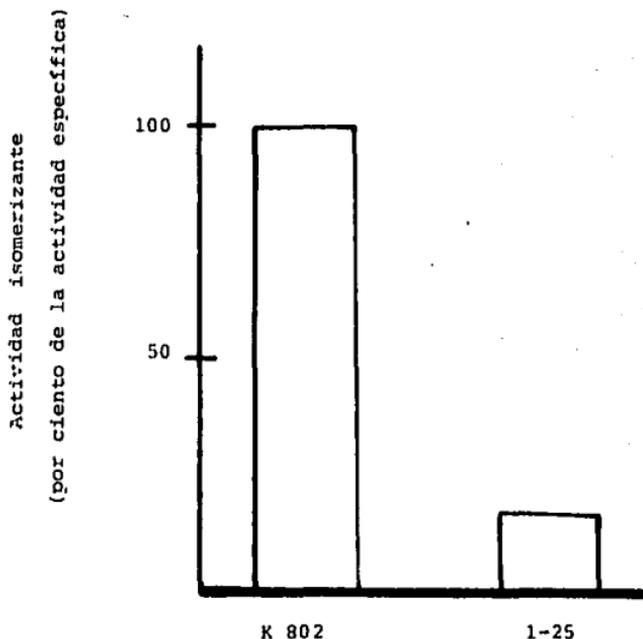


Figura XII. Actividad específica de la enzima glucosa isomerasa

Actividad isomerizante en dos copas de Escherichia coli crecidas en medio completo suplementado con 0.5% del carbohidrato D-xilosa. La actividad fué determinada en un sistema de reacción de 5 ml. (con 2 ml. de extracto celular, 0.5 ml. de sales cofactores y 2.5 ml. del sustrato D-fructosa 2 M) a 60°C de temperatura y 1 hora de incubación.

TABLA VII

Resultado de la transformación de la cepa receptora Escherichia coli K 802 1-25

Origen del DNA	Concentración de DNA total empleada para transformar (µg).	# de células transformadas por µg de DNA de plásmido	# de células recombinantes por µg de DNA de plásmido
Sin DNA	0.0	0	0
Plásmido entero	0.2	13,900	0
Plásmido digerido	0.3	110	0
Plásmido digerido y ligado	0.5	7,980	0
Plásmido y DNA cromosómico digerido y ligado	0.39 <sup>a</sup>	5,014	142.8

<sup>a</sup> La concentración de plásmido y DNA cromosómico empleada en esta relación fué de: 0.0355/0.355 respectivamente ( µg de DNA)

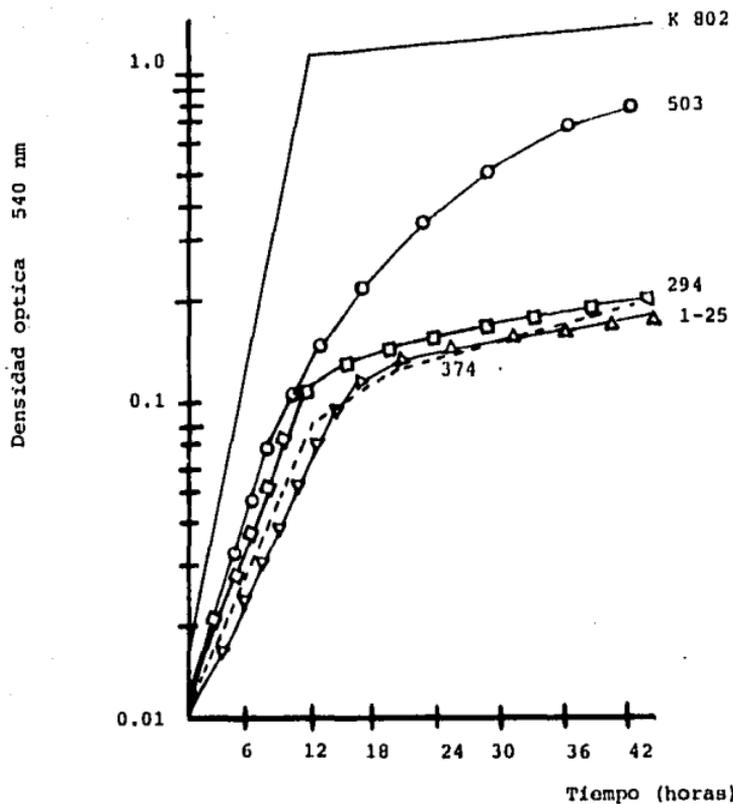


Figura XIII. Curva de crecimiento de las recombinantes obtenidas a partir de la mutante K 802 1-25 ( $xil^-$ ) en medio mínimo suplementado con D-xilosa al 0.5%.

TABLA VIII

Incremento en la biomasa de diferentes cepas de Escherichia coli

Cepa	No. de veces que las cepas fueron capaces de incrementar su biomasa <sup>a</sup>
K 802	50
K 802 1-25	2
294	10
374	10
503	35

<sup>a</sup> Las cepas fueron crecidas durante 42 horas en medio mínimo suplementado con D-xilosa al 0.5% como fuente de carbono.

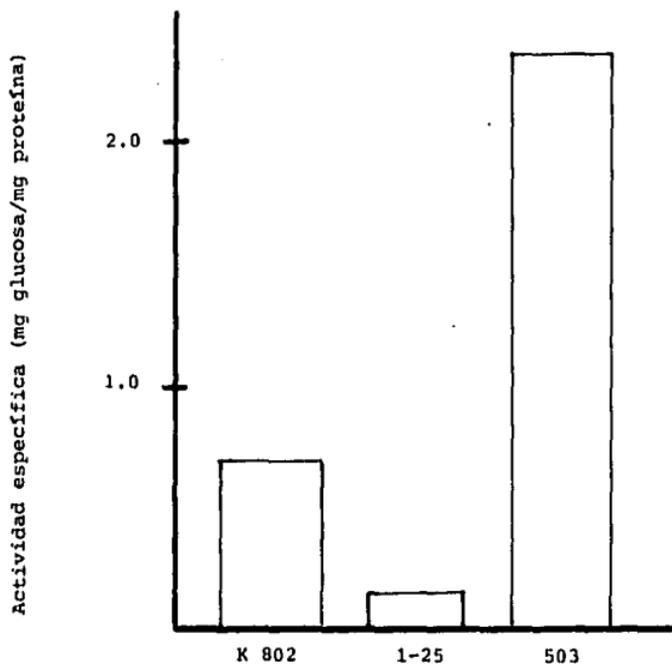


Figura XIV Relación cuantitativa de la glucosa isomerasa obtenida en tres cepas de Escherichia coli, incluyendo la recombinante 503. Las cepas fueron crecidas en medio completo suplementado con D-xilosa al 0.5%. La actividad fué determinada en las mismas condiciones de reacción de la figura XII.

TABLA IX

## AFINIDAD DE LA GLUCOSA ISOMERASA POR LA D-FRUCTOSA

Microorganismo	Km obtenida
<u>Actinoplanes missouriensis</u>	3.5 M
<u>Escherichia coli</u> K 802	6.6 M
<u>Escherichia coli</u> K 802 503	4.0 M

Km determinada en un sistema que contenía: 2.0 ml. de extracto celular (enzima), 0.5 ml. de una solución de sales cofactoros, 2.5 ml. solución de diferentes concentraciones del sustrato de D-fructosa disuelto en solución amortiguadora maleatos 0.2 M pH 6.8 a 50°C durante 1 hora.

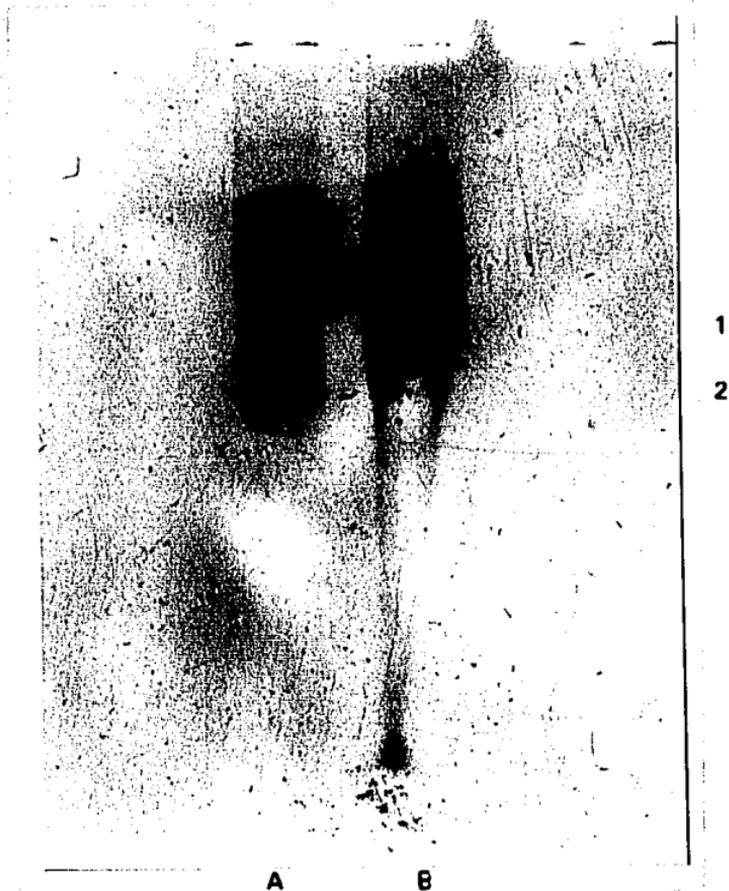


Fig. XV. Gel de agarosa de la digestión del plásmido recombinante pLA 503.

Carril A) plásmido sin digerir (1  $\mu$ g). Carril B) plásmido digerido en un sistema de reacción con 2.25  $\mu$ g de DNA de plásmido; 25  $\mu$ l de enzima (10/ $\mu$ l) 25  $\mu$ l de solución amortiguadora para Eco RI y 100  $\mu$ l de agua estéril. La banda 1 corresponde al plásmido linealizado, la banda 2 corresponde al inserto.

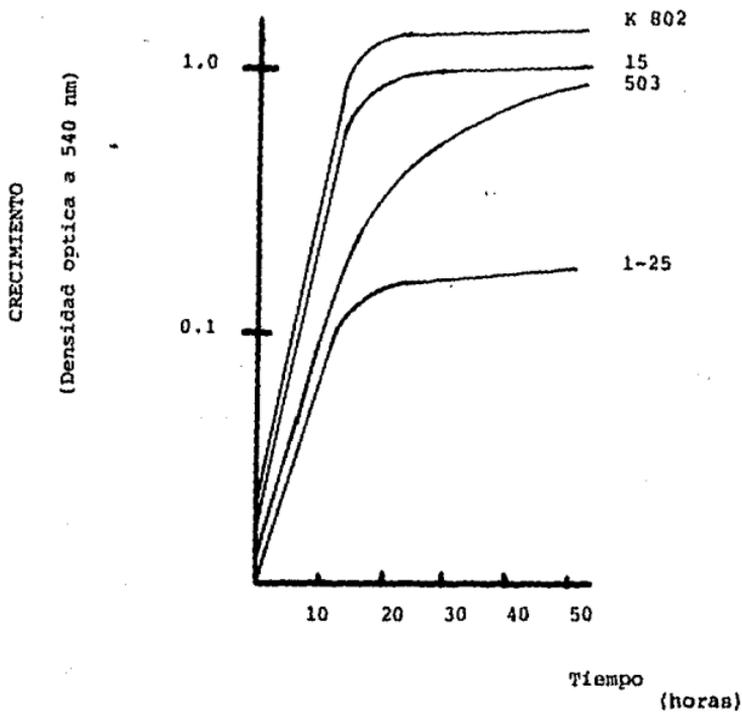


Figura XVI. Crecimiento de las copas parentales y diferentes recombinantes obtenidas en medio mínimo M9 suplementado con D-xilosa como fuente de carbono.

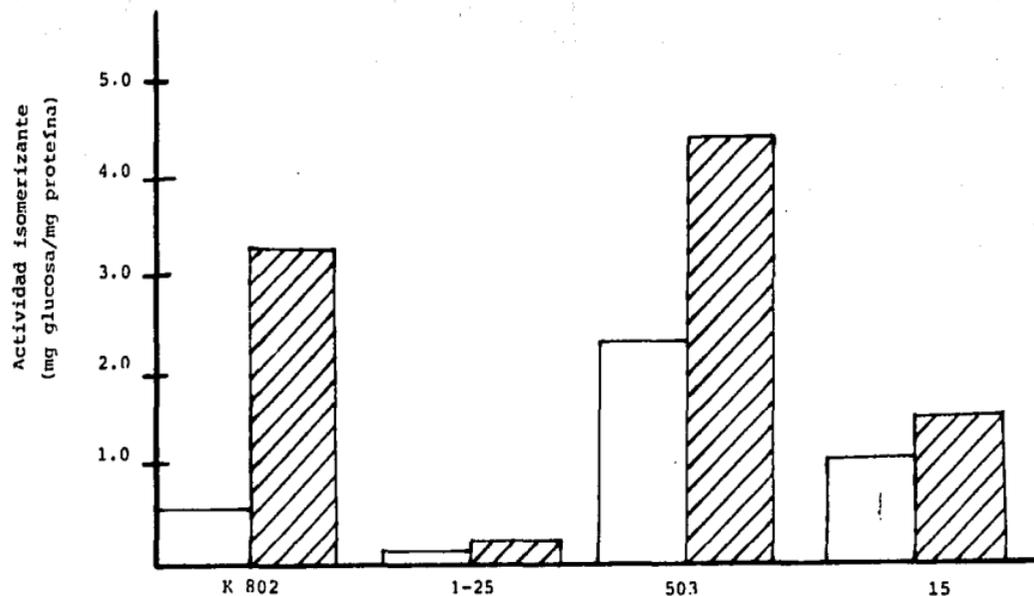


Figura XVII. Actividad isomerizante obtenida en diversas cepas de *Escherichia coli* incluyendo a las recombinantes 503 y 15.

La actividad fué inducida en medio completo suplementado con D-xilosa al 0.5% (□) y al 2% (▨).

## VIII DISCUSION

Como resultado del presente trabajo, se encontraron las condiciones experimentales que permitieron aislar y digerir con la enzima de restricción Eco RI, el DNA donador del actinomiceto Actinoplanes missouriensis cepa NRRL 3342 (productora de glucosa isomerasa) y el plásmido pBR 329. Los fragmentos obtenidos fueron unidos entre sí mediante la acción de la enzima ligasa de T4. Los plásmidos obtenidos incorporados por medio de transformación a la cepa receptora E. coli K 802 1-25 (xil<sup>-</sup> meth<sup>-</sup> r<sup>-</sup> m<sup>-</sup> Ap<sup>S</sup> Cm<sup>S</sup>). Las colonias transformadas fueron distinguidas por su propiedad para crecer en presencia de ampicilina y de ellas, las recombinantes se reconocieron por su sensibilidad a cloranfenicol (2.8% de las transformantes totales).

Una colonia recombinante denominada E. coli 503, fue -- aislada por su capacidad para crecer en bajas concentraciones del carbohidrato D-xilosa. Esta cepa presentó un incremento de casi 5 veces en su actividad de glucosa isomerasa - con respecto al microorganismo receptor que fue empleado.

La constante de afinidad de esta enzima por D-fructosa fue de 4.0 M, valor que corresponde a la Km de esta enzima - en Actinoplanes missouriensis, microorganismo donador la información clonada.

La recombinante obtenida produjo un máximo de actividad de isomerasa a las 15 horas de incubación. Este tiempo representa un ahorro de 4.8 veces comparado al requerido por la cepa original de A. missouriensis.

El plásmido recombinante (denominado PLA) resultó ser un plásmido estable que al ser digerido por Eco RI presenta un inserto de aproximadamente 800 pares de bases.

La información clonada en el plásmido pLA codifica para la síntesis de glucosa isomerasa ya que cuando éste fue extraído e introducido a la cepa receptora E. coli K 802 1-25, las transformantes obtenidas adquirieron la propiedad de crecer en bajas concentraciones de xilosa como fuente de carbono.

Si bien, la cepa recombinante produce la isomerasa en un período de tiempo menor que la cepa de Actinoplanes missouriensis y es posible obtener una actividad 5 y 2 veces mayor que las cepas receptora y original de E. coli respectivamente, la actividad isomerizante obtenida fue 50 veces mayor que la que resulta en A. missouriensis. Dicho comportamiento sugiere que la información clonada pudiera presentar problemas de expresión. Este fenómeno ha sido también observado en clonación del gene que codifica para la síntesis de neomicina fosfotransferasa de Streptomyces lividans, empleando E. coli como receptor (52). En este ejemplo, la expresión de la información clonada fue 10 veces menor que la obtenida en la cepa original. Son diversos los factores que pueden in

cidir en la expresión de genes cuando se involucran géneros y especies diferentes. De entre ellos posiblemente la eficiencia de los promotores involucrados, determinada a su vez por sus regiones de iniciación, así como su regulación, pueden ser de vital importancia. Esta posibilidad ha sido recientemente favorecida por Robbins y colaboradores (49) para la clonación del gene que codifica para la endoglicosidasa II de Streptomyces plicatus empleando E. coli como receptor. En este ejemplo, los autores reportan un incremento de 130 veces en la expresión de este gene cuando la secuencia es precedida por el promotor lac de E. coli.

Con tales antecedentes, es predecible que la incorporación de promotores eficientes de E. coli a la cepa recombinante pueda resultar en una mayor eficiencia en la expresión de la información clonada.

## IX CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

## 9.1 Conclusiones

Por los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

- a) se montaron las condiciones para la extracción, purificación, digestión y ligado del DNA cromosómico y del DNA del vehículo molecular con el objeto de formar moléculas recombinantes.
- b) se obtuvieron una serie de moléculas recombinantes con información capaz de expresarse en la cepa receptora.
- c) de las cepas recombinantes, tres de ellas presentaron el fenotipo esperado ( $Ap^r$  ,  $Cm^S$  ,  $xil^+$ ).
- d) la curva de crecimiento obtenida por una de las recombinantes sospechosa comparada con la curva de crecimiento de la cepa receptora muestran una diferencia en su comportamiento para utilizar la xilosa como fuente de carbono.
- e) con respecto a la actividad isomerizante, la cepa recombinante sospechosa presenta una mayor actividad que la cepa receptora.
- f) el análisis de restricción del plásmido recombinante obtenido en este trabajo, muestra la presencia de un inserto que bien podría contener la información necesaria para el cambio en las características fenotípicas de la cepa receptora.
- g) La determinación de la  $K_m$  tanto para la cepa receptora, - la cepa donadora de la información, como para la recombi-

nante sospechosa muestra que hay una semejanza en el comportamiento enzimático entre la cepa donadora y la sospechosa obtenida en la transformación.

- h) se obtuvieron nuevas colonias recombinantes al realizar una nueva transformación con el plásmido obtenido en este trabajo, todas con las mismas características que las primeras sospechosas obtenidas.
- i) no se alcanzaron los niveles de producción de la enzima esperados para un experimento de clonación molecular en el que el aumento en la dosis génica puede traducirse en un incremento en la cantidad de enzima producida.
- j) la inestabilidad del plásmido recombinante obtenido fue clara al perderse con relativa facilidad la capacidad de crecer en xilosa de las cepas sospechosas cuando dejaban de ser propagadas bajo medios de presión selectiva.

## 9.2 Recomendaciones

Si bien la evidencia experimental obtenida en el presente trabajo es compatible con la clonación molecular en E. coli del gene que codifica para la enzima glucosa isomerasa de A. missouriensis es importante mejorar la expresión de la información clonada. Dicho proceso deberá involucrar la incorporación y ensayo de diversos promotores de E. coli que pueda aumentar la eficiencia del sistema de transcripción de la información ganada.

Por otro lado, será necesario introducir regiones de -- DNA que codifiquen para la síntesis de moléculas importantes para la vida de la célula, de tal suerte que el mantener los

plásmidos represente una ventaja para la misma.

Las combinaciones de los factores anteriores podrá resultar en una cepa receptora capaz de expresar de manera eficiente la información clonada en condiciones de estabilidad operacional que eventualmente faciliten el escalamiento del proceso a los niveles que la industria demande.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alfano, H.C. Nutrition, sweeteners and dental caries. Food Technol. 34 (1); 70-74, 1980.
- 2.- Barker, S.A. Pure fructose syrups. Process. Biochem. 10; 24-25, 1976.
- 3.- Bibb, M., Schottel, J.L., Cohen, S.N. A DNA cloning system for interspecies gene transfer in antibiotic producing Streptomyces. Nature 284 (10); 526-531, 1980.
- 4.- Bingham, A.H.A., Brutin, C.V., Atkinson, T. Isolation and partial characterization of 4 plasmids from antibiotics resistant thermophilic bacillus. J. Gen. Microbiol. 114; 401-408, 1980.
- 5.- Bingham, A.H.A., Bruton, C.J., Atkinson, T. Characterization of Bacillus stearothermophilus plasmid pAB 124 and construction of deletion variants. J. Gen. Microbiol. 119; 109-115, 1980.
- 6.- Bolívar, F., Rodríguez, R., Betlach, M. y Boyer, H.W. Construction and characterization of new cloning vehicles I. Ampicillin resistant derivatives of the plasmid pMB 9. Gene 2; 75-93, 1977.
- 7.- Bolívar, F., Construction and characterization of new cloning vehicles III Derivatives of plasmid pBR 322 carrying unique Eco RI sites for selection of Eco RI generated recombinant molecules. Gene 4; 121-132. 1978.
- 8.- Bolívar, F. Recombinación in vitro de ácidos nucleicos. Ingeniería Genética Molecular. Revista Latinoamericana de Microbiología 21; 37-55, 1979.
- 9.- BRL enzima ligasa T4 de, preparada según instrucciones del fabricante.
- 10.- Bucke, C. Industrial glucos isomerase Symp. Topics in Enzymes and fermentation. Biotech. publishers 77 serie 1 pp. 148-171, 1977.
- 11.- Bucke, C. Enzyme in fructose manufacture. En Birch, G. Blakebrough, N. y Parker, K. (Ed) Enzymes and Food Processing Applied Science Publishers, Ltd. Londres 51-72, 1981.
- 12.- Clewell, D.B. Nature of Col E1 plasmid replication in the presence of chloramphenicol, J. Bacteriol 110; 667-676, 1972.

- 13.- Cohen, S.N., Chang, A.C., Hsu, D.I. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of E. coli by factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69; 2110-2114, 1972.
- 14.- Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. Recombinant DNA Techniques. En Methods in enzymology, Academic Press. Vol. 68, 1979.
- 15.- Curtis, R. Genetic Manipulation of microorganisms potential benefits and biohazards. Ann. Rev. Microbiol. 30; 507-533, 1976.
- 16.- Charter, K.F. Some recent developments in Streptomyces genetics. Der. Ind. Microbiol.
- 17.- Chen, W.P. Glucose Isomerase (a review) I. Process Biochem. 15, 30-35, 1980.
- 18.- Dally, E.L., Eveleigh, D.E. Montecourt, D.S., Stokes, H.W. Williams, R.L. Recombinant DNA techniques Food for Thought. Food Technol. 35 (7); 26-31, 1981.
- 19.- Demain, A.L., Solomon, N.A. Industrial Microbiology. Sci. Amer. 245 (3), 1981.
- 20.- DeVos, A.M., Hatada, M., Van der Wel, H., Krabbendam, H., Peerdeman, A.F., Kin, S. Three-dimensional structure of Thaumatin I and intensely sweet protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 82; 1406-1409, 1985.
- 21.- Diccionario de química y productos químicos. Gessner, G. Hawley. Edición Omega, S.A. Barcelona España pag. 198, 751-790, 1975.
- 22.- Dugaiczky, A., Boyer, H.W. y Goodman, H.M. Ligation of Eco RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol. 96; 171-185, 1975.
- 23.- Emodi, A., Xylitol. Food Technol. 32 (1); 28-32, 1978.
- 24.- Eveleigh, D.E. The microbiological production of Industrial chemicals. Sci.-Amer. 245 (3); 1981.
- 25.- Farrés, A., Cepa obtenida en el laboratorio por, mutando la cepa de Escherichia coli K 802 con NTG (50 µg/ml) a 37°C durante una hora.
- 26.- Foods Products Research and Development. Sucrose replacers have cost advantages and functional benefits in baked foods. Foods products research and development. No. 54, 1980.
- 27.- Food Technology. Aspartame accepted by FDA. Food Technol. 35 (9); 126, 1981.
- 28.- Frattali, W.P. Regulatory and nutritional aspects of fructose and sugar alcohols in foods. Food Technol. 34 (1); 67-69, 1980.

- 29.- Gong, C.S., Chen, L., Tsao, G., Purification and properties of glucose isomerase of Actinoplanes missouriensis Biotech. and Bioeng. 22, 833-845, 1980.
- 30.- Gray, G., Selzer, G., Buell, G., Shzw, P., Esconez, S., Hofer, S. Voegeli, P., Thompson, C.J. Synthesis of bovine growth hormone by Streptomyces lividans. Gene 32 (1,2); 21-30, 1984.
- 31.- Guerry, P., LeBlanc, D.J., Falkows, S. General methods for the isolation of plasmid desoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 116; 1064-1066, 1973.
- 32.- Hamilton, B.K., Cooney, C.L. Glucose isomerase: a case study of enzyme catalized process technology. En: Olson A. Cooney, C.L. (Eds). Immobilized enzymes in food and microbiol process. Plenum Press. New York, 85-131, 1974.
- 33.- Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Boeddel, D.V., Ammerer, G., Hall, B.D. Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293 (5835); 717-722, 1981.
- 34.- Homler, E.B. Properties and stability of aspartame..Food Technol. 38 (7); 1984.
- 35.- Inglet, G.E. Sweeteners. Food Technol. 35 (3) 37-41 1981.
- 36.- Institute of Food Technologist expert panel on food safety and nutrition sugar and nutritive sweeteners in processed foods. Food Technol. 35 (5); 101-105, 1974.
- 37.- Johnson, A.H., Peterson, M.S. Encyclopedia of food technology vol. 2. The Avi publishing Co. Inc. Westport Conn. Sugar an sweeteners. 867-873, 1974.
- 38.- Loveille, A.G. The high sugar foods controversy. Food Technol. 34 (1); 75-76, 1980.
- 39.- Lovett, P.S., Duvall, E.J., Keggins, K.M. Bacillus pumilus plasmid pPl 10; properties and insertion into Bacillus subtilis 168 by transformation. J. Bacteriol. 127 817-828, 1976.
- 40.- Lowry, O.H. et. al. Protein measurement with the Folin phenol reagent, The J. Biol. Chem. 193 (1); 265-275, 1951.
- 41.- Maeda, H., Tsao, G.T. Maltose production. Process Biochem. 14 (7); 2-5, 1979.
- 42.- Mandel, M. y Higa, A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53; 159-162, 1970.

- 43.- Martens, P.A. y Clayton, D.A., Strand breakage in solutions of DNA and ethidium bromide exposed to visible light. Nucleic. Acids Research 4 (5); 1391-1407, 1977.
- 44.- Mellor, J., Dobson, M.J., Roberts, N.A., Tuite, M.F., Emtage, J.S., White, S., Lowe, P.A., Patel, T., Kingsman A.J., Kingsman, S.M. Efficient synthesis of enzymatically active half chymosin in Saccharomyces cerevisiae. Gene 24 ( ); 1-14, 1983.
- 45.- Miller, J. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
- 46.- Miller, S.A. Sugar and caries, Food Technol. 34 (1); 77-79, 1980.
- 47.- Nickerson, T.A. Why use lactose and its derivatives in food. Food Technol. 32 (1); 40-46, 1978.
- 48.- Old, R.W., Primrose, S.B. Principles of gene manipulations An introduction to genetic engineering. 2ed. Studies in microbiology vol. 2. University of California Press. Berkeleyland, Los Angeles. 1981.
- 49.- Peterson, M.S., Johnson, A.H. Encyclopedia of food technology vol 3. The Avi Publishing Co. Inc. Westport Conn. Fructose, and high fructose corn syrups 329-331, 1978.
- 50.- Robbins, W., With, D.F., Hering, C., Expression of the Streptomyces enzyme endoglucosidase II in Escherichia coli J. Biol. Chem. 256 (20); 10640-10644, 1981.
- 51.- Robert, M. La Nueva Ingeniería Genética. Naturaleza 8; 296-311, 1977.
- 52.- Rodgers, W.H., Wolfgang Springer, Young, F.E., Cloning and expression of a Streptomyces fradiae neomycin resistance gene in Escherichia coli. Gene 18 (2); 133-141, 1982.
- 53.- Rodriguez, L.R. y Tait, C. R., Recombinant DNA Techniques an introduction. Addison-Wesley. Publishing Co. 1983.
- 54.- Whestler, L.R.. Starch as a source of sweeteners. J. paper 5273, Die Stärke 25 (12); 424-426, 1973.
- 55.- Sanchez, S. y Quinto C.H. D-glucose isomerase constitutive and catabolite repression resistant mutant of Streptomyces phaeochromogenes. Appl. Microbiol. 30; 750-754, 1975.
- 56.- Sanchez, S. y Smiley, K.L. Properties of D-xylose isomerase from Streptomyces albus. Appl. microbiol. 29; 745-750. 1975

- 57.- Sánchez, S. y Demain, A. L. Enrichment of auxotrophic mutants in Hansenula polymorpha. Eur. J. Appl. microbiol. 4; 45-49. 1977.
- 58.- Schnyder, L. Continuous isomerization of D-glucose to fructose on a commercial basis. Die Starke 26; 409-413, 1974.
- 59.- Schwimmer, S. Source book of food enzymology. The Avi Publishing Co. Inc. Westport Conn. pags. 152-153, 155, 162 1981.
- 60.- Science. A new approach to nonnutritive sweeteners. Science 215 (4544); 398-399, 1982.
- 61.- Sigma Chemicals Company, Enzima de restricción Eco RI de: preparada según instrucciones del fabricante.
- 62.- Smith, R.A., Duncan, M.J., Moir, D.T. Heterologus protein secretion from yeast. Science 229 (4719); 1219-1224.
- 63.- Trivedi, N.B., Cooper, E.J., Bruipsma, B.L. Development and application of quick-rising yeast. Food Technol. 38 (6); 51-57, 1984.
- 64.- Tsumura, N. y Sato, T. Enzymatic conversion of D-glucose to fructose VI. Agr. Biol. Chem. 29 (12); 1129-1134, 1965.
- 65.- U.N.P.A.S.A. Estadísticas azúcareras, México, D. P. 144, 1983.
- 66.- Vaheri, M., Kauppinen, V. Improved microbial glucose isomerase production. Process Biochem. 12 5-8, 1977.
- 67.- Watson, D.J. Biología molecular del gen, 3ªed. Fondo educativo Interamericano. Madrid España, 1976.
- 68.- Werner, W.H., Rey, H.C., Weillinger, H. Z. Analytic Chem. 252; 224, 1970.