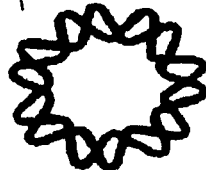




00550  
29



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Desarrollo de una cepa etanológica a partir de**  
*Bacillus subtilis*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A  
**QFB Aida Susana Romero García**

Cuernavaca, Mor.

Noviembre 2003

TESIS CON  
FOLIO DE ORIGEN

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**




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

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

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

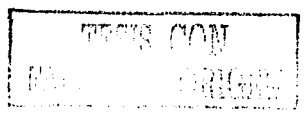
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Autorización de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la UNAM a Idelfonso...  
contiene el...  
MEMORANDO Romero García Aida  
Susana  
Fecha: Noviembre 14, 2003  
Firma: 

**El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto Z-003.**

B



**JURADO ASIGNADO.**

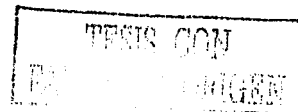
**Presidente** Dr. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES

**Secretario** Dr ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

**Vocal** Dra. PAULINA BALBÁS DIEZ BARROSO

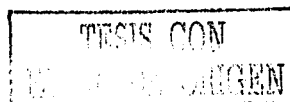
**Suplente** Dr. ENRIQUE MERINO PÉREZ

**Suplente** Dr. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ



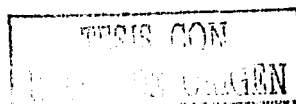
## ÍNDICE

<i>ÍNDICE DE TABLAS</i> .....	2
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> .....	3
<i>ABREVIATURAS</i> .....	4
<i>RESUMEN</i> .....	5
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	7
Desarrollo Sustentable .....	7
Desarrollo Energético Sustentable: Problemática Petrolera .....	7
Alternativas Sustentables para la Utilización de Combustibles Alternos a la Gasolina .....	8
Etanol como Combustible Alterno: Consideraciones Ecológicas .....	9
Etanol como Combustible Alterno: Mercado Potencial en México .....	10
Sistemas Actuales de Producción de Etanol por Fermentación .....	10
Ingeniería de Vías Metabólicas .....	11
<i>ANTECEDENTES</i> .....	12
Residuos Agroindustriales .....	12
Composición e Hidrólisis de la Celulosa .....	12
Composición e Hidrólisis de la Hemicelulosa .....	13
Limitaciones de los Microorganismos Etanológicos Silvestres .....	13
Estrategias Biotecnológicas para la Conversión de Biomasa en Etanol .....	15
<i>JUSTIFICACIÓN</i> .....	26
<i>HIPÓTESIS</i> .....	26
<i>OBJETIVO GENERAL</i> .....	27
<i>OBJETIVOS PARTICULARES</i> .....	27
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	28
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	35
<i>CONCLUSIONES</i> .....	56
<i>PERSPECTIVAS</i> .....	57
<i>APÉNDICE A.    Ensayo Enzimático de PDC</i> .....	58
<i>APÉNDICE B.    Ensayo Enzimático de ADH</i> .....	60
<i>APÉNDICE C.    Ensayo para Producir Etanol in vitro</i> .....	62
<i>REFERENCIAS</i> .....	65



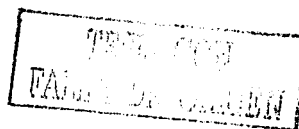
## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizados u obtenidas en este trabajo. ....	28
Tabla 2. Vectores utilizados o construidos en este trabajo. ....	29
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados. ....	30
Tabla 4. Actividades de $\beta$ -galactosidasa. ....	39
Tabla 5. Evaluación de actividades de PDC y ADHB, y producción de etanol en <i>E. coli</i> XLI- Blue. ....	44
Tabla 6. Evaluación de actividad de PDC y producción de etanol. ....	46
Tabla 7. Evaluación de las actividades enzimáticas de PDC y ADH en cepas derivas de <i>B. subtilis</i> .....	50
Tabla 8. Estandarización del ensayo para producir etanol <i>in vitro</i> .....	51
Tabla 9. Evaluación de la producción de etanol <i>in vitro</i> de <i>B. subtilis</i> SR2. ....	52
Tabla 10. Efecto de la glucosa sobre las actividades de PCD y ADH en <i>B. subtilis</i> , cepas SR1 y SR2 .....	53



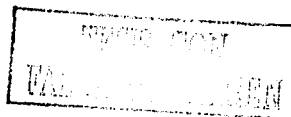
## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición genérica de residuos agroindustriales (biomasa o lignocelulosa) y de la fracción hemicelulósica de bagazo de caña de azúcar (BCA).....	12
Figura 2 Metabolismo de glucosa y xilosa en <i>E. coli</i> B, y su desviación hacia la producción de etanol. ....	18
Figura 3. Metabolismo de glucosa y xilosa en <i>B. subtilis</i> , y la vía propuesta para la producción de etanol. ....	23
Figura 4. Representación del PCR recursivo.....	32
Figura 5. Representación del <i>PrrnA</i> P2. ....	35
Figura 6. Representación esquemática del vector pSG-PLK.....	36
Figura 7. Vector pSG- <i>PrrnA</i> .....	37
Figura 8. Secuenciación de la fusión de <i>PrrnA</i> a <i>lacZ</i> .....	37
Figura 9. Diseño del operón etanológico que posee señales de regulación que reconoce <i>B. subtilis</i> , y los genes <i>pdh</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> . ....	40
Figura 10. Vector pUC- <i>aprE</i> tgaca.....	42
Figura 11. Vector pTOPO- <i>pdh-adh-term</i> .....	42
Figura 12. Vector pUC-operón. ....	43
Figura 13. Construcción del vector pSG-BFAE.....	45
Figura 14. Vector pSG-operón. ....	46
Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida. ....	47



**ABREVIATURAS**

ADHB	Alcohol deshidrogenasa B
BCA	Bagazo de caña de azúcar
kD	Kilodaltones
PDC	Piruvato descarboxilasa
PLK	Sitio múltiple de clonación (del inglés polilinker)
<i>PaprrE</i> tgaca	Promotor modificado del gen <i>aprE</i>
<i>PrrnA</i>	<i>Promotor del gen ribosomal rrnA</i>
RBS	Sitio de unión a ribosoma
SSF	Sacarificación y fermentación simultánea
TTP	Tiaminpirofosfato o cocarboxilasa
<i>TeryIII</i> A	Terminador de la transcripción del gen <i>eryIII</i> A





## RESUMEN

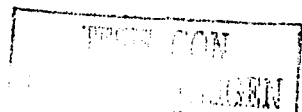
El objetivo del presente trabajo fue integrar en el genoma de *Bacillus subtilis* los genes que codifican para las enzimas piruvato carboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADHB) de *Zymomonas mobilis*, para que con su expresión *B. subtilis* pueda producir etanol.

En una primera etapa, se planteó la posibilidad de emplear un promotor de genes ribosomales de *B. subtilis* (*PrrnA P2*), para promover la transcripción de los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis*. Por este motivo se construyó, clonó y caracterizó al promotor *rrnA P2*, utilizando como gen reportero a *lacZ*, gen que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La construcción se analizó bajo dos fondos genéticos: como plásmido multicopia en *E. coli* (cepas XL1-blue y JM101), e integrado en el genoma de *B. subtilis*. Se encontró que en las cepas derivadas de *E. coli*, el *PrrnA P2* funciona como un promotor constitutivo, pero de fuerza baja. Al ser integrado en una copia en el genoma de *B. subtilis* no se observó actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

Con base a estos resultados, se decidió sustituir el *PrrnA P2* por el *PaprEttgaca*, que es el promotor modificado del gen *aprE*, mismo que codifica para la subtilisina. Esta enzima se expresa fuertemente en la fase estacionaria de *B. subtilis*. El *PaprEttgaca* cuenta con una caracterización bien detallada, además tiene una expresión fuerte.

El diseño del operón incluyó a los siguientes elementos en fila: promotor modificado del gen *aprE* de *B. subtilis*, sitio de unión a ribosoma (RBS), gen *pdc*, otro RBS, gen *adhB* (ambos genes de *Z. mobilis*) y, al final se incluyó al terminador de la transcripción del gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (*TcryIIIA*).

La construcción del operón se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de cada uno de sus elementos. Después ayudados por los sitios de restricción que enmarcaban a cada elemento, se construyó el operón: *PaprEttgaca-pdc-adhB-term*, sumando cada uno de éstos en pUC19, dando lugar a la clona *pUC-PaprEttgaca-pdc-adhB-term* (pUC-operón). Finalmente, el operón etanológico se cortó y ligó al vector pSG-BFAE (plásmido integrativo para *B. subtilis*), obteniendo el vector pSG-operón. Se llevó a cabo la integración de este vector en el cromosoma

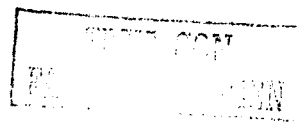


de *B. subtilis*, en dos diferentes fondos genéticos: cepa con mutación en el regulador negativo Hpr del promotor de la subtilisina (BB82  $\Delta nprE$ , *hisA*, *hpr2*); y cepa con interrupciones-supresiones en las 7 proteasas mayoritarias (CH1  $\Delta nprE$ ,  $\Delta aprE$ ,  $\Delta epr$ ,  $\Delta bpf$ ,  $\Delta mpr::ble$ ,  $\Delta nprB::bsr$ ,  $\Delta vrpE::ery$ , protótrofa, Cm<sup>R</sup>::Nm<sup>R</sup>).

Se evaluaron las actividades enzimáticas de PDC y ADHB en las cepas derivadas de *E. coli* y de *B. subtilis*, corroborando que el operón construido era funcional. Concomitantemente, las cepas recombinantes fueron capaces de producir etanol *in vivo*. Las cepas recombinantes derivadas de *B. subtilis* (BB82 Hpr- y CH1 Nm<sup>R</sup>) produjeron alrededor de 1 g/l de etanol.

Es importante señalar que este trabajo demuestra, por primera vez, que puede obtenerse una cepa productora de etanol derivada de *B. subtilis*, además sienta las bases para que se lleven a cabo estudios conducentes a mejorar las cepas etanológicas derivadas de *B. subtilis*, y realizar estudios de fermentación con las mismas.

Es deseable que un solo microorganismo hidrolice celulosa, metabolice una amplia variedad de azúcares, incluyendo hexosas (p. ej. glucosa y manosa), disacáridos (principalmente celobiosa y sacarosa) y pentosas (a decir xilosa y arabinosa), y que además utilice estas fuentes de carbono para producir etanol. *B. subtilis* puede utilizar alrededor de 18 diferentes mono y disacáridos como fuente de carbono, además posee un eficiente sistema de secreción de proteínas que podría ser utilizado para secretar proteínas heterólogas que degradaran a la celulosa. De manera tal que en la cepa productora de etanol derivada *B. subtilis* se podrían conjuntar ambas características: la degradación de celulosa y la producción de etanol.



## INTRODUCCIÓN

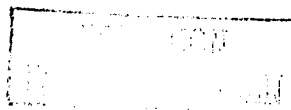
### **Desarrollo Sustentable**

Por 15 años, la noción de desarrollo sustentable ha exhibido una invocación política, pero ha sido difícil de definir. Muchas definiciones incluyen aspectos concernientes al desarrollo, la equidad y la preservación del ambiente. En Conferencias Mundiales se ha manifestado la urgencia de un futuro estable para la población mundial, involucrando la reducción de la hambruna y la pobreza, promoviendo la educación y preservando los ecosistemas del planeta, reduciendo las emisiones contaminantes y usando escrupulosamente el agua dulce (Parris y Kates, 2003). El desarrollo sustentable creado por una conciencia ambiental responde a la preservación de los sistemas que soportan la vida en la tierra y las fuentes de vida (Parris y Kates, 2003).

En el caso particular de las tecnologías energéticas sustentables, se plantea la obtención de energía a partir de recursos renovables. Son tecnologías que aprovechan materiales (diferentes a combustibles fósiles, tales como el petróleo, el carbón o el gas natural) para obtener diferentes formas de energía. Así por ejemplo, por medio de estas tecnologías energéticas sustentables puede generarse energía eléctrica por medio de tecnologías geotérmicas, hidroeléctricas, eólicas, o bien mediante el uso de hidrógeno. El gas natural se puede sustituir por metano producido por bacterias metanogénicas a través de la bioconversión de la basura y desechos orgánicos. El caso específico de la gasolina es particularmente interesante. En las siguientes secciones se discutirá en breve su panorama en nuestro país y las alternativas tecnológicas sustentables.

### **Desarrollo Energético Sustentable: Problemática Petrolera**

El actual desarrollo económico mundial está cimentado, en gran medida, en el comercio del petróleo. Para la economía mexicana, la exportación de petróleo representa una de las fuentes de mayor ingreso, su exportación aunada a las ventas nacionales en términos de porcentaje representa el 32% de los ingresos del gobierno federal. Sin embargo, el petróleo es un recurso natural no renovable y en nuestro país se prevé su agotamiento en el primer cuarto del presente siglo (PEMEX, 1999). Lo anterior plantea problemas tanto económicos como energéticos, debido a que México satisface su demanda energética principalmente a partir del petróleo y en menor proporción por el carbón mineral, el gas natural y la energía hidroeléctrica. Lo anteriormente



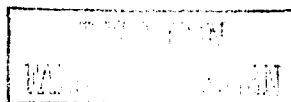
expuesto plantea la necesidad del desarrollo e implementación de un plan estratégico, para mantener las reservas de petróleo y gas natural por un periodo mayor al estimado, lógicamente basado en una transición desde su actual dependencia de los hidrocarburos, hacia combinaciones energéticas más diversificadas. Esta transición deberá realizarse de forma gradual y ordenada, y requiere el aprovechamiento de diferentes fuentes de energía, prestando particular atención a los recursos renovables.

El sistema de transporte utiliza principalmente gasolina y en menor proporción diesel y gas LP. Aproximadamente 14% del petróleo crudo extraído se emplea en la producción de gasolina por PEMEX; el crecimiento anual de consumo de gasolina fue del 2.5% para el periodo 1996-2000, y al parecer se mantendrá esta tasa de crecimiento durante los próximos 10 o 15 años, estimándose para el 2020 un incremento en el consumo de este combustible de aproximadamente el 47% respecto al consumo actual. Para México, esta cifra es alarmante no sólo por la demanda energética que plantea, sino por el capital que deberá invertirse para su importación, debido a que México importa un porcentaje considerable de este combustible desde 1988. Este panorama denota una de las ramas energéticas en las que nuestro país debe fortalecer por medio de tecnologías sustentables.

#### **Alternativas Sustentables para la Utilización de Combustibles Alternos a la Gasolina**

No obstante el amplio desarrollo tecnológico actual, no son muchas las alternativas disponibles para sustituir la gasolina y gas natural, como una forma portátil y concentrada de energía para automotores. Entre otras opciones destacan el almacenamiento de energía eléctrica en baterías, la generación de energía eléctrica mediante celdas de combustible de hidrógeno, la combustión de metano, metanol, bio-diesel, o etanol producido mediante tecnologías sustentables y biológicas.

El uso de baterías todavía es limitado, dado que el tamaño o la capacidad de las baterías requeridas para obtener el kilometraje equivalente proporcionado por un tanque de gasolina es enorme, o bien se requieren recargas con demasiada frecuencia. En el caso de las celdas de combustible de hidrógeno, la limitante principal es su almacenamiento y equivalente energético. El metanol es muy tóxico, su contenido energético es únicamente del 45% respecto a la gasolina y se produce por destilación de la madera con un elevado consumo de energía a temperaturas de 350°C. El metano tiene un equivalente energético de 1/3 con respecto al butano o gas natural, requiriendo de tanques de almacenamiento tres veces mayores a los usados actualmente en los

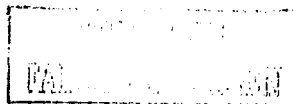


automotores. El bio-diesel es manufacturado a partir de aceites, principalmente vegetales, transesterificados en la presencia de metanol o etanol, tiene prácticamente el mismo valor energético que el diesel, pero su uso práctico depende de la disponibilidad de aceite vegetal y metanol.

El etanol es líquido a presión y temperatura ambiente, de tal manera que es fácilmente almacenado y transportado, su contenido energético es aproximadamente 2/3 con respecto a la gasolina o diesel y, para su uso en automóviles no se requiere de tanques especiales para almacenarlo. Adicionalmente, los motores de combustión interna que utilizan gasolina, pueden emplear como energético, mezclas de gasolina conteniendo hasta 20% de etanol. Para concentraciones de etanol mayores al 80%, los costos de producción de automotores son equivalentes a los producidos actualmente.

### **Etanol como Combustible Alternativo: Consideraciones Ecológicas**

El uso de etanol como combustible alternativo ofrece las siguientes ventajas (Louwrier, 1998; Ingram *et al.*, 1999): a) tiene mayor octanaje que la gasolina, es biodegradable y por ende resulta menos tóxico en caso de derrames o evaporaciones; b) en mezclas gasolina-etanol, sustituye el uso de oxigenantes; c) a diferencia del éter-metil-terbutílico (MTBE por sus siglas en inglés: methyl terbutyl ether), el etanol no es cancerígeno; d) contiene más oxígeno que los combustibles derivados del petróleo, por lo que las emisiones de monóxido de carbono se reducen hasta en un 30% como resultado de una combustión más completa; y e) de manera relevante, se puede producir a partir de material biológico renovable, por lo cual se disminuye considerablemente la cantidad de CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera, haciendo sustentable a la industria de los combustibles. Es pertinente señalar que una desventaja del etanol, consecuencia de su contenido de oxígeno, es que en mezclas con gasolina ocasiona la producción de óxidos de nitrógeno. A pesar de ello, la producción de etanol por fermentación permitiría satisfacer en gran medida las necesidades energéticas del presente o futuro cercano, sin comprometer la capacidad de generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades energéticas; además ocasionaría un efecto ambiental adverso mucho menor que el provocado por el uso de los combustibles fósiles. La producción de combustibles alternos con tecnologías que respeten el equilibrio de los ecosistemas, y que sean sostenibles por el uso de recursos naturales renovables, constituye una garantía mundial. Hacia esta meta se encaminan procesos biotecnológicos, como aquellos que utilizan el metabolismo fermentativo etanológico de algunos microorganismos silvestres (como *Saccharomyces*



*cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*) para obtener etanol utilizando como materia prima, materiales biológicos que son capaces de metabolizar de forma natural, dentro de estos se encuentran azúcares como la sacarosa y la glucosa.

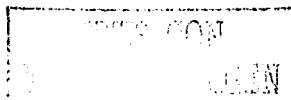
### **Etanol como Combustible Alternativo: Mercado Potencial en México**

El mercado potencial para el etanol, tan sólo como complemento en la gasolina para sustituir el MTBE, rebasa los millones de litros al día. Actualmente en nuestro país se consumen alrededor de 105 millones de litros de gasolina por día (PEMEX, 1999), lo cual representa, en términos de precio de venta considerando 7 pesos por litro de gasolina, un mercado de 735 millones de pesos por día. Si se considera la probable sustitución de MTBE por mezclas de gasolina con etanol al 10% (V/V), se requeriría de una producción de 10.5 millones de litros diarios de etanol para satisfacer la demanda actual. Si para ello se empleara solo azúcar, asumiendo un rendimiento de conversión del 90% respecto al teórico ( $0.51 \text{ g}_{\text{ETANOL}}/\text{g}_{\text{AZÚCAR}}$  y una densidad del etanol de 0.79 kg/l), se requerirían de 14.6 mil toneladas diarias o el equivalente a 5.3 millones de toneladas por año de sacarosa. La producción total actual de azúcar en nuestro país se encuentra por debajo de esta demanda (Quintero, 2000).

### **Sistemas Actuales de Producción de Etanol por Fermentación**

Desde hace más de tres décadas, se ha demostrado la factibilidad tecnológica y práctica de emplear etanol producido a partir de azúcar de caña o de almidón de maíz, como combustible para automóviles. En la actualidad millones de autos circulan empleando etanol o mezclas de gasolina-etanol en Brasil, los EUA, Canadá y otros países. Sin embargo, estos procesos tienen dos grandes limitaciones: la incapacidad fisiológica de los microorganismos empleados en la fermentación alcohólica para utilizar otros sustratos más baratos y complejos, tales como los presentes en la lignocelulosa; y la competencia por los mismos sustratos, dado que la sacarosa, la glucosa y el jarabe de maíz son utilizados en la elaboración de alimentos. Cabe aclarar que para México ni sacarosa, la glucosa o el jarabe de maíz es una alternativa viable.

Los residuos de la industria azucarera, y potencialmente cualquier residuo agroindustrial, son sustratos más económicos pero más complejos que la sacarosa, y pueden utilizarse para producir etanol. Desde el punto de vista económico se requiere que el residuo agroindustrial se encuentre concentrado en ciertas localidades, y cuyo transporte sea mínimo. Al parecer, el único sustrato que cumple este requisito en nuestro país es el bagazo de caña de azúcar (BCA) (Martínez *et al.*,



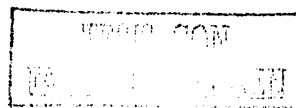
2002) y entre otras alternativas en distintas partes del mundo (Wooley *et al.*, 1999). En promedio el BCA mexicano contiene 28% de hemicelulosa y 42% de celulosa. Asumiendo eficiencias de conversión de 0.95 para la transformación de hemicelulosa y celulosa en azúcares fermentables (rendimiento de conversión de 0.51 g ETANOL/g AZÚCAR y una densidad del etanol de 0.79 kg/L), se podrían obtener más de 7 millones de litros de etanol por día utilizando la producción total de BCA de 1998. Este análisis muestra que el BCA es suficiente para satisfacer la demanda antes calculada para complementar la gasolina con 10% de etanol.

### **Ingeniería de Vías Metabólicas**

Ahora bien, no se ha encontrado un microorganismo capaz de metabolizar BCA para producir etanol. Existen bacterias que tienen la capacidad natural de degradar celulosa, otras pueden metabolizar algunas hexosas y pentosas, dando como productos de fermentación mezclas de ácidos orgánicos; otras pueden producir etanol casi exclusivamente como producto de su fermentación pero metabolizando un rango limitado de azúcares. En este sentido, la Ingeniería de Vías Metabólicas proporciona una alternativa de abordaje a este problema.

Varios autores han tratado de proporcionar una definición de Ingeniería de Vías Metabólicas. La mayoría coincide en que se enfoca a la modificación de una o varias reacciones bioquímicas, en la red metabólica de un organismo, utilizando la tecnología de DNA recombinante para alterar el flujo metabólico hacia un objetivo específico. Se entiende por *modificación* como la diversificación, en la red metabólica del organismo, de funciones enzimáticas, transporte o regulación. El *objetivo* que se persigue la mayoría de las veces se dirige al mejoramiento de actividades enzimáticas; y por ende, al aumento de rendimiento y productividad de un metabolito o *producto*. Así mismo, la Ingeniería de Vías Metabólicas debe involucrar un diseño con cierto grado de predicción (Stephanopoulos, 1999; Bailey, 1991).

Apoyándose en la Ingeniería de Vías Metabólicas se pueden seguir dos estrategias: modificar las vías metabólicas de los microorganismos silvestres etanológicos para tener la capacidad de asimilar y metabolizar de manera integral pentosas y hexosas; o bien, convertir en microorganismos productores de etanol, a aquéllos que tienen entre otras características la capacidad de utilizar pentosas y hexosas.



## ANTECEDENTES

### Residuos Agroindustriales

Actualmente, el acoplamiento de tratamientos químicos, enzimáticos y de fermentación ha permitido desarrollar tecnologías para convertir en etanol, una amplia variedad de residuos agroindustriales, conocidos con el nombre genérico de "biomasa". Entre éstos se encuentran el bagazo de caña, la cascarilla del arroz, el rastrojo u olote de maíz, los pastos, los desechos de madererías (viruta y aserrín), maderas suaves y duras, papel de desecho de oficinas, etc., los cuales son transformados mediante procesos químicos y enzimáticos, en azúcares y posteriormente en etanol mediante procesos de fermentación. La figura 1 muestra la constitución de la lignocelulosa, la cual está compuesta de fibras de celulosa embebidas en una matriz macromolecular de proteínas, pectina, lignina y hemicelulosa. Esta disposición hace a la lignocelulosa altamente heterogénea, razón por la cual no es simple, ni trivial su digestión.

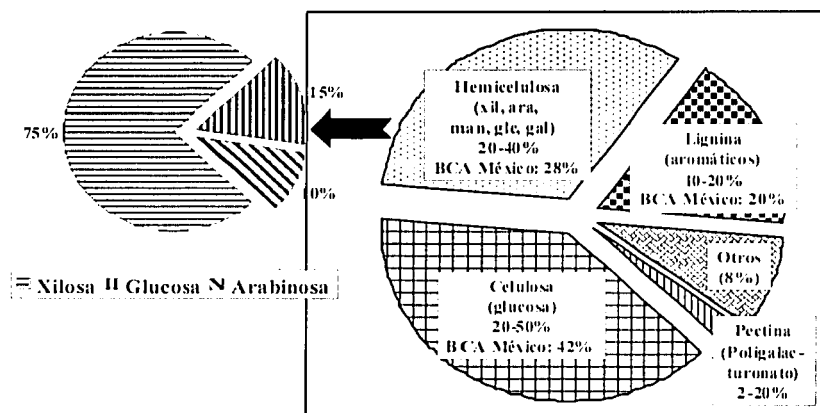
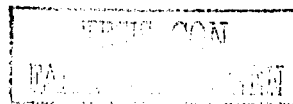


Figura 1. Composición genérica de residuos agroindustriales (biomasa o lignocelulosa) y de la fracción hemicelulósica de bagazo de caña de azúcar (BCA).

### Composición e Hidrólisis de la Celulosa

La celulosa es un polisacárido de plantas, tiene un papel estructural más que nutricional y es el compuesto orgánico más abundante en la biosfera. El polímero está constituido de residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. La configuración le  $\beta$  permite formar cadenas muy largas y fuertes. La celulosa requiere de una digestión intensa y, generalmente se lleva a cabo en dos





etapas. La primera de ellas se realiza en condiciones ácidas, y su efecto es el de hacer disponible al polímero para realizar de manera eficiente la segunda etapa con celulasas, que resulta de la acción combinada de diferentes tipos de actividades enzimáticas: endoglucanasas que hidrolizan enlaces  $\beta$ -1,4 del esqueleto lineal formado por glucosas, celobiohidrolasas que liberan unidades de disacárido (celobiosa) desde los extremos, y  $\beta$ -glucosidasas las cuales hidrolizan celobiosa y productos solubles de cadena corta (5 residuos o menos) en glucosa monomérica. Después, la glucosa puede ser fermentada y convertida a etanol en el mismo bio-reactor con levaduras como *S. cerevisiae*. Este proceso se conoce como sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés). En este proceso, el aspecto limitante es el económico y se debe fundamentalmente al elevado costo de los complejos de celulasas que se emplean para realizar la sacarificación (Sheehan y Himmel, 1999; Wooley *et al.*, 1999).

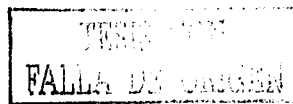
#### **Composición e Hidrólisis de la Hemicelulosa**

La hemicelulosa es un polisacárido no celulósico de la pared celular de plantas. Las más comunes están compuestas de polímero de xilosa junto con un ácido urónico (ácido de azúcar), radicales acetilo, arabinosa (pentosa) y manosa (hexosa). La hemicelulosa no tiene relación química con la celulosa. La hemicelulosa frecuentemente rodea a las fibras de celulosa y aumenta su fuerza de unión y de tensión (Katzen *et al.*, 1999).

Para despolimerizar a la hemicelulosa se prefiere la hidrólisis ácida con sulfúrico diluido, a presiones mayores de una atmósfera y temperaturas de 120 a 200°C, debido principalmente a su bajo costo (Ingram *et al.*, 1998). La biomasa en partículas de tamaño relativamente pequeño se somete al proceso de hidrólisis ácida diluida, generando una fracción sólida, mayoritariamente compuesta de celulosa y lignina; y una líquida, que contiene un jarabe, producto de la despolimerización del xilano presente en la hemicelulosa.

#### **Limitaciones de los Microorganismos Etanologénicos Silvestres**

La mayoría de los microorganismos en la naturaleza utilizan glucosa para llevar a cabo sus actividades metabólicas. Sin embargo, la variedad de microorganismos que utilizan pentosas y hexosas, de manera secuencial, es restringida. Esta variedad es nula para microorganismos silvestres que producen eficientemente etanol. Específicamente *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* son los microorganismos con mayor capacidad para metabolizar azúcares (principalmente glucosa, fructosa y sacarosa) en etanol. Sin embargo las cepas silvestres



de estos microorganismos no metabolizan xilosa ni arabinosa (Zhang *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1998).

### *Zymomonas mobilis*

*Z. mobilis* es una bacteria Gram<sup>-</sup> que se aisló a partir del pulque, puede utilizarse para la producción de etanol, proceso en el que se han reportado velocidades de producción varias veces mayor que la de *S. cerevisiae* (Zhang *et al.*, 1995). No obstante, sólo puede fermentar un rango muy limitado de azúcares. Utiliza la vía de Entner-Doudoroff preferencialmente sobre la glucólisis. La vía para la producción de etanol, incluye la actividad de dos enzimas claves: piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa.

La piruvato descarboxilasa (PDC) cataliza la descarboxilación no oxidativa de piruvato para producir acetaldehído y dióxido de carbono, se ha observado que esta enzima tiene alta afinidad por el piruvato ( $K_m=0.4\text{mM}$ ), lo que hace que la etanologénesis sea muy eficiente (Ingram *et al.*, 1999). Su peso molecular es de 62.3 kD. Presenta una relativa estabilidad al calor ya que puede soportar un tratamiento a 60°C, 30 min, después de la adición de TPP y cloruro de magnesio 1mM cada uno (Conway *et al.*, 1987a).

Además, *Z. mobilis* tiene dos isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (ADH), que catalizan la reducción del acetaldehído a etanol, acompañado por la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. La isoenzima I (ADHA) contiene Zn en su sitio activo, su PM se encuentra entre 34 y 40 kD. La isoenzima II (ADHB) tiene Fe, en lugar de Zn, en su sitio activo, su PM es de 40.1 kD. Aunque la ADHB es la isoenzima más abundante en *Z. mobilis*, ambas parecen contribuir durante la fermentación. ADHB tiene un alto grado de especificidad por el etanol como un sustrato (Conway *et al.*, 1987b).

### *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* es un hongo eucariótico unicelular comúnmente conocido como levadura, que ha sido tradicionalmente usada en la producción de bebidas alcohólicas y alimentos. La conversión industrial de carbohidratos a etanol recae en organismos que toleran altos niveles tanto de sustrato como de producto, y que además producen etanol a temperaturas relativamente altas. *S. cerevisiae* es la levadura más tolerante a etanol y puede crecer en concentraciones de 8-12% de etanol, y fermentar azúcares a niveles del 12-20% de etanol. Bajo condiciones anaeróbicas, puede



crecer y producir etanol. El carbohidrato es convertido a piruvato por glicólisis, y entonces una piruvato descarboxilasa convierte el piruvato a acetaldehído y dióxido de carbono, y una alcohol deshidrogenasa reduce el acetaldehído a etanol. El rendimiento con sustratos puros como glucosa y sacarosa, es 95%, y con materiales sin procesar de grado industrial es 91% (Garay-Arroyo *et al.*, 2003). El material típico para la fermentación alcohólica por levadura es el azúcar contenido en materiales como caña y remolacha, que pueden ser fermentadas directamente.

### **Estrategias Biotecnológicas para la Conversión de Biomasa en Etanol.**

#### **Modificación genética de microorganismos silvestres etanológicos para que puedan metabolizar pentosas y hexosas**

##### ***Zymomonas mobilis***

La manipulación genética de *Z. mobilis* ha sido estudiada por varios grupos, incluyendo el National Renewable Energy Laboratory (NERL). *Z. mobilis* es de forma natural un microorganismo muy tolerante a etanol (arriba de 2000 mM), pero tiene un rango de sustratos extremadamente limitado. Han sido aislados e introducidos en *Z. mobilis*, los cuatro genes de *E. coli* necesarios en el metabolismo de xilosa, usando promotores glicolíticos para dirigir la transcripción (Zhang *et al.*, 1995). La recombinante resultante derivada de *Z. mobilis* fue exitosa pues lograba fermentar xilosa a etanol. Sin embargo, no se alcanzaron los niveles ni la velocidad esperada de conversión de xilosa en etanol. En su lugar, la recombinante de *Z. mobilis* produjo a partir de xilosa, niveles de etanol menores que cepas recombinantes etanológicas derivadas de *E. coli* (Beall *et al.*, 1991; Lindsay *et al.*, 1995). Además, esta cepa derivada de *Z. mobilis* aún carece de la habilidad para fermentar otros azúcares presentes en los derivados de hemicelulosa, siendo además particularmente sensible a los inhibidores presentes en los hidrolizados de hemicelulosa (Ingram *et al.*, 1998).

##### ***Saccharomyces cerevisiae***

*S. cerevisiae* silvestre no es capaz de fermentar xilosa a etanol o de al menos usarla para crecer aeróbicamente. Aunque el género *Saccharomyces* no es capaz de metabolizar xilosa aeróbica o anaeróbicamente, existen otras bacterias como *Pichia stipitis* y *Candida shehatae* que son



capaces de fermentar xilosa a etanol, o bien de usarla para crecer aeróbicamente. Sin embargo, estas levaduras no llevan a cabo una fermentación alcohólica eficiente, y tienen una tolerancia a etanol relativamente baja. En *P. stipitis*, el metabolismo de la xilosa depende de una xilosa reductasa (XR) para convertir xilosa a xilitol, una xilitol deshidrogenasa (XDH) para convertir xilitol a xilulosa y de una xilulocinasa (XK) para convertir xilulosa a xilulosa 5-fosfato. La síntesis de estas enzimas requiere de xilosa para la inducción, y también es total o al menos parcialmente reprimida por la presencia de glucosa (Ho *et al.*, 1998).

*Saccharomyces spp* sí son capaces de fermentar xilulosa, también xilosa cuando una xilosa isomerasa, enzima bacteriana que cataliza la conversión de xilosa a xilulosa está presente en el medio. Estudios previos han indicado que *Saccharomyces spp* carece sólo de las enzimas para la conversión de xilosa a xilulosa, pero que la mayoría poseen una baja actividad de XK. Por más de una década, se han llevado a cabo intentos para clonar y expresar varios genes de xilosa isomerasa bacterianas en *S. cerevisiae*, pero han fallado. Kötter y cols. 1993, desarrollaron una cepa recombinante de *S. cerevisiae*, en la cual clonaron los genes XR y XDH de *P. stipitis*, pero la recombinante fermentaba xilosa extremadamente lento, produciendo muy poco etanol y mucho xilitol (Kötter y Ciriacy, 1993).

Ho y cols. 1998, clonaron en un operón, los genes que codifican para las enzimas XR, XDH y XK de *P. stipitis* y los pusieron bajo la regulación de un promotor glicolítico, la cepa recombinante cofermentó glucosa y xilosa produciendo etanol como producto mayoritario, aunque siguió produciendo xilitol minoritariamente (Ho *et al.*, 1998).

### **Modificación genética de microorganismos silvestres que metabolizan pentosas y hexosas, para tener la capacidad de producir etanol**

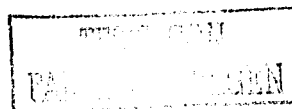
#### ***Escherichia coli***

*E. coli* produce etanol como un producto de fermentación minoritario por una vía diferente a la de *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* (ver figura 2). En *E. coli*, el piruvato es convertido normalmente a acetil-CoA y formato por la piruvato-formato-liasa. El acetil-CoA es reducido a un aldehído (aldehído deshidrogenasa) después a etanol (alcohol deshidrogenasa) en una reacción de dos pasos requiriendo dos moléculas de NADH (Ingram *et al.*, 1998).



Estudios iniciales de Brau y Sahn (1986), reportaron la expresión en altos niveles de *pdc* de *Z. mobilis* en *E. coli*. Los niveles de etanol producidos (49mM) a partir de glucosa 25mM fueron equivalentes a aquellos producidos por *Z. mobilis*. Estos estudios demostraron que la piruvato descarboxilasa recombinante y los niveles nativos de alcohol deshidrogenasa de *E. coli* fueron suficientes para dirigir al piruvato hacia etanol mediante una vía parecida a la de *Z. mobilis* en bajas concentraciones de azúcar (Brau y Sahn, 1986). La fermentación fue menos eficiente a altas concentraciones de azúcar y la recombinante menos tolerante a etanol que la cepa nativa. Estudios posteriores identificaron que la causa de estas limitaciones fue la menor concentración de alcohol deshidrogenasa. Altos niveles de sustrato fueron fermentados eficientemente a etanol por mutantes de *E. coli* sobre-expresando ambas enzimas la PDC de *Z. mobilis* y la ADH nativa de *E. coli* (ADHE) (Ingram *et al.*, 1991).

Conway y cols. 1987, subclonaron y secuenciaron los dos genes de alcohol deshidrogenasa de *Z. mobilis* (*adhA* y *adhB*), ambas ADH fueron expresadas en altos niveles en *E. coli* TC4 (Conway *et al.*, 1987b). Ingram y cols. 1987, seleccionaron al gen *adhB* para ser usado en la construcción de un operón artificial para producir etanol utilizando como vector a pUC18. El operón contendría los dos genes necesarios para la conversión de piruvato a etanol, utilizando como promotor a  $P_{lacZ}$  seguido de un sitio de unión a ribosoma (RBS), la región mínima codificante de *pdc*, otro RBS y la región mínima codificante de *adhB* y el terminador de la transcripción de *adhB*. La *E. coli* que contenía a la construcción creció ( $>10 OD_{550nm}$ ) más que la cepa progenitora en cultivo líquido y produjo más de 750 mM de etanol, produjo colonias más grandes y elevadas en placas con agar LB con glucosa que en placas con agar LB sin glucosa, creciendo poco sin glucosa. Como se muestra en la figura 2, la PDC proveniente de *Z. mobilis* tiene una afinidad mayor por el piruvato que las enzimas que dan origen a otros productos de fermentación, y que compiten por la disponibilidad de piruvato en *E. coli*. De esta forma, una expresión eficiente de la *pdc* y la *adhB* de *Z. mobilis* en *E. coli*, permite canalizar eficientemente los esqueletos de carbono, provenientes de la xilosa o glucosa, preferencialmente hacia etanol (Ingram *et al.*, 1987).



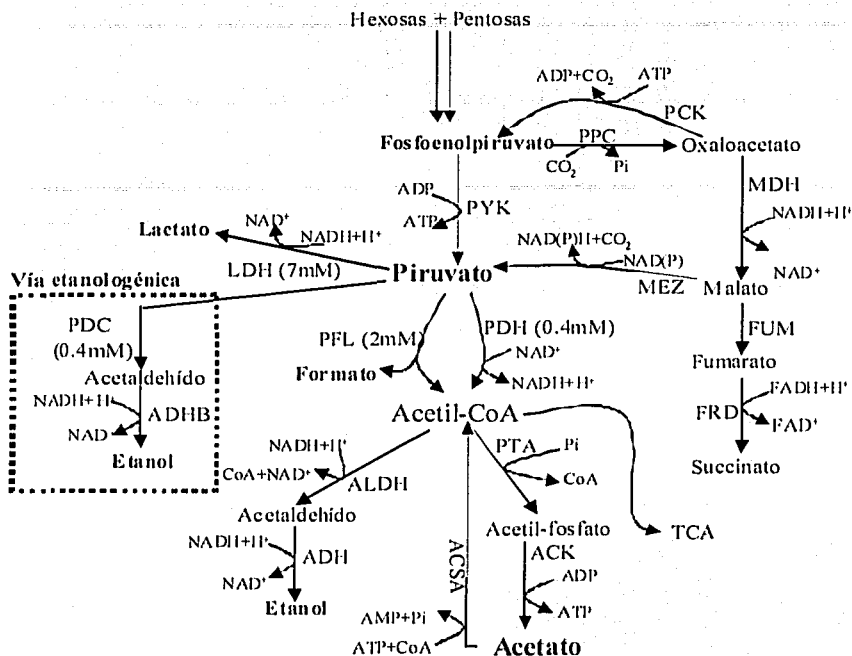
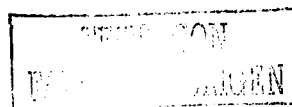


Figura 2 Metabolismo de glucosa y xilosa en *E. coli* B, y su desviación hacia la producción de etanol.

ACSA: acetil-CoA sintetasa, ACK: acetato cinasa, ADH: alcohol deshidrogenasa, ALDH: aldehído deshidrogenasa, FRD: fumarato reductasa, FUM: fumarasa, LDH: lactato deshidrogenasa, MDH: malato deshidrogenasa, MEZ: enzima málica, PCK: fosfoenolpiruvato carboxilasa, PDH: piruvato deshidrogenasa, PFL: piruvato formato liasa, PPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa, PTA: fosfotransacetilasa, PYC: piruvato carboxilasa. Genes de *Z. mobilis*: PDC, piruvato descarboxilasa, ADHB, alcohol deshidrogenasa.

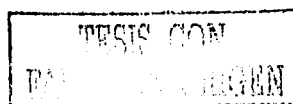
En estudios subsecuentes se utilizaron varios promotores para variar el nivel de la expresión de los genes de *Z. mobilis* en *E. coli* proporcionando las bases para mejorar el crecimiento de las cepas recombinantes (Ingram y Conway, 1988). Los ácidos producidos normalmente en fermentaciones de *E. coli* limitan el tamaño de la colonia y la densidad del cultivo. El reemplazo de estos ácidos por etanol, un compuesto neutro, es menos dañino para *E. coli* que los ácidos láctico, fórmico, succínico o acético. Afortunadamente, los niveles de expresión genética en la construcción original, TC4 (pLOI295), probaron estar cerca de los óptimos para la redirección del metabolismo central en *E. coli*. Estos niveles óptimos fueron solo ligeramente más elevados



(aprox. el 6% de proteína celular) que los niveles de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa producidos por *Z. mobilis*.

Para construir una cepa industrial robusta y con una mayor estabilidad genética para la producción de etanol se llevó a cabo la integración los genes de *Z. mobilis* en el cromosoma de *E. coli* B (cepa silvestre que tiene la capacidad de utilizar hexosas y pentosas de manera secuencial), estrategia en la que bajo el control del promotor de *pjl* se insertó un operon artificial consistente de *pdc* y *adhB*, seguidos del gen *cat* usado como selección. La cepa recombinante derivada de *E. coli* B expresó los genes de etanol de *Z. mobilis* en aproximadamente 1/10 de los niveles deseados. Fortuitamente, mediante la selección subsiguiente en placas conteniendo altos niveles de cloramfenicol (600 mg/l) se obtuvieron mutantes estables las cuales expresaron altos niveles de *pdc* y *adhB* (aprox. 5% de proteína celular), equivalentes a aquellas expresadas en derivadas de pUC18. Se incluyó una mutación en fumarato reductasa para minimizar la producción de succinato. El organismo resultante, *E. coli* KO11, produce etanol a partir de todos los azúcares constituyentes de la hemicelulosa con un rendimiento teórico mayor al 95% en medios de cultivo ricos (Ohta *et al.*, 1991).

Adicionalmente se produjeron derivadas de KO11 carentes del sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS), por lo que las derivadas ya no fermentaron azúcares como glucosa por PTS (Lindsay *et al.*, 1995). Estas mutantes retuvieron la habilidad para fermentar xilosa y otros azúcares que utilizaban sistemas de transporte alternativo. Se aislaron varias pseudo-revertantes, las cuales regeneraron la habilidad para fermentar glucosa, presumiblemente debido a una mutación en el sistema transportador de galactosa (Flores *et al.*, 1996; Saier *et al.*, 1973). Algunos de estos aislados producían etanol más rápido que la progenitora; todos retuvieron la habilidad para fermentar pentosas. Con dos de estas mutantes, se produjo casi 60 g/l de etanol a partir de xilosa (1200 mM) después de 48 h (Lindsay *et al.*, 1995). Con estas cepas recombinantes de *E. coli* se logra una conversión de xilosa o glucosa del 90% respecto al teórico, a una velocidad de producción de 1 g de etanol por hora por litro de medio de cultivo. Como se viene practicando desde hace dos décadas, dichos microorganismos y estrategias están patentados (Ingram *et al.*, 1991), y su uso con fines comerciales o de producción están protegidos.



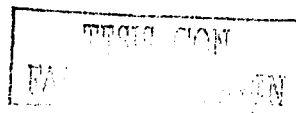
### *Erwinia y Klebsiella*

Bacterias entéricas como *Erwinia* y *Klebsiella* tienen la habilidad nativa para metabolizar muchos de los azúcares que son constituyentes de la hemicelulosa. Tolan y cols. 1987, usaron el gen de *pdc* de *Z. mobilis* clonado por Brau y cols. para mejorar la producción de etanol en *Erwinia chrysanthemi* B374 (Tolan y Finn, 1987a) y *Klebsiella planticola* ATCC33531 (Tolan y Finn, 1987b), ambas fermentando pentosas. En estos organismos el etanol es producido vía acetil-CoA pero en mayor concentración que en *E. coli* silvestre, probablemente debido a que los niveles nativos de ADH en estos organismos sean mayores que en *E. coli*. Las recombinantes de *E. chrysanthemi* y *K. planticola* fueron capaces de producir niveles más elevados de etanol, que los logrados con la original construcción derivada de *E. coli* (Brau y Sahn, 1986). Estas cepas produjeron arriba de 24 g/l de etanol (520mM) usando xilosa. De nuevo el plásmido que contenía el gen *pdc* parecía reducir la tolerancia a etanol.

Ingram y cols. (1998) seleccionaron a *Klebsiella oxytoca* para el desarrollo de un biocatalizador para fermentar celulosa. Este microorganismo es naturalmente abundante en la pulpa y en el papel de desecho, posee la habilidad nativa para metabolizar celobiosa. En *K. oxytoca*, la entrada de la celobiosa está mediada por fosfoenolpiruvato dependiente de PTS, el cual libera intracelularmente celobiosa-fosfato (Lai *et al.*, 1997). Después de la hidrólisis, ambas glucosa y glucosa 6-fosfato entran a glicólisis. *K. oxytoca* M5A1 se transformó con un fragmento circular que contenía *E. coli p1f::Z. mobilis pdc adhB y cat*, como previamente se describió para *E. coli* B (Ohta *et al.*, 1991). Las mutantes que produjeron niveles altos de etanol se obtuvieron otra vez por selección con concentraciones altas de cloramfenicol. Una de éstas, *K. oxytoca* P2, ha sido analizada en pruebas de sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés) con sustratos celulósicos usando fermentadores de laboratorio (0.5 a 14 litros) (Ingram *et al.*, 1998).

### *Bacillus subtilis*

Sin embargo, puede observarse que tanto los microorganismos como los procesos son perfectibles, y todavía no se cuenta con una cepa recombinante que lleve a cabo la bioconversión de biomasa a etanol, mucho menos aún que tenga rendimientos y productividades altas. Esta aseveración, además de estimular a la mejora de los biocatalizadores antes descritos, promueve la



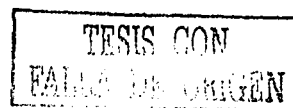


búsqueda y escrutinio de nuevos biocatalizadores. En este sentido, *B. subtilis* posee características que pueden ser ventajosas para el desarrollo de un biocatalizador etanológico, características que a continuación se describen.

Después de *E. coli* y *S. cerevisiae*, *B. subtilis* es uno de los microorganismos mejor caracterizados en cuanto a su microbiología básica y aplicada se refiere. Es una bacteria gram-positiva con un contenido bajo de GC. Fue aislado del suelo y tolera ambientes adversos. Se conoce su genoma completo y es ampliamente usado en la industria alimenticia por ser considerado un microorganismo GRAS (generally regarded as safe) por la Food & Drug Administration (FDA) de los EUA.

De manera natural, *B. subtilis* presenta una notoria capacidad para exportar al medio diversas enzimas degradativas (glucanasas, proteasas y nucleasas) que le permiten asimilar eficientemente los distintos sustratos disponibles en su entorno (Stülke y Hillen, 2000). Esta capacidad excretora se ha utilizado para exportar proteínas heterólogas con alta eficiencia (Priest, 1985; Besson *et al.*, 1987) por lo que es posible concebir que, aunado a las enzimas degradativas que comúnmente produce, podría excretar eficientemente otras enzimas heterólogas tales como celulasas, xilanasas y celobiasas. Un organismo con tales características, podría utilizar los desechos agroindustriales como sustratos de la fermentación con un mínimo de tratamientos previos, eliminando el cuello de botella y abaratando este proceso; fundamentalmente por el elevado costo de los complejos de celulasas que se emplean para realizar la sacarificación (Sheehan y Himmel, 1999; Wooley *et al.*, 1999).

*B. subtilis* puede utilizar alrededor de 18 diferentes mono y disacáridos como fuente de carbono. Éstos son introducidos por la célula, fosforilados y después catabolizados por glicólisis o la vía de las pentosas. Puede metabolizar glucosa, manosa, fructosa, ribosa y arabinosa, pero parece que no es capaz de crecer utilizando a xilosa y galactosa como únicas fuentes de carbono, atribuyéndose este hecho únicamente a la carencia de los transportadores. La ausencia de estos transportadores es sorprendente ya que puede sintetizar todas las proteínas necesarias para metabolizar ambos azúcares; aunque la expresión de estas proteínas que incorporan a la xilosa al metabolismo celular se inducen por la presencia de ésta. En *B. megaterium* se identificó, en el operón *XYL*, el gen *xyIT* que codifica para un simporter protón-xilosa, pero que *B. subtilis* no tiene. Krispin y cols., (1998)

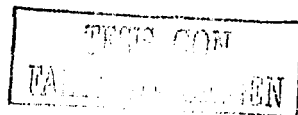


investigando el efecto tóxico de la galactosa en cepas mutantes en el gen *galE* de *B. subtilis*, obtuvieron mutantes espontáneas que fueron hábiles para crecer en galactosa como única fuente de carbono. La caracterización de esas mutantes revelaron que el transportador para arabinosa (*araE*) funcionaba como transportador de al menos tres azúcares: arabinosa, xilosa y galactosa, también encontraron que el transporte de galactosa sufre represión catabólica por glucosa (Krispín y Allmansberger, 1998). A la fecha ya se han obtenido mutantes de *B. subtilis* que puede utilizar xilosa sin sufrir la represión catabólica abordando dos enfoques: Krispín y cols. (1998) interrumpieron la secuencia del gen que codifica para el represor del transportador (*araR*) (Krispín y Allmansberger, 1998); otros autores expresaron de forma constitutiva el gen *araE* que codifica para un simporter no específico H<sup>+</sup>:pentosa que transporta arabinosa, xilosa y galactosa (Stülke y Hillen, 2000).

*B. subtilis* puede crecer en condiciones anaeróbicas utilizando como último aceptor de electrones al nitrato (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997). Espinosa-de-los-Monteros y cols., (2000) evaluaron el potencial metabólico de *B. subtilis* en condiciones de fermentación de glucosa y de respiración de nitratos, encontrando que *B. subtilis* tiene una capacidad elevada para metabolizar glucosa bajo respiración de nitratos. Sin embargo, en condiciones de fermentación (en ausencia de nitrato) su crecimiento es reducido y fermenta produciendo únicamente ácido láctico, sugiriendo que existe un exceso de poder reductor y que es necesario reciclar el NADH generado en la glicólisis para obtener un mayor crecimiento (Espinosa-de-los-Monteros *et al.*, 2001).

Como se muestra en la figura 3, la integración de una vía sintética para producir concentraciones elevadas de etanol en *B. subtilis* permitiría solventar el problema del balance redox y favorecer un mejor crecimiento mediante la producción de un metabolito menos tóxico que el lactato.

El acetato se produce en condiciones aerobias cuando *B. subtilis* crece a velocidades altas o con concentraciones elevadas de azúcar (Hernández, 2003; Snay *et al.*, 1989). En condiciones de fermentación se produce principalmente lactato (Hernández, 2003) y cantidades apenas detectables de etanol (Nakano *et al.*, 1997). El acetato y acetoina se producen en condiciones anaerobias bajo respiración de nitratos, cuando el nitrato se encuentra en altas concentraciones. El lactato y butanediol se producen en condiciones anaerobias bajo respiración de nitratos, cuando el nitrato es limitante (Espinosa-de-los-Monteros *et al.*, 2001).





### ***B. subtilis* como organismo huésped para la sobreproducción de proteínas recombinantes**

Los sistemas de expresión de proteínas homólogas y heterólogas son ampliamente empleados en la obtención de proteínas recombinantes, por la conveniencia en su manipulación y habilidad para alcanzar altos niveles de producción. El diseño y la construcción de una unidad de expresión debe involucrar e incluir secuencias regulatorias transcripcionales y traduccionales adecuadas. A nivel transcripcional, la secuencia promotora puede ser constitutiva o inducible; fuerte, débil o de fuerza media, también puede en algunos casos incluirse terminadores o atenuadores transcripcionales. A nivel transcripcional son importantes las secuencias del sitio de unión al ribosoma, la disponibilidad de tRNAs, el uso preferencial de codones, etc.

El inicio de la transcripción es controlada por secuencias promotoras, las cuales pueden ser moduladas por una variedad de mecanismos, principalmente la interacción de una o más proteínas reguladoras con secuencias específicas en la vecindad del promotor (Lewin, 2000).

En *B. subtilis* se han empleado varios promotores nativos y promotores heterólogos para la expresión de genes heterólogos: promotores fuertes de la fase vegetativa: vegII (Peschke *et al.*, 1985); promotores regulados temporalmente: el de subtilisina (*aprE*) (Jan *et al.*, 2001) y el de  $\alpha$ -amilasa (Park *et al.*, 1989), entre otros.

Estudios dirigidos hacia la caracterización de promotores silvestres de *B. subtilis*, permiten su selección para ser utilizado como secuencia promotora para la expresión de la proteína de interés.

Jan y cols., (2001) llevaron a cabo la caracterización de la región reguladora del gen *aprE* que codifica para la proteasa alcalina mayoritaria conocida como subtilisina, enzima que se expresa fuertemente durante la fase estacionaria de *B. subtilis* (Jan *et al.*, 2000). El promotor *aprE* silvestre no tiene consenso en las cajas -35 y -10, y la modificación de la secuencia silvestre por la secuencia consenso en la caja -35 del *PaprE*, conlleva a un incremento de 106 veces de la fuerza del promotor *PaprE* modificado respecto al silvestre. Estudios sobre la regulación transcripcional del gen *aprE* sugieren que se lleva a cabo a través de la acción concertada de múltiples elementos de control, como son las proteínas AbrB, Hpr, SinR y DegU/DegS, entre otras. las tres primeras regulan negativamente. La cepa *B. subtilis* BB82 tiene una mutación en el regulador negativo Hpr, característica que le confiere a *PaprE* una expresión aprox. 3.3 veces más fuerte que la cepa silvestre (Jan *et al.*, 2001).

También, las secuencias promotoras de los genes ribosomales de *B. subtilis* han sido motivo de estudio por Rudner y cols., que han llevado a cabo estudios en la expresión diferencial de 7 de los 10 operones rRNA llevando a cabo fusiones a *lacZ*, y en una sola copia encontrando que todos se encuentran bajo el control de la velocidad de crecimiento, y se agrupan en fuertes (*rrnO*, *rrnW*), fuerza intermedia (*rrnA*, *rrnJ*) y débiles (*rrnD*, *rrnB*) (Rudner *et al.*, 1993).

Otra variable importante para la expresión de genes heterólogos es el fondo genético de la cepa. Ye y cols. (1996), han interrumpido los genes que codifican para las siete proteasas mayoritarias extracelulares de *B. subtilis*, llamándola *B. subtilis* WB700 (Ye *et al.*, 1996). En esta cepa, la actividad proteolítica extracelular se ha reducido a tan solo el 0.32% con respecto a su cepa progenitora, por lo que constituye una buena cepa receptora para expresar de manera estable proteínas heterólogas, como podría ser por ejemplo a PDC y ADHB.

En 1994, Barbosa e Ingram probaron llevar a cabo la expresión de las enzimas PDC y ADHB de *Z. mobilis* en *B. subtilis* cepa YB886. Analizaron la expresión de estas enzimas bajo la regulación de un promotor del fago SPO2 utilizando un vector multicopia, pero sus resultados mostraron no ser contundentes; ya que la actividad específica de PDC no la pudieron medir y la actividad específica de ADHB fue muy baja, aunque pudieron observar la expresión de ambas enzimas llevando a cabo un ensayo de Western blot, no mencionaron haber obtenido etanol (Barbosa y Ingram, 1994).

## JUSTIFICACIÓN

Es deseable que un solo microorganismo hidrolice celulosa, metabolice una amplia variedad de azúcares, incluyendo hexosas (p. ej. glucosa y manosa), disacáridos (principalmente celobiosa y sacarosa) y pentosas (a decir xilosa y arabinosa), y que además utilice estas fuentes de carbono para producir etanol.

*B. subtilis* posee características adecuadas para cumplir este objetivo, y aunque no hay impedimentos aparentes que prevengan la expresión de los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis* como enzimas activas en *B. subtilis*, no se ha reportado producción de etanol en cepas recombinantes de *B. subtilis* que poseen plásmidos multicopia conteniendo ambos genes (Barbosa y Ingram, 1994). En este sentido se propone utilizar estrategias enfocadas a dirigir el metabolismo de *B. subtilis* para producir etanol, creando una vía sintética, similar a la ya reportada para *E. coli* (Ingram y Conway, 1988), integrando en el cromosoma de *B. subtilis* los genes de *pdc* y *adhB* provenientes de *Z. mobilis*.

## HIPÓTESIS

Si se utilizan secuencias de promotores y señales traduccionales que *B. subtilis* reconoce preferencialmente en la construcción de un vector de integración, conteniendo los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis*, entonces se podrá obtener una cepa de *B. subtilis* con actividad enzimática de piruvato decarboxilasa y alcohol deshidrogenasa, y con capacidad para producir etanol.

## OBJETIVO GENERAL

Integrar en el genoma de *B. subtilis* los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis* para que con su expresión *B. subtilis* pueda producir etanol.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar y construir un operón artificial a partir de los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis*.
- Construir un vector de integración a partir de pSG-BFAE (plásmido integrativo para *B. subtilis*) y el operón artificial.
- Integrar este vector en el cromosoma de *B. subtilis*, en dos diferentes fondos genéticos: cepa con mutación en el regulador negativo Hpr del promotor de la subtilisina (BB82  $\Delta nprE$ , *hisA*, *hpr2*); y cepa con interrupciones-supresiones en las 7 proteasas mayoritarias (CH1  $\Delta nprE$ ,  $\Delta aprE$ ,  $\Delta epr$ ,  $\Delta bpf$ ,  $\Delta npr::ble$ ,  $\Delta nprB::bsr$ ,  $\Delta vrpE::ery$ , protótrofa, Cm<sup>R</sup>::Nm<sup>R</sup>).
- Determinar las actividades enzimáticas de PDC y ADHB de las cepas obtenidas, así como la producción de etanol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la tabla 1 se presentan las cepas bacterianas, en la tabla 2 se presentan los vectores, y en la tabla 3 los oligonucleótidos, utilizados o construidos en este trabajo.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizados u obtenidas en este trabajo.

Cepas	Genotipo y/o fenotipo	Fuente
<i>E. coli</i> XLI-blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> (Nal <sup>R</sup> ), <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac F</i> *[ <i>traD36 proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZΔM15</i> , Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]. Cepa transformable a altas eficiencias y deficiente en recombinación. Modifica pero no restringe el DNA transformado, por lo que se utiliza para propagar a gran escala plásmidos, fagos filamentosos y fagémidos. El F <sup>'</sup> de esta cepa permite la selección de colonias blancas/azules en XGal y permite la super-infección con el bacteriófago M13.	Ceparío del Laboratorio
<i>E. coli</i> JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , Δ ( <i>lac-proAB</i> ), F <sup>'</sup>	Ceparío del Laboratorio. (Rodríguez <i>et al.</i> , 1975)
<i>B. subtilis</i> B1380	Δ <i>nprE</i> , <i>hisA</i> , <i>glyB</i>	Ceparío del Laboratorio
<i>B. subtilis</i> B1382	Δ <i>nprE</i> , <i>hisA</i> , <i>hpr2</i>	Ceparío del Laboratorio
<i>B. subtilis</i> B1317	B1380 <i>degU32</i>	Ceparío del Laboratorio
<i>B. subtilis</i> J11	B1380 Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PaprEttgaca-lacZ</i>	(Jan <i>et al.</i> , 2001)
<i>B. subtilis</i> WB700	TrpC2, Δ <i>nprE</i> , Δ <i>aprE</i> , Δ <i>opr</i> , Δ <i>hpf</i> , Δ <i>npr::ble</i> , Δ <i>nprB::hsr</i> , Δ <i>vrpE::ery</i>	(Ye <i>et al.</i> , 1996)
<i>B. subtilis</i> CH1	WB700 protótrofa, Cm <sup>R</sup> , Lin <sup>R</sup> , Eri <sup>R</sup>	(Hernández, 2003)
CH1 Nm <sup>R</sup>	CH1 Cm::Nm	Este trabajo
CH1 Sp <sup>R</sup>	CH1 Cm::Sp	Este trabajo
SR-I	B1380 Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PrrnA-lacZ</i>	Este trabajo
SR-II	CH1 Nm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PrrnA-lacZ</i>	Este trabajo
SR1	CH1 Nm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PaprEttgaca/pdc/adh/TeryIII</i>	Este trabajo
SR2	BB82, Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PaprEttgaca/pdc/adh/TeryIII</i>	Este trabajo



Tabla 2. Vectores utilizados o contruidos en este trabajo.

Vector	Características	Fuente
pUC19	Es un plásmido de alto número de copias en <i>E. coli</i> , tiene origen de replicación derivado de pBR322. El sitio de clonación múltiple está en fase con el gen <i>lacZα</i> . Posee el gen <i>bla</i> (Ap <sup>R</sup> ).	BioLabs
pLOI276	Derivado de pUC19 que contiene el gen <i>pdc</i> de <i>Z. mobilis</i> bajo la regulación de <i>PlacZ</i> .	(Conway <i>et al.</i> , 1987a)
pLOI284	Derivado de pUC19 que contiene el gen <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> bajo la regulación de <i>PlacZ</i> .	(Conway <i>et al.</i> , 1987a)
pCm::Nm	pIC177. Cm <sup>R</sup> ::Nm <sup>R</sup>	BacillusStockCenter
pCm::Sp	pIC177. Cm <sup>R</sup> ::Sp <sup>R</sup>	BacillusStockCenter
pSG-PLK	Derivado de pSG35.1 que posee el sitio de clonación múltiple de pUC19 en lugar del <i>PaprE</i>	(Jan <i>et al.</i> , 2001)
pSG- <i>aprE</i> ttagaca	Derivado de pSG-PLK que porta <i>PaprE</i> , modificado en la caja -35, fusionado a <i>lacZ</i> .	(Jan <i>et al.</i> , 2001)
pCR-Blunt II-TOPO	Permite la clonación de productos de PCR, con la selección directa de recombinantes vía interrupción del gen letal <i>ccdB</i> . Posee el gen <i>kan</i> (Km <sup>R</sup> ).	Invitrogen
pTOPO- <i>PrrnA</i>	Derivado de pTOPO que porta <i>PrrnA</i> P2	Este trabajo
pSG- <i>PrrnA</i>	Derivado de pSG-PLK que porta <i>PrrnA</i> P2	Este trabajo
pTOPO- <i>aprE</i> ttagaca	Derivado de pTOPO que contiene <i>PaprE</i> con la modificación TTGACA en la caja -35.	Este trabajo
pTOPO- <i>pdc</i>	Derivado de pTOPO que contiene el gen <i>pdc</i> de <i>Z. mobilis</i> .	Este trabajo
pTOPO- <i>adh-term1</i>	Derivado de pTOPO que contiene el gen <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> , seguido del <i>TeryIII</i> A de <i>B. thuringiensis</i> .	Este trabajo
pUC- <i>aprE</i> ttagaca	Derivado de pUC19 que contiene <i>PaprE</i> con la modificación TTGACA en la caja -35.	Este trabajo
pTOPO- <i>pdc-adh-term1</i>	Derivado de pTOPO que contiene los genes <i>pdc</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> seguidos de <i>TeryIII</i> A de <i>B. thuringiensis</i> .	Este trabajo
pUC- <i>aprE</i> ttagaca- <i>pdc-adh-term1</i>	Derivado de pUC19 que contiene <i>PaprE</i> con la modificación TTGACA en la caja -35, seguido de los genes <i>pdc</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> y al final el <i>TeryIII</i> A de <i>B. thuringiensis</i> .	Este trabajo
pSG-BFAE	Derivado de pSG-PLK en el que se sustituyó el PLK- <i>lacZ</i> por un PLK corto formado por los sitios BamHI, FseI, AseI, EcoRI	Este trabajo
pSG- <i>aprE</i> ttagaca- <i>pdc-adh-term1</i>	Derivado de pSG-BFAE que contiene <i>PaprE</i> con la modificación TTGACA en la caja -35, seguido de los genes <i>pdc</i> y <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> y al final el <i>TeryIII</i> A de <i>B. thuringiensis</i> .	Este trabajo

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia*
rib5	5-CGG GAT CCC GCT GAA GGT GTT ATT CTA ATA TCG CTG ATG ACG AAC AGC-3
rib3a	5-TAT TAT CAT AAC ATT TAC CGC CGC TAC TGT CAA CAA CTT TTT AGC ATT TTC TTT TCA AAA-3
rib3b	5-AGG TAC CGA CAG TAT AAC TCA TTC TTT ACC GCT CCT TTA AGC GAC TTT ATT ATC ATA ACA TTT ACC G-3
aprE_BamHI	5-CGC GGA TCC GCA TCT GAT GTC TTT GCT TGG CG-3
aprE_Fsel	5-GCA AGG CCG GCC AGA GTA GAC TTA CTT AAA AGA CTA TTC TG-3
SD_PDC	5-GTC GGC CGG CCA AGG AGG AGT AAG CAA TGA GTT ATA CTG TCG G-3
pdc3'-AseI	5-CTT GGC GCG CCT TAC GGC TGT TGG CGG GCA GC-3
AseI_adhB	5-TAA GGC GCG CCA AGG AGG GTA TAG CTA TGG CTT CTT CAA CTT TTT ATA TTC-3
adh-termA	5-TCC GGT CAA TTG GAG TGA TGT CCG TTT TCC TGT TTT GAA ATT AG
terminador	5-AAA AGA ATT CAA AAA AAA ACG GAC ATC ACT CCG GTC AAT TGG AGT G-5
AFB_amy	5-TTA GGC GCG CCT TGG CCG GCC TTG GAT CCG GGC AGG CCA TGT CTG CCC G-3
AseI Eco-Cm	5-GAG GGC GCG CCT TGA ATT CTC ATG TTT GAC AGC TTA TC-3
catp <sub>sg</sub> plk	5-CTT TCT TAT CTT GAT AAT AAG GGT AAG TAT TGC CG-3
lacz <sub>psg</sub> plk	5-GGG TAA CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC G-3

\*Todos los oligonucleótidos fueron hechos por la Unidad de Síntesis IIBT-UNAM.

### Condiciones de Crecimiento

*E. coli* se creció en medio Luria-Bertani (por litro: 10 g bacto triptona; 5 g extracto de levadura; 5 g NaCl) líquido o solidificado con agar al 1.5%. *E. coli*/pTOPO se seleccionó en LB Km 50 mg/l, las derivadas de pUC19 en Ap 200 mg/ml y las derivadas de pSG Ap 100 mg/ml. Para observar producción de etanol se suplementó el medio LB con 20g/l glucosa. Todos los cultivos se crecieron a 37°C y 300 rpm, a menos que se especifiquen otras condiciones de incubación.

*B. subtilis* se creció en medio para esporulación Schaeffer líquido (por litro: 8g caldo nutritivo, 0.25g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1g KCl, se adiciona a la solución estéril: 1ml FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 1mM, 1ml MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 10mM, 1 ml CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1M) o solidificado con agar al 1.5%, seleccionando a las cepas transformadas en Schaeffer sólido con cloramfenicol (5 mg/l). Todos los cultivos se crecieron a 37°C y 300 rpm, a menos que se especifiquen otras condiciones de incubación.

### **Procedimientos genéticos y técnicas de DNA recombinante**

Todas las enzimas de restricción, T4 DNA polimerasa y marcadores de peso de fragmentos de DNA fueron obtenidos de New England BioLabs o MBI Fermentas, y se utilizaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Los demás reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química, Research Organics Inc, Merck-México y Difco Laboratories. Por lo general, las manipulaciones de DNA, que no se describen en este apartado, se llevaron a cabo por técnicas estándares, tal y como se describe en (Maniatis *et al.*, 1989).

**Reacciones de ligación.** Para llevar a cabo las reacciones de ligación se utilizó T4 DNA ligasa procedente de New England BioLabs o MBI Fermentas, y se utilizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Por lo general, se llevaron a cabo ligaciones 1:1 y 1:5 (Vector:Inserto) siendo la relación 1:5 la que proporcionó el mayor número de clonas recombinantes adecuadas.

**Transformación con DNA.** El microorganismo huésped utilizado para la construcción de los diferentes vectores fue *E. coli* XL1-blue. Las células electrocompetentes de *E. coli* XL1-blue se prepararon usando el medio YenB (medio de crecimiento libre de sales). Asimismo *E. coli* se transformó usando el método de electro-transformación descrito por (Sharma y Schimke, 1996). *B. subtilis* se transformó en estado de competencia utilizando el método descrito por (Anagnostopoulos y Spizizen, 1961).

**Purificación de DNA.** Para el análisis de clonas recombinantes, el DNA de plásmido se extrajo por el método de lisis-alcaldina descrito por (Rodríguez y Tait, 1983). Para los experimentos de clonación, los fragmentos de DNA procedentes de reacciones de PCR y de digestiones con enzimas de restricción mayores a 500 pb se analizaron y purificaron por gel de agarosa al 0.8 y 1.2 %, la purificación de DNA a partir de una banda de gel de agarosa se llevó a cabo por el método de destrucción-congelación del fragmento de agarosa con la posterior extracción con fenol y cloroformo, o bien utilizando el kit Rapid Gel Extraction System de Marligen Bioscience Inc.

Los fragmentos de PCR menores a 200 pb se analizaron y purificaron por gel de poliacrilamida 7.5% con TBE, la purificación de DNA a partir de una banda de gel de poliacrilamida se llevó a cabo poniendo este fragmento en un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregando 1 ml de agua mQ estéril e incubando a 37°C, 300 rpm durante 12 h. Después se saca el trozo de gel y se concentra hasta 50 µL al vacío (en Savant).

Las extracciones de DNA cromosomal de *B. subtilis* se hicieron por el kit Microbial Genomic DNA Isolation de MO BIO Laboratories, Inc., a partir de cultivos crecidos durante 24 h a 37°C y 300 rpm.

**PCR.** Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron utilizando Elongasa (New England BioLabs), Vent polimerasa (New England BioLabs) o Tfu polimerasa (Q-BIOgene). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 50 µL, con los siguientes reactivos: 50 ng de DNA como templado, 35 pM de cada oligonucleótido iniciador, 0.2 mM de mezcla de dNTPs, amortiguador de enzima al 10% y 1-2 unidades de DNA polimerasa. La amplificación de las mezclas se incubaron en los termocicladores Robo Cycler gradient 96, Stratagene o PCR Sprint, ThermoHybaid. El programa de amplificación se diseñó considerando el tamaño del templado a amplificar, la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y la polimerasa utilizada.

**PCR recursiva.** La secuencia del promotor *rrnA* P2 se obtuvo utilizando la técnica de PCR recursiva descrita por (Prodromou y Pearl, 1992). A partir de tres iniciadores de 70 nucleótidos se construyó una secuencia de 157 pb (secuencia que incluía el *PrrnA*, SD e inicio del gen *pdc*). En esta técnica cada primer sirve de templado de aquel oligo con que aparee, (ver figura 4). Los oligonucleótidos mayores de 40 nucleótidos se purificaron por gel de poliacrilamida 20% con urea 8M.

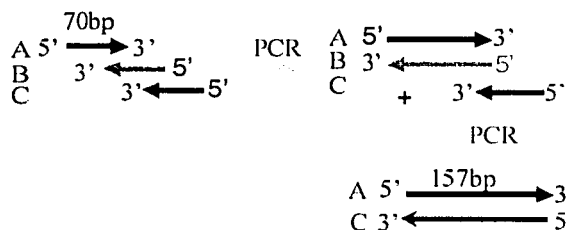
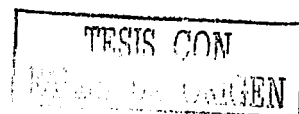


Figura 4. Representación del PCR recursivo.

En la misma reacción se adicionan los tres iniciadores (A, B y C), en una primera reacción de PCR, A aparee con B y se amplifican. En una segunda reacción de PCR, A ya podrá aparee con C y se amplificará la secuencia completa.



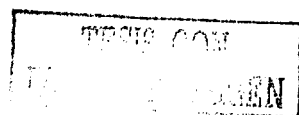
**Clonación en TOPO-Blunt.** Se utilizó Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit de Invitrogen, para clonar varios productos de PCR, se usó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

**Análisis de Secuencia de DNA.** Los tres elementos clonados en pTOPO se secuenciaron en ambas direcciones por el método de secuenciación de Sanger, utilizando los oligonucleótidos M13 Reverse Primer y M13 Forward (-20) incluidos en el Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen. También se secuenció el promotor *rrnA* P2 en la fusión con *lacZ* clonados en el vector pSG-*PrrnA*, utilizando los oligonucleótidos catpsgplk y laczpsgplk. El DNA para ser secuenciado se purificó con el kit Rapid Plasmid Miniprep System de Marligen, Bioscience Inc. Ambos análisis fueron llevados a cabo por la Unidad de Secuencia, IBT-UNAM.

**Análisis de Proteínas.** El análisis de proteínas se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. *E. coli* silvestre, *E. coli*/pUC-aprEttgaca-pdc-adh-term1 y *E. coli*/pSG-aprEttgaca-pdc-adh-term1 se hicieron crecer por separado en LB con 20 g/l de glucosa se incubaron a 30°C y 120 rpm durante 7.5 h. Se tomó el volumen correspondiente a 0.3 DO<sub>600</sub> que equivale aproximadamente a 2 mg/ml de proteína. Las muestras se prepararon de acuerdo (Laemmli, 1970). Se aplicó sobre cada carril la muestra correspondiente a 10 ó 15 µg de proteína celular aprox. Las bandas de proteína se visualizaron con azul de Coomassie.

**Ensayo de Actividad de β-galactosidasa.** La β-galactosidasa hidroliza el enlace β-glicosídico de la lactosa liberando galactosa y glucosa. Para la determinación de la actividad de la β-galactosidasa se utiliza O-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG), compuesto que posee un enlace β-glicosídico que puede ser hidrolizado por la β-galactosidasa liberando galactosa y O-nitrofenol, compuesto que absorbe a 420 nm, este método fue descrito por (Miller, 1972). La actividad enzimática se reportó como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total (µmol/min-mg<sub>PROT</sub>).

**Ensayo de Actividad de Piruvato Descarboxilasa (PDC).** La PDC produce acetaldehído y CO<sub>2</sub> a partir de piruvato, su actividad se determinó por medio de la reacción acoplada con la enzima



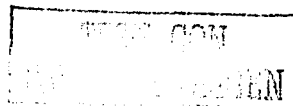
Alcohol Deshidrogenasa (ADH). La ADH reduce al acetaldehído a etanol y oxida al NADH en  $\text{NAD}^+$ , en el ensayo se monitorea la oxidación de NADH pues este compuesto tiene un pico de absorción a 340 nm (Hoppner y Doelle, 1983). La actividad enzimática se reportó como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{PROT}}$ ). En detalle este ensayo se describe en el Apéndice A.

**Ensayo de Actividad de Alcohol Deshidrogenasa B (ADHB).** La ADHB de *Z. mobilis* cataliza la reducción de acetaldehído dependiente de NADH a etanol. Además, esta ADHB de *Z. mobilis* tiene la particularidad de catalizar de forma reversible esta reacción. La actividad de ADHB se determinó a partir de la reacción inversa en la que se monitorea la reducción de  $\text{NAD}^+$  dependiente de etanol (Neale *et al.*, 1986). La actividad enzimática se reportó como unidades internacionales por miligramo de proteína celular total ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{PROT}}$ ). En detalle este ensayo se describe en el Apéndice B.

**Determinación de glucosa.** El consumo de glucosa se cuantificó en el analizador Bioquímico YSI mod. 2700, utilizando D-glucosa oxidasa inmovilizada.

**Ensayo para Producir Etanol *in vitro*.** Las enzimas necesarias para producir etanol a partir de piruvato son PDC y ADHB, ambas enzimas se encuentran en el extracto celular de KO11, SR1 y SR2. Si se adiciona al extracto celular de estas cepas, los sustratos y cofactores que las dos enzimas necesitan para llevar a cabo su actividad, se podrá producir etanol *in vitro*. En detalle este ensayo se describe en el Apéndice C.

**Análisis por Cromatografía de Gases de Productos Metabólicos.** La producción de etanol se cuantificó por cromatografía de gases (Agilent 6850, Wilmington, D.E.), utilizando como estándar interno 1-butanol.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras un análisis para escoger el promotor adecuado que regularía al operón etanológico se decidió utilizar al *PrrnA P2*, debido a que está reportado que tiene una expresión constitutiva, y además una expresión de fuerza media que no comprometería el crecimiento adecuado de la bacteria con problemas de carga metabólica (Rudner *et al.*, 1993).

### Construcción del promotor del gene *rrnA P2* utilizando la técnica de PCR recursiva

El promotor de genes ribosomales de *B. subtilis* (*rrnA P2*) presenta varios elementos conservados, como son: la caja -35 (TTGACA), el dinucleótido TG en -15 y una zona rica en adeninas arriba de la caja -35, la caja -10 sólo varía en una base respecto al consenso (TATgAT), además conserva la distancia de 17 pb entre las cajas -35 y -10 (Helmann, 1995). Adicionalmente, el promotor *rrnA P2* precede a un sitio de unión a ribosoma (RBS) diferente en una base respecto al consenso (AAGGAGc) para *B. subtilis*.

El producto del PCR recursivo incluye: el sitio de restricción, la región promotora *PrrnA*, el sitio de unión a ribosoma, y un fragmento de 22 pbs del inicio del gen *pdC* (ver figura 5).

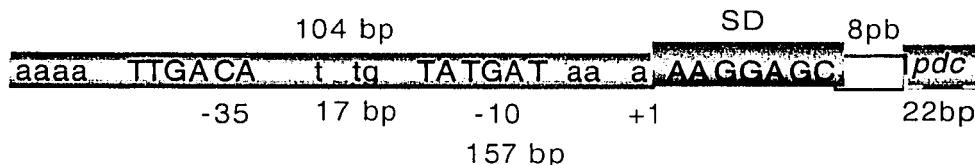
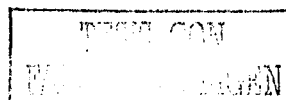


Figura 5. Representación del *PrrnA P2*.

Muestra al *PrrnA* de *B. subtilis* señalándose las bases consenso en la secuencia del promotor (104bp), seguido del RBS, separado 8pb del codón de inicio del gen *pdC* (22pb). Al principio de esta secuencia se le adicionó un sitio de restricción BamHI para facilitar su colonación.



### Clonación del producto de PCR recursivo en el plásmido TOPO-Blunt.

El producto del PCR recursivo de 157 pb se clonó en el plásmido TOPO-Blunt. La construcción correcta se confirmó por análisis con endonucleasas de restricción, comprobando la conservación de los sitios de restricción incluidos; también, se corroboró por secuenciación.

### Construcción del plásmido pSG-*PrrnA* por medio de la fusión de la región reguladora (*PrrnA* P2) con el gen *lacZ* del plásmido pSG-PLK.

pSG-PLK es un plásmido que presenta las siguientes características (ver figura 6): a) tiene un origen de replicación para *E. coli*, b) es un plásmido suicida para *B. subtilis* pues no presenta origen de replicación para esta bacteria, pero no lo requiere pues se desea que se integre en el genoma de éste. Para dicho propósito cuenta con dos regiones del gene *amy* (forward y back), con las que puede llevarse a cabo una recombinación homóloga doble. c) cuenta con resistencias a los antibióticos ampicilina y cloramfenicol, d) posee al gen *lacZ* y, e) el polilinker de pUC18 (PLK) que precede al gen *lacZ* (Jan *et al.*, 2001).

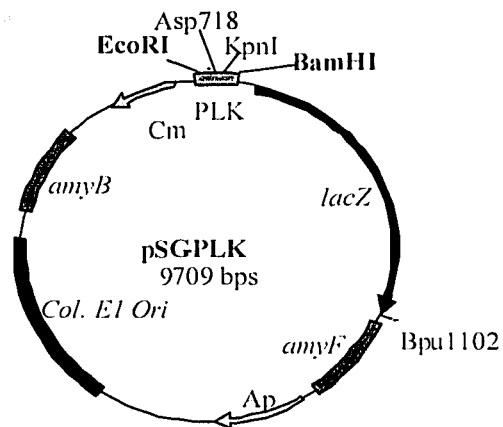
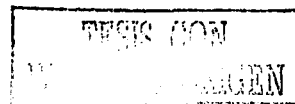


Figura 6. Representación esquemática del vector pSG-PLK.

*Col. El Ori*: origen de replicación. *amyB*: segunda parte de la secuencia del gen *amy*, Cm: resistencia a cloramfenicol, PLK: sitio múltiple de clonación, *lacZ*: gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa, *amyF*: primera parte de la secuencia del gen *amy*, Ap: resistencia a ampicilina.

Cabe mencionar que el gen *lacZ* de este plásmido carece de codón de inicio por lo que la fusión involucró la utilización del codón de inicio del gen *pdc* (que forma parte del producto de PCR recursivo obtenido), así como poner en fase al inicio del gen *pdc* con el gen *lacZ* y utilizarlo como gen reportero para evaluar la fuerza del promotor *rrnA* P2. Para llevar a cabo la





construcción del pSG-*PrrnA*, el fragmento de 9688 pb resultado de la digestión EcoRI y BamHI polimerizado del plásmido pSG-PLK se ligó con el fragmento de 164 pb resultado de la digestión EcoRI y RsaI del *PrrnA* construido con el PCR recursivo.

pSG-*PrrnA* es un plásmido que presenta las siguientes características: a) tiene origen de replicación para *E. coli*, b) es un plásmido suicida para *B. subtilis*, no presenta origen de replicación para éste, pero favorece su integración en el genoma de *B. subtilis*; cuenta con dos regiones del gen *amy* para llevar a cabo una recombinación homóloga doble, c) cuenta con resistencias a ampicilina y cloramfenicol, y d) tiene el gen *lacZ* precedido de *PrrnA* P2, por lo que se encuentra bajo su regulación, ver figura 7.

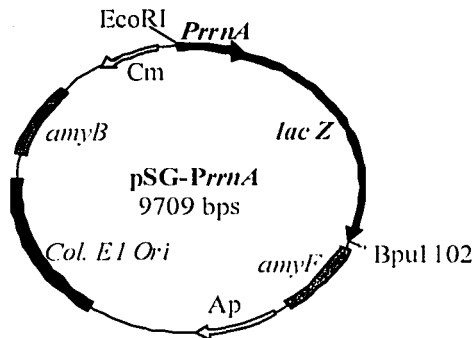


Figura 7. Vector pSG-*PrrnA*.

En este vector *lacZ* se encuentra bajo la regulación de *PrrnA*.

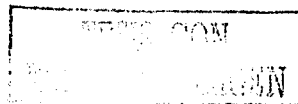
La fusión genética de *lacZ* con el *PrrnA* en pSG-*PrrnA* se corroboró por patrón de digestión y por secuenciación, ver figura 8.

```

AGGGTAGTTTCAGAATCCACCGGGAATTCGCCCTTCGGGATCCCGCTGAAGGTGTTA
TTCTAATATCGCTGATGACGAACAGCTTTTTTGAAAAGAAAATGCTAAAAAGTTGTT
GACAGTAGCGGCGGTAAATGTTATGATAAAAAGTCGCTTAAAGGAGCGGTAA
AGAAGTTATACTGTCGGTGATCCCgctggtttacaacgctgctgactgggaaaa.
  
```

Figura 8. Secuenciación de la fusión de *PrrnA* a *lacZ*.

Las cajas -35 y -10 se muestran en negritas, el RBS se muestra subrayado, el sitio EcoRI se muestra tachado, el codón de inicio está sobresaltado, fragmento de secuencia de *pdc* en cursivas, el inicio del marco de lectura de *lacZ* en pSG-PLK en minúsculas.



### Obtención de las cepas CH1 Nm<sup>R</sup> y CH1 Sp<sup>R</sup> derivadas de *B. subtilis* CH1

Una de las cepas propuestas para integrar los genes *pdv* y *adhB* es *B. subtilis* CH1 (Hernández Bustos, 2003). Dicha cepa es protótrofa y no productora de las siete proteasas mayoritarias, es derivada de *B. subtilis* WB700, (Ye *et al.*, 1996). Pero la cepa CH1 es Cm<sup>R</sup> y la integración que se propone llevar a cabo se selecciona por Cm<sup>R</sup>; motivo por el que debía anularse la resistencia a Cm en la cepa huésped.

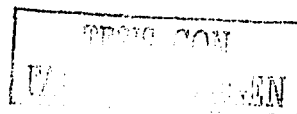
Primero, se corroboró que *B. subtilis* CH1 no fuera resistente a los antibióticos que se usarían para interrumpir a *cat*. El resultado: *B. subtilis* CH1 es Nm<sup>S</sup> y Sp<sup>S</sup>. Después, la cepa se llevó al estado de competencia y se transformó utilizando por separado los plásmidos pCm::Nm y pCm::Sp, dando lugar a las cepas CH1 Nm<sup>R</sup> y CH1 Sp<sup>R</sup> respectivamente. pCm::Nm y pCm::Sp son plásmidos integrativos que llevan a cabo una recombinación homóloga doble en el locus *cat*, evento que conlleva la integración del gen de cambio de resistencia (Steinmetz y Richter, 1994). Posteriormente, las cepas de *B. subtilis* BB80 y CH1 Nm<sup>R</sup> se llevaron a competencia para ser transformadas con el plásmido pSG-*PrrnA*, dando lugar a las cepas *B. subtilis* SR-I (BB80 Cm<sup>R</sup>, *amy*::*PrrnA-lacZ*) y *B. subtilis* SR-II (CH1 Nm<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>, *amy*::*PrrnA-lacZ*) respectivamente.

### Evaluación de la fuerza del promotor *rnaA* P2 en *E. coli* y *B. subtilis*.

La evaluación de la fuerza de este promotor se llevó a cabo utilizando a *lacZ* como gen reportero en el vector pSG-*PrrnA*. Esta construcción se analizó bajo dos fondos genéticos:

- a) Como plásmido multicopia en *E. coli* XL1-blue y *E. coli* JM101.
- b) Integrado en una copia en el genoma de *B. subtilis* SR-I y *B. subtilis* SR-II.

El ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones: cultivos de 50 ml de medio Luria en matraces bafleados de 250 ml incubados a 37°C y 300 rpm. Las actividades se determinaron en fase de crecimiento de cultivo. La evaluación de las actividades de la β-galactosidasa y el genotipo de cada cepa se muestran en la Tabla 4.



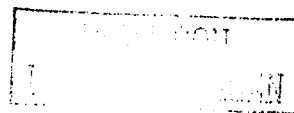
**Tabla 4.** Actividades de  $\beta$ -galactosidasa.

Cepas	UI/mg <sub>PROT</sub>
<i>B. subtilis</i> BB80 ( $\Delta npr$ <i>hisA</i> <i>glyB</i> )	0.0
<i>B. subtilis</i> SR1 (BB80 Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PrrnA-lacZ</i> )	12.4
<i>B. subtilis</i> CH1 (Nm <sup>R</sup> )	0.0
<i>B. subtilis</i> SR2 (CH1 Nm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PrrnA-lacZ</i> )	4.2
<i>B. subtilis</i> JJ1 (BB80 Cm <sup>R</sup> , <i>amy::PaprEltgaca-lacZ</i> )	17,423.0
<i>E. coli</i> JM101	0.0
<i>E. coli</i> JM101 pSG- <i>PrrnA-lacZ</i>	6,275.8
<i>E. coli</i> XL1-Blue	0.0
<i>E. coli</i> XL1-Blue pSG- <i>PrrnA-lacZ</i>	5,621.9

Se encontró que en ambas cepas de *E. coli*, el *rrnA* P2 funciona como un promotor constitutivo. Sin embargo, la comparación de nuestros resultados con datos de la literatura no es sencilla debido a que no existe homogeneidad en las condiciones de las determinaciones de actividad enzimática, aunado a que se utilizan vectores con características diferentes. A partir de la compilación hecha por Martínez (1997), en la que compara niveles de actividad para esta enzima de datos publicados en la literatura, se presenta un intervalo de 56 a 316,200 UI/mg<sub>PROT</sub>, y si se incluyera al *PrrnA* P2 en esta compilación se encontraría en un nivel bajo en *E. coli*. Al ser integrado en una copia en el genoma de *B. subtilis* BB80 y CH1 Nm<sup>R</sup> no se observó actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

Rudner y cols. (1993) reportaron que *PrrnA* P2 posee una fuerza media de expresión. Además, Denner y Spiegelmen (1987) encontraron que a diferencia de *E. coli*, los promotores P2 de *B. subtilis* se encuentran regulados por la velocidad de crecimiento, pero que el promotor P2 es más activo transcripcionalmente que el promotor P1. De tal forma que en este trabajo se esperaba encontrar una actividad de  $\beta$ -galactosidasa con valores en el mismo orden de magnitud que el encontrado con la cepa de *B. subtilis* BB80 *amy::PaprEltgaca* (Jan *et al.*, 2001). Cabe mencionar que en esta construcción *lacZ* se encuentra bajo la regulación del promotor del gen *aprEltgaca*, y también se encuentra en una sola copia en el genoma.

Recientemente Murray y cols. (2003), cambiaron las bases +5 y +7 (C y C por G y G) de la secuencia del promotor silvestre *rrnB* P2, resultando en la pérdida de la regulación del promotor *rrnB* P2, incrementando casi 6 veces la fuerza de este promotor silvestre. En nuestro trabajo se



conservó la secuencia silvestre completa de *PrrnA* P2 de *B. subtilis*, sin mutaciones en las bases +5 y +7, y las actividades encontradas en esta tesis para *PrrnA* P2 son demasiado bajas, sugiriendo que existe una regulación negativa sobre este promotor. Sin embargo, debe considerarse que esta expresión es el resultado de una sola copia en el genoma de *B. subtilis*. Aunque, tampoco como plásmido multicopia se alcanzaron las actividades predichas pero este análisis se llevó a cabo en *E. coli* como fondo genético (Murray *et al.*, 2003).

A partir de estos resultados se planteó la sustitución del promotor *rrnA* por el promotor del gen *aprE* como región reguladora del operón artificial que se desea construir. Este promotor ya ha sido caracterizado por Jan *et al.* (2001), reportando una multiplicidad de niveles de expresión variando tanto la secuencia del promotor, el RBS y el codón de inicio bajo diferentes fondos genéticos encontrando incrementos en la fuerza de expresión de hasta 290 veces con respecto al promotor silvestre en *B. subtilis* BB80. Estos resultados ofrecieron un alto grado de aplicabilidad al proyecto ya que aunque prometían expresiones muy fuertes no comprometían el crecimiento del microorganismo pues su expresión inicia hasta llegar a la fase estacionaria, de esta forma se decidió el cambio de promotor *rrnA* P2 por el promotor *aprE*tgaca.

### Construcción del operón artificial completo

El diseño del operón artificial incluyó los siguientes elementos en tándem: el promotor del gen *aprE* (*PaprE*), sitio de unión a ribosoma (RBS), gen *pdc*, RBS, gen *adhB* y el terminador de la transcripción del gen *cryIIIa* de *Bacillus thuringiensis*, ver figura siguiente.

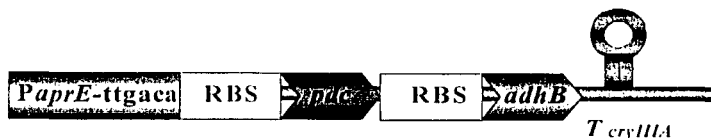
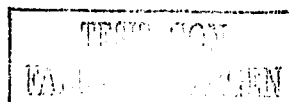
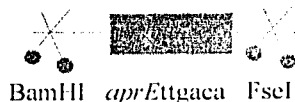


Figura 9. Diseño del operón etanológico que posee señales de regulación que reconoce *B. subtilis*, y los genes *pdc* y *adhB* de *Z. mobilis*.

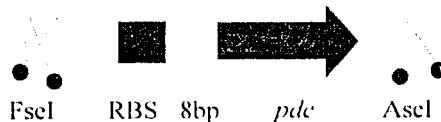


Primero, cada elemento del operón artificial se amplificó por separado enmarcado por sitios de restricción diferentes.

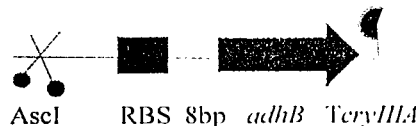
El promotor se amplificó enmarcado por sitios de restricción:



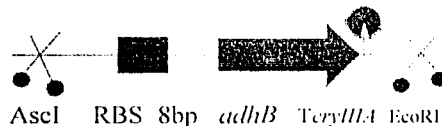
El gen *pdc* se amplificó precedido del RBS:



El gen *adh* se amplificó precedido del RBS y además seguido de la mitad del terminador:



En un segundo PCR se amplifica al terminador completo. Cabe mencionar que la construcción de los *terminadores* debe llevarse a cabo en partes debido a su alta complementariedad entre bases, característica necesaria para la formación de las estructuras en orquilla.



Después por separado cada elemento se clonó en el vector pTOPO-Blunt analizándose cada construcción por patrón de digestión y por secuenciación, obteniéndose los siguientes resultados:

Vector	Patrón de digestión	Secuenciación
lpTOPO-aprEttgaca	Adecuado	Adecuada
lpTOPO-pdc	Adecuado	Adecuada
pTOPO-adh-termI	Adecuado	Adecuada

Se decidió usar a pUC19 como vector para la construcción del operón, debido a que contaba con los sitios únicos de restricción necesarios para la clonación.

El vector **pUC-*aprE*tgtgaca** se construyó a partir de la ligación del fragmento de 462 pb, derivado de la digestión EcoRI-BamHI de IpTOPO-*aprE*tgtgaca; y del fragmento de 2665 pb, derivado de la digestión EcoRI-BamHI de pUC19, ver figura 10.

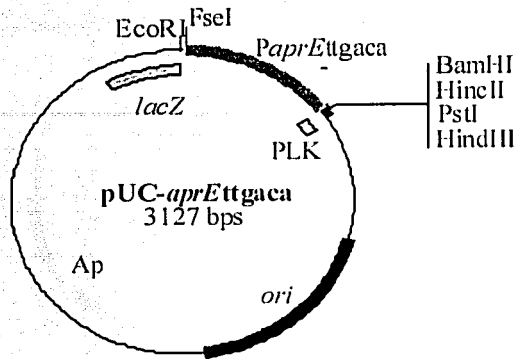


Figura 10. Vector pUC-*aprE*tgtgaca.

*Ori*: origen de replicación, Ap: resistencia a ampicilina, *lacZ*: secuencia  $\alpha$  del gen *lacZ*, *PaprEtgtgaca*: promotor modificado del gen *aprE*, PLK: sitio múltiple de clonación.

El vector **pTOPO-*pdc-adh-term*** se construyó a partir de la ligación del fragmento de 1731 pb, derivado de la digestión EcoRV-AscI de IpTOPO-*pdc*; y del fragmento de 4719 pb, derivado de la digestión AscI-BamHI/polimerizado de pTOPO-*adh-term*, ver figura 11.

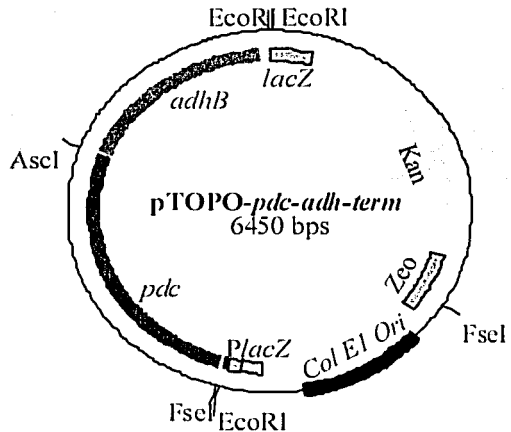
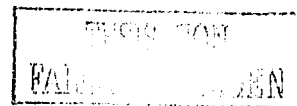


Figura 11. Vector pTOPO-*pdc-adh-term*.

*Col. EI. Ori*: origen de replicación, *PlacZ*: promotor de *lacZ*, *pdc*: gen de la piruvato descarboxilasa, *adhB*: gen de la alcohol deshidrogenasa, *lacZ*: secuencia  $\alpha$  del gen *lacZ*, *Kan*: resistencia a kanamicina, *Zeo*: resistencia a zeocina.



El vector pUC- *aprEttgaca -pdc-adh-term* (pUC-operón1) se construyó a partir de la ligación del fragmento de 2952 pb, derivado de la digestión EcoRI-FseI de pTOPO-*pdc-adh-term*; y del fragmento de 3127 pb, derivado de la digestión EcoRI-FseI de pUC-*aprEttgaca*, ver figura 12.

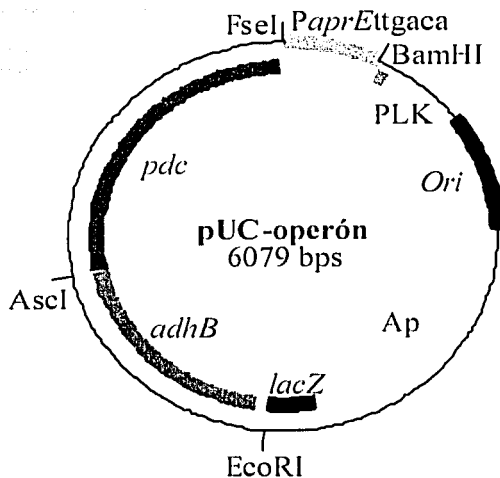
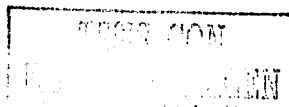


Figura 12. Vector pUC-operón.

Posteriormente, se construyeron otros dos nuevos vectores pUC-operón2 y pUC-operón3, cortando y ligando por separado otros dos nuevos fragmentos de *adhB-term*, estas dos últimas construcciones transformadas en *E. coli* XLI-Blue presentaron actividad de ADHB en cajas indicadoras de aldehído con p-rosanilina (Ingram y Conway, 1987). Cabe mencionar que en las construcciones de pUC-operón, el operón quedó también bajo la regulación de *PlacZ* y que si se deseara se podría utilizar IPTG como inductor.

#### Evaluación de las actividades de PDC y ADHB, y producción de etanol en *E. coli* XLI-Blue.

En la tabla 5 se muestran los valores de las actividades de PDC y ADHB, y la concentración de etanol producida. El ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones: cultivos en 50 ml de medio Luria con 20 g/l de glucosa en matraces de 125 ml, incubados a 30°C y 120 rpm, las actividades se determinaron en fase de crecimiento y la producción de etanol se evaluó a las 24 h del cultivo.



**Tabla 5. Evaluación de actividades de PDC y ADHB, y producción de etanol en *E. coli* XLI-Blue.**

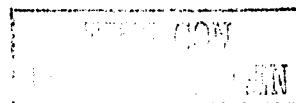
Cepas	PDC UI/mg <sub>PROT</sub>	ADHB UI/mg <sub>PROT</sub>	Etanol (g / L)
<i>E. coli</i> KO11	0.55	1.28	7.22
XLI-Blue	0.0	0.0	0.0
XLI-Blue/pUC-operón1*	n.d.	n.d.	2.05
XLI-Blue/pUC-operón2	0.35	0.44	4.95
XLI-Blue/pUC-operón3	0.40	0.69	5.01

\*Esta cepa posee una ADHB de *Z. mobilis* no funcional.

n.d: Actividades no determinadas.

*E. coli* KO11 es una cepa etanológica derivada de *E. coli* B (cabe mencionar que esta cepa está patentada), la cual ha sido ampliamente caracterizada (Ingram *et al.* 1999) y se utilizó como control positivo. *E. coli* XLI-Blue silvestre fue incluida como control negativo. Las actividades de PDC y ADHB no se determinaron en XLI-Blue pUC-operón1 porque su velocidad de crecimiento disminuyó considerablemente. Sin embargo, produjo etanol al parecer utilizando su propia ADH. Este resultado coincide con lo reportado por otros autores que sólo expresan PDC de *Z. mobilis* en *E. coli*, y obtienen etanol por la actividad de una ADH endógena, además observaron que la cepa resultante era especialmente sensible a ciertos tipos de estrés, viéndose afectado su crecimiento (Brau y Sahn, 1986; Ingram *et al.*, 1987).

Las actividades de ADHB se determinaron con un paquete celular fresco, para PDC se utilizó un paquete celular que se almacenó 20 h a 4°C; parece que este tipo de almacenaje no fue el más adecuado porque la actividad de PDC para KO11 usualmente es de 0.90 UI/mg<sub>PROT</sub>. Las actividad de PDC y ADHB para KO11 fue 38 y 86% mayor que pUC-operón3 respectivamente, en consecuencia a las 24 horas del cultivo KO11 produjo 44% más de etanol que las cepas derivadas de XLI-Blue.





Por otra parte, estos resultados nos indican que las enzimas PDC y ADH tienen actividad, y confirman que la vía etanológica es funcional, desviando el flujo de carbono hacia la producción de etanol *in vivo*, lo que implica que el operón construido es activo en *E. coli* XL1-Blue. Al observar la funcionalidad del operón se decidió entonces construir pSG-*aprE*ttgaca-*pdc-adhB*-term.

### Construcción del plásmido pSG-BFAE a partir de pSG-PLK

pSG-BFAE conserva las regiones del gen *amy*, las resistencias a Cm y Ap, origen de replicación para *E. coli*, pero se eliminan de pSG-PLK, la región PLK y el gen *lacZ* sustituyéndose por un pequeño polilinker, que consta de 4 sitios de restricción: BamHI, FseI, AseI, EcoRI (BFAE), para poder clonar e integrar cualquier secuencia enmarcada por estos sitios; además, este es un plásmido más pequeño (6681 pb) en comparación con pSG-PLK (9712 pb). pSG-BFAE se construyó haciendo un PCR que amplificara rodeando a pSG-PLK iniciando desde el término de *lacZ* hasta el inicio del PLK (ver figura 13 A). Después el fragmento amplificado se cortó con AseI y se ligó sobre sí mismo dando lugar a pSG-BFAE (ver figura 13 B).

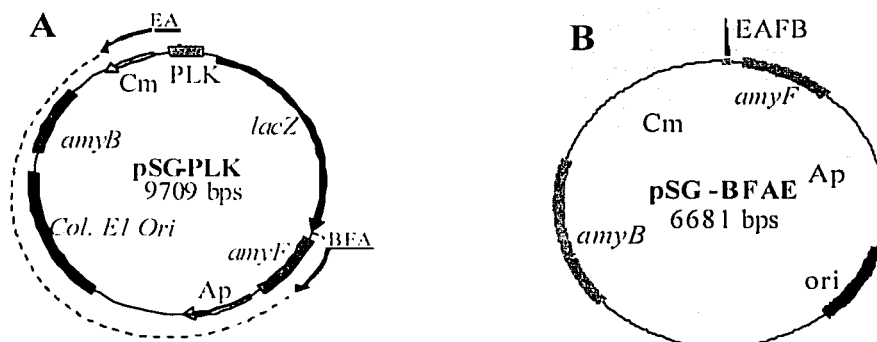
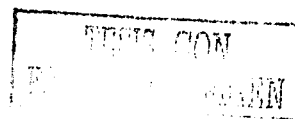


Figura 13. Construcción del vector pSG-BFAE.

A. La línea punteada muestra al fragmento amplificado por PCR, las flechas que se unen a la línea punteada simbolizan el lugar donde alinean los oligonucleótidos, las letras subrayadas muestran los sitios de restricción incluidos en éstos. B. Vector pSG-BFAE, después de la ligación sobre sí mismo.



### Construcción del plásmido pSG-*aprEttgaca-pdc-adhB-term*.

El vector pSG-*aprEttgaca-pdc-adhB-term* (pSG-operón) se construyó a partir de la ligación del fragmento de 3381 pb, derivado de la digestión EcoRI-BamHI de pUC-operon3; y del fragmento de 6631 pb, derivado de la digestión EcoRI-BamHI de pSG-BFAE. pSG-operón posee las siguientes características: a) tiene un origen de replicación para *E. coli*, b) es un plásmido suicida para *B. subtilis* pues no presenta origen de replicación para esta bacteria, lo que favorece su integración en el genoma de

*B. subtilis*; c) cuenta con dos regiones del gen *amy* que se requieren para llevar a cabo una recombinación homóloga doble, d) cuenta con resistencias a ampicilina y cloramfenicol, y e) tiene el operón artificial construido: *PaprEttgaca-pdc-adhB-TcryIII*A, ver figura 14.

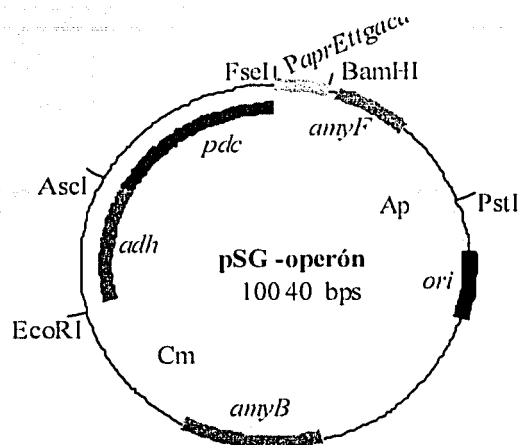


Figura 14. Vector pSG-operón.

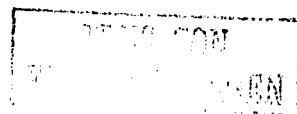
### Evaluación de la funcionalidad del operón en *E. coli*/pUC-operón y *E. coli*/pSG-operón

Se evaluó la actividad de PDC, la producción de etanol y el rendimiento etanol/glucosa ( $Y_{EtOH/Glc}$ ) de las cepas de *E. coli*/pUC-operón y *E. coli*/pSG-operón, a partir de cultivos con 50 ml de medio Luria suplementado con 20 g/l de glucosa en matraces de 125 ml, incubados a 30°C y 120 rpm. Las actividades se determinaron en fase de crecimiento y la producción de etanol se evaluó a las 24 horas de iniciado el cultivo (tabla 6).

Tabla 6. Evaluación de actividad de PDC y producción de etanol.

Cepas	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	PDC (UI/mg prot)	Eta-nol (g/l)	Y <sub>EtOH/Glc</sub>
KO11	0.64	0.66	6.40	0.33
XL1-blue	0.35	0.0	0.0	0.0
XL1-blue/pUC-operón	0.39	1.11	5.55	0.38
XL1-blue/pSG-operón	0.32	1.76	6.95	0.42

$\mu$  velocidad específica de crecimiento. *E. coli* KO11 se utilizó como control positivo, *E. coli* XL1-Blue silvestre se incluyó como control negativo.



La electroforesis en gel poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio muestra que XLI-blue silvestre no presenta la banda correspondiente a PDC (62.3kD), que en los otros carriles se observa de forma clara y definida, ver figura 15.

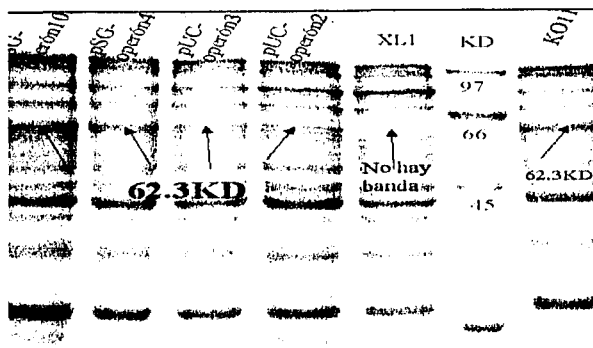


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Carriles 1-4: extractos proteicos de XLI-blue/pSG-operón (clonas 10 y 4) y XLI-blue/pUC-operón (clonas 3 y 2). Carril 5: *E. coli* silvestre (control negativo), Carril 6: Marcador de Peso. Carril 7: *E. coli* KO11 (control positivo).

Cabe mencionar que en la tabla 6, la actividad específica para PDC que se reporta es 3 veces mayor que el promedio reportado en la tabla 5 para pUC-operón 2 y 3; pero como ya se mencionó, las actividades reportadas en la tabla 5 se evaluaron a partir de paquetes celulares previamente conservados en congelación, aunado a que las actividades PDC se determinaron llevando a cabo un tratamiento térmico indicado en el ensayo, tratamiento que no se llevó a cabo en las actividades de PDC reportadas en la tabla 6, en su lugar sólo se substrajo la actividad inespecífica encontrada en la cepa silvestre, a la actividad encontrada en la cepa recombinante. XLI-Blue/pUC-operón se incluyó como comparación de dos diferentes vectores que poseen al mismo operón. En este sentido, puede observarse que, aunque pUC-operón es un plásmido de mayor número de copias que pSG-operón, XLI-blue pSG-operón posee mayor actividad de PDC que XLI-blue pUC-operón; de hecho, el gel de análisis de proteínas también coincide con este resultado observándose las bandas pertenecientes a pUC-operón más tenues que las correspondientes a pSG-operón, ver figura 15.

Las cepas modificadas crecen de manera similar a la cepa silvestre, lo que indica que la presencia del plásmido no ocasiona un problema de carga metabólica. El operón construido es funcional ya

que una cepa que originalmente no es etanológica llega a producir etanol al contener el operón construido en este trabajo, y aunque XL1-Blue no es una cepa robusta de producción de proteínas recombinantes, la cantidad de etanol producida es comparable con la cantidad obtenida en KO11. De hecho, el rendimiento etanol/glucosa se acerca al teórico en XL1-blue pSG-operón ( $Y_{EtOH/Glc}$  teórico = 0.5).

### **Obtención de la cepa etanológica de *B. subtilis*.**

El operón artificial construido se integró en una copia en el genoma de *B. subtilis*, analizado en dos diferentes fondos genéticos: cepa con interrupciones-supresiones en las 7 proteasas mayoritarias (*B. subtilis* CH1 Nm<sup>R</sup>), y cepa con una mutación en el regulador negativo Hpr del promotor de la subtilisina (*B. subtilis* BB82).

Se seleccionaron tres colonias de cada fondo genético: amilasa negativo y resistente a cloramfenicol, pero ninguna de las seis colonias produjo etanol.

Como ya se mencionó la integración del operón se lleva a cabo por medio de una recombinación homóloga doble en el locus del gen *amy*. A este respecto cabe señalar, que el evento de la recombinación existe en *B. subtilis* cuando éste se encuentra en estado de competencia, pero también este microorganismo en estado de competencia puede llevar a cabo otros eventos, como tomar fragmentos de DNA extraño e incorporarlos a su genoma de forma azarosa, que posiblemente le conferirán un ventaja para sobrevivir (por ejemplo, puede pasar de auxotrofías a prototrofías).

Otro factor que afecta directamente a la recombinación son las mutaciones hacia abajo del plásmido que se pretende integrar, por tanto la heterogeneidad en la población del plásmido, provocada por la inestabilidad del mismo, serán evidentemente deletéreas en el evento de recombinación. Por ende, una recombinación exitosa depende de variables conocidas y desconocidas, por lo que será necesario hacer un monitoreo amplio de las cepas transformadas en un evento de recombinación.

La expresión de proteínas heterólogas depende de eventos concretos y que están de alguna manera concatenados en varios niveles: como el replicativo, transcripcional, traduccional, entre otros. Ahora bien, si en el momento de obtener una cepa recombinante en la que los principales indicadores demuestran ser correctos, pero no se obtiene la proteína recombinante de interés o el

producto deseado de ésta, el investigador deberá hacer una revisión o análisis concienzudo de los elementos de crítica con los que cuenta; una estrategia también puede ser la eliminación o disminución de variables, esto denotaría la variable afectada.

En cada nivel se puede obtener información o elementos de discernimiento para encontrar el problema en la expresión de proteínas heterólogas:

A nivel replicativo: integración correcta denotada por un PCR a partir de cromosomal, así como la secuenciación del PCR.

A nivel transcripcional: análisis de la posible formación de estructuras secundarias en el mRNA, El RT-PCR y el PCR en tiempo real podrían proporcionar información importante a cerca de los mensajeros.

A nivel traduccional: análisis de uso preferencial de codones, análisis de la expresión de proteínas en un gel de poliacrilamida, y la evaluación de las actividades enzimáticas.

A nivel bioquímico: percepción de la célula como un ente que se reordena tratando de conservar una homeostasis para poder sobrevivir. Este nivel presume de un análisis particular del microorganismo que se manipula.

#### **Obtención de cepas derivadas de *B. subtilis* con enzimas PDC y ADH funcionales.**

Nuevamente se llevó a cabo la integración del operón artificial en las mismas cepas antes analizadas: *B. subtilis* CH1 Nm<sup>R</sup> y *B. subtilis* BB82. Las colonias transformadas se seleccionaron por la resistencia a cloramfenicol, se midió la actividad enzimática de PDC en un mayor número de colonias encontrando lo siguiente:

Se analizaron 23 colonias derivadas de *B. subtilis* CH1 Cm<sup>R</sup> sin importar que fueran amy (+), aunque la mayoría lo fueron. Tres colonias tuvieron actividad de PDC, dos de ellas fueron amy (+), y una amy (-) ésta última se denominó *B. subtilis* SR1, ver tabla 7.

También, se analizaron 54 colonias derivadas de *B. subtilis* BB82, de las cuales 52 colonias fueron amy (-), encontrándose que sólo una tenía actividad de PDC, con un fenotipo amilasa negativa que se le denominó *B. subtilis* SR2, ver tabla 7.

**Tabla 7. Evaluación de las actividades enzimáticas de PDC y ADH en cepas derivadas de *B. subtilis***

Cepas	PDC (UI/mg <sub>PROT</sub> )	ADH (UI/mg <sub>PROT</sub> )	Amilasa:
CH1 Nm <sup>R</sup> 7	0.230	0.328	(+)
CH1 Nm <sup>R</sup> 19	0.448	0.000	(+)
<i>B. subtilis</i> SR1	0.281	0.344	(-)
<i>B. subtilis</i> CH1 Nm <sup>R</sup>	0.000	0.000	(+)
<i>B. subtilis</i> SR2	0.672	0.359	(-)
<i>B. subtilis</i> BB82	0.000	0.000	(+)
<i>E. coli</i> KO11G	0.635	0.500	

Todas las actividades se determinaron a partir de cultivos en tubos de ensaye de 16X150 con 6 ml de medio Schaeffer Cm<sup>5</sup>, a 37°C y 300 rpm. Las células se cosecharon a las 20 h de iniciados los cultivos. *E. coli* KO11 se incluyó como control positivo y, las cepas silvestres de *B. subtilis* CH1 Nm<sup>R</sup> y BB82 como controles negativos.

En 2001, Jan y cols., reportaron que la cepa JJ2 (BB82 *amyE::PaprEttgaca/lacZ cat*) tenía dos veces la actividad de β-galactosidasa de la cepa JJ1 (BB80 *amyE::PaprEttgaca/lacZ cat*), resultado que coincide con lo encontrado en este trabajo: la cepa SR2 (BB82, Cm<sup>R</sup>, *amy::PaprEttgaca/pdc/adh/TcryIII*) tiene dos veces la actividad de PDC de la cepa SR1 (CH1 Nm<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>, *amy::PaprEttgaca/pdc/adh/TcryIII*), aunque sólo se observó que la actividad de ADH de la cepa SR2 es ligeramente mayor que la de SR1, ver tabla 7.

### **Producción de Etanol *in vitro***

Este ensayo se diseñó para saber si *B. subtilis* posee los cofactores, y además en las concentraciones necesarias, para que PDC y ADH de *Z. mobilis* puedan ser enzimas funcionales *in vivo*. El ensayo se planteó para producir el doble de la concentración mínima cuantificable por el cromatógrafo de gases (0.2 g/l), y por esto se observan cantidades pequeñas de etanol producido en las tablas 8 y 9.

Primero se procedió a la estandarización de la técnica, utilizando a *E. coli* KO11 como control positivo e incluyendo todas las reacciones (A-N), ver apéndice C.

**Tabla 8. Estandarización del ensayo para producir etanol *in vitro***

Reactivos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	L.L.	M	N
Glucosa	-----	X	-----	-----	X	-----	X	-----	X	-----	X	-----	X	-----	X
Piruvat	X	-----	X	X	-----	X	-----	X	-----	X	-----	X	-----	X	-----
NADH	-----	-----	-----	-----	-----	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
TPP	-----	-----	-----	X	X	-----	-----	X	X	X	X	X	X	X	X
ADH	-----	-----	X	-----	-----	-----	-----	-----	X	X	X	X	X	-----	-----
Extracto celular	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-----	-----	-----	-----
Et-OH (g/l)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.44	0.24	0.40	0.23	0.52	0.24	0.24	0.23	0.24	0.23

Tras el análisis de los resultados de la tabla 8, se vislumbró la posibilidad de que el NADH tuviera etanol, probablemente debido a su proceso de purificación que incluyera etapas con solventes como etanol. Para comprobar esta hipótesis, se analizó una muestra con el NADH disuelto en el amortiguador de enzima en la concentración final del ensayo, evidenciándose que el NADH tenía 0.21 g/l de etanol, cabe señalar que también podría tratarse de algún otro compuesto cuya señal coincida con el tiempo de retención correspondiente al etanol en el cromatógrafo de gases. Este resultado, nos refiere una concentración de etanol alrededor de 0.23 g/l como ruido del ensayo. En este ensayo *E. coli* KO11 no pudo producir etanol a partir de glucosa, al parecer la actividad de glucocinasa es baja o nula y se requieren las membranas para que pueda ser fosforilada y pueda entrar a glicólisis. *E. coli* KO11 no pudo producir etanol *in vitro*, si no hay NADH. En contraste, KO11 puede producir etanol en presencia de NADH, aunque no se adicione TPP, sugiriendo que las cantidades de TPP que la PDC necesita se encuentran en la célula huésped. La adición de ADH exógena benefició el flujo hacia la producción de etanol, ver tabla 8.

Después, se incluyó en el ensayo para producción de etanol *in vitro* a la cepa *B. subtilis* SR2 (cepa que presenta actividades enzimáticas de PDC y ADH), como control positivo a *E. coli* KO11 y como control negativo a *B. subtilis* BB82, ver apéndice C. La tabla 9 muestra los resultados del ensayo.

**Tabla 9. Evaluación de la producción de etanol *in vitro* de *B. subtilis* SR2.**

Reactivos	A	C	D	F	H	J
Glucosa	----	----	----	----	----	----
Piruvato	X	X	X	X	X	X
NADH	----	----	----	X	X	X
TPP	----	----	X	----	X	X
ADH	----	X	----	----	----	X
Extracto celular	X	X	X	X	X	X
<i>E. coli</i> KO11 Et-OH (g/l)	0	0	0	0.39	0.44	0.49
<i>B. subtilis</i> SR2 Et-OH (g/l)	0	0	0	0.29	0.27	0.43
<i>B. subtilis</i> BB82 Et-OH (g/l)	0	0	0	0.25	0.26	0.23

En la reacción **J** de *B. subtilis* SR2, se observa que si se agrega ADH exógena es suficiente para que puedan canalizarse esqueletos de carbono (piruvato) hacia la producción de etanol, invariablemente siendo funcional PDC; si no hay PDC no es posible obtener etanol, aún agregando ADH exógena, esta producción de etanol como es el caso de *B. subtilis* BB82, ver tabla 9.

Aunque en la reacción **F** de *B. subtilis* SR2 la cantidad de etanol obtenida es casi nula, aunado al resultado de la reacción **J**; la hipótesis, de que la expresión de las enzimas era todavía baja en la etapa de crecimiento del cultivo de cosecha, se ve favorecida.

El ensayo denotó que TPP, cofactor necesario para la funcionalidad de PDC, está presente en la concentración necesaria para esta enzima, por lo que PDC puede ser funcional bajo el abrigo de *B. subtilis*. Mironov y su grupo han estudiado la síntesis y regulación de TPP en *B. subtilis*, y al parecer es un cofactor que se sintetiza en cantidades adecuadas y participa en numerosas vías metabólicas (Mironov *et al.*, 2002).

Se demostró que *B. subtilis* SR2 puede producir etanol *in vitro*, pero que al igual que *E. coli* KO11 requiere la regeneración de NADH. NADH es un cofactor ubicuo, existen reportes que denotan su papel en el equilibrio redox de *B. subtilis* (Cruz-Ramos *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997). también se conoce que tiene un recambio elevado y que muchas enzimas compiten por su utilización. de manera que no es de extrañarse que sea fácilmente agotable si no se regenera rápidamente. De esta forma el excedente necesario para que *B. subtilis* SR2 o *E. coli* KO11 puedan producir etanol *in vitro* no implica que haya un déficit de NADH *in vivo*, y que en consecuencia ADH no cuente con el NADH necesario para ser funcional.



**Evaluación de las actividades enzimáticas PDC y ADH de las cepas *B. subtilis* SR1 y *B. subtilis* SR2 en presencia de glucosa.**

**Tabla 10. Efecto de la glucosa sobre las actividades de PDC y ADH en *B. subtilis*, cepas SR1 y SR2**

Cepas	PDC (UI/mg <sub>PROT</sub> )	ADH (UI/mg <sub>PROT</sub> )	
<i>B. subtilis</i> SR1	0.13	0.13	sin glucosa
<i>B. subtilis</i> SR1	0.19	0.17	con glucosa
<i>B. subtilis</i> CH1 Nm <sup>R</sup>	0.0/0.0	0.0/0.0	sin/con glucosa
<i>B. subtilis</i> SR2	0.41	0.31	sin glucosa
<i>B. subtilis</i> SR2	0.30	0.25	con glucosa
<i>B. subtilis</i> BB82	0.0/0.0	0.0/0.0	sin/con glucosa

En la tabla 10, puede observarse que la presencia de glucosa hay actividad de ambas enzimas. Sin embargo, puede disminuir la expresión de las enzimas PDC y ADH (*B. subtilis* SR2), pero la cepa *B. subtilis* SR1 parece no verse afectada por la presencia de glucosa, aunque estos resultados todavía deben confirmarse en fermentadores.

**Evaluación de la producción de etanol de las cepas *B. subtilis* SR1 y *B. subtilis* SR2.**

Se evaluó la capacidad de producción de etanol de las cepas *B. subtilis* SR1 y *B. subtilis* SR2, incluyendo a *B. subtilis* cepas CH1 NmR y BB82 como controles negativos, a partir de cultivos en tubos de ensaye de 16X150 con 6 ml de medio Schaeffer Cm<sup>5</sup> suplementados con 20 g/l de glucosa, incubados a 37°C y 300 rpm, durante 48 h; con una nueva adición de glucosa (20 g/l) a las 24 h de iniciado el cultivo, se determinó etanol a las 48 hrs. En concordancia con los resultados de actividad, *B. subtilis* SR1 produjo 0.8 g/l de etanol y *B. subtilis* SR2 produjo 1.4 g/l, las cepas *B. subtilis* CH1 NmR y BB82 no produjeron etanol aún en presencia de glucosa. Cabe mencionar que bajo estas condiciones de crecimiento, ambas cepas produjeron una cantidad considerable de acetoina, *B. subtilis* SR1 produjo 6.5 g/l y *B. subtilis* SR2 produjo 10.2 g/l,

anteriormente se ha reportado, que el acetato y la acetoína se producen en condiciones anaerobias bajo respiración de nitratos, cuando el nitrato se encuentra en altas concentraciones (Nakano *et al.*, 1997; Espinosa-de-los-Monteros *et al.*, 2001); y las condiciones del ensayo fueron diferentes. Ahora bien, este resultado indica que parte del esqueleto de carbono se dirige hacia la formación de acetoína, esto sugiere que si se interrumpiera esta vía que compite por el piruvato podría redirigirse el flujo de carbono hacia la formación de etanol, ver figura 3.

Se confirmó la capacidad productora de etanol de la cepa *B. subtilis* **SR2**, incluyendo a *B. subtilis* BB82 como control negativo, a partir de cultivos con 50 ml de medio Schaeffer en matraces balleados de 250 ml, incubados a 37°C y 300 rpm durante 72 h. con adición de glucosa (20 g/l) a las 24 h de iniciado el cultivo, obteniéndose 1.0 g/l a las 48 h, muestras a tiempos mayores (72 h) proporcionaron menor cantidad de etanol (0.8 g/l) sugiriendo que parte del etanol se evapora en estas condiciones. La cepa *B. subtilis* BB82 no produjo etanol. Estos resultados indican que es necesario llevar a cabo estudios de parámetros de cultivo a escala de fermentador para evaluar la capacidad que SR1 y SR2 tienen para convertir glucosa en etanol. Cabe mencionar que nuevamente se detectó la producción de acetoína: *B. subtilis* **SR2** produjo 1.6 y 1.8 g/l a las 48 y 72 h, mientras que *B. subtilis* BB82 produjo 5.6 y 3.8 g/l a las 48 h y 72 h. Si se observa la producción de acetoína, en *B. subtilis* BB82 respecto a la de *B. subtilis* **SR2** a las 48 h, se evidencia la dirección mayoritaria del flujo de carbono en la cepa silvestre BB82, siendo que en la cepa modificada **SR2** existe una competencia por el piruvato entre dos enzimas, PDC y acetolactato sintasa (ALS), de forma tal que se produce etanol y acetoína, este hecho hace evidente que la posible interrupción de acetolactato sintasa podría aumentar la producción de etanol.

Aunque 1.0 g/l de etanol podría considerarse una concentración baja, comparada con la producción de etanol que alcanza cepas derivadas de *E. coli* con plásmidos multicopia o con mutantes etanologénicas de *E. coli* que tienen integraciones en cromosoma (Ingram *et al.*, 1991), debe considerarse que se encuentra en una sola copia en el genoma de *B. subtilis*, y que aún es perfectible.

Otros grupos han intentado capacitar para producir etanol a bacterias gram positivas, usando los genes de *pdc* y *adh* de *Z. mobilis* pero no han tenido resultados exitosos, atribuyéndolos a las posibles diferencias entre bacterias gram positivas y negativas, en eventos como transcripción,

traducción o degradación de proteínas (Barbosa y Ingram, 1994; Gold *et al.*, 1996; Nichols *et al.*, 2003). Otros autores plantean la posibilidad de aumentar la diversidad de bacterias (como las gram positivas) que puedan ser modificadas para producir altos niveles de etanol, utilizando genes de *pdh* de bacterias Gram positivas como *Sarcina ventriculi*, (Talarico *et al.*, 2001). Nuestros resultados demuestran que bacterias gram positivas como *B. subtilis* pueden producir etanol vía la expresión de las enzimas PDC y ADH de *Z. mobilis* (una gram negativa). Es importante señalar que este trabajo demuestra, por primera vez, que puede obtenerse una cepa productora de etanol derivada de *B. subtilis*, además sienta las bases para que se lleven a cabo estudios conducentes a mejorar las cepas etanológicas derivadas de *B. subtilis* y realizar estudios de fermentación con las mismas.

## CONCLUSIONES

Por primera vez, mediante técnicas de DNA recombinante, se obtuvo producción de etanol en cepas derivadas de *B. subtilis*; hecho especialmente meritorio es que cuentan con una mayor estabilidad genética, pues el operón etanológico se integró en una copia en el genoma de *B. subtilis*.

Las enzimas PDC y ADHB de *Z. mobilis* pueden ser expresadas como enzimas funcionales *in vivo* por las cepas *B. subtilis* SR1 (CH1 Nm<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>, *amy::PaprEttgaca/pdc/adh/TcryIII*) y *B. subtilis* SR2 (BB82, Cm<sup>R</sup>, *amy::PaprEttgaca/pdc/adh/TcryIII*); lo que indica que las secuencias reguladoras a nivel transcripcional y traduccional (secuencias consenso o silvestres), utilizadas en la construcción del operón artificial construido fueron reconocidas y utilizadas correctamente por dos fondos genéticos diferentes de *B. subtilis*. Además, se obtuvieron actividades específicas de las enzimas PDC y ADHB comparables con cepas etanológicas derivadas de *E. coli* que poseen plásmidos multicopia.

La construcción del operón etanológico en tandem, manteniendo los espacios conservados entre todos sus elementos, permite la integración de una vía metabólica funcional completa.

El promotor *rrnA* P2 funciona como un promotor constitutivo pero de fuerza baja en *E. coli*, mientras que integrado en una copia en el genoma de *B. subtilis* no se observó actividad, lo que sugiere que el *PrrnA* P2 pudiera encontrarse bajo una regulación negativa.

La cepa *B. subtilis* SR2 posee una mutación en el regulador negativo Hpr, éste ocasiona que el nivel de expresión de todas las proteasas se incrementa, aunado a que la cepa SR2 posee casi todas sus proteasas extracelulares funcionales. La cepa *B. subtilis* SR1 tiene interrumpidas siete proteasas mayoritarias, pero posee un regulador negativo Hpr funcional, lo que ocasiona disminución de la proteólisis. De manera tal, que el fondo genético de *B. subtilis* SR2 favoreció la expresión de *pdc* y *adh*, pero parece que no su proteólisis; en comparación con el fondo genético de *B. subtilis* SR1, en el que la expresión se vio levemente disminuída, al parecer por el regulador negativo Hpr funcional.

## PERSPECTIVAS

Caracterizar el crecimiento, actividad enzimática y formación de productos de las cepas etanológicas *B. subtilis* SR1 y *B. subtilis* SR2, bajo condiciones de fermentación.

Conducir estudios de optimización de parámetros, medios de cultivo y condiciones de fermentación (T, pH, alimentación de azúcares) para incrementar el nivel de producción de etanol y la conversión de glucosa en etanol en las cepas *B. subtilis* SR1 y *B. subtilis* SR2.

Desregular mediante estrategias de cultivo (p. ej. uso de medio mineral) o moleculares el promotor de *aprE* para tener una expresión constitutiva de PDC y ADH.

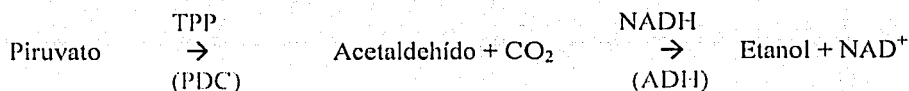
Con el propósito de incrementar la actividad enzimática de PDC y ADH, generar mutantes para tener varias copias de *PaprEttgaca-pdc-adh-term* en el cromosoma.

Considerar el diseño de otro operón etanológico utilizando un promotor constitutivo y fuerte, o bien, una combinación de promotores uno en fase de crecimiento, otro en fase estacionaria y otro en esporulación, inclusive podrían utilizarse en tandem. La utilización de promotores ribosomales sería una buena opción, pero debe tomarse en cuenta que están regulados por velocidad de crecimiento y condiciones de astringencia; además, pueden en un momento dado proporcionar problemas de carga metabólica si es muy fuerte su expresión, aunque ya se ha reportado que puede modificarse su regulación.

Con el fin de eliminar la síntesis de compuestos que compiten con la disponibilidad de esqueletos de carbono para formar el etanol, considerar el diseño de un operón que ahora se integre en el locus del gen *alsS* que codifica para la acetolactato sintasa, y que inclusive quede bajo la regulación del promotor de este gen.

## APÉNDICE A.

## Ensayo Enzimático de PDC

*Reacción**Preparación de reactivos*

## 1. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
6.90g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	137.99	0.05M

Disolver 6.9g en agua destilada, aforando a 1 L. Antes de aforar ajustar el pH a 6.5 con NaOH 50%

## 2. Amortiguador de permeabilización

Adicionar a 100 ml de la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5, los siguientes compuestos para hacer 100 ml del amortiguador de permeabilización.

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
0.02033g	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	203.31	1mM
0.04608g	Tiaminpirofosfato (TPP)	460.8	1mM

## 3. Cloroformo

Tomar cloroformo fresco en un tubo de 18X150. Usar una pipeta Pasteur con bulbo para adicionar gotas de cloroformo.

## 4. Amortiguador de enzima

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
9.7620g	MES	195.24	50 mM
1.0165g	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	203.3	5 mM

Disolver MES y MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O en agua destilada aforando a 1 L y ajustar el pH a 6.5 con KOH 45%. El amortiguador de enzima puede guardarse en refrigeración y antes del ensayo sacar a temperatura ambiente el volumen que se vaya a necesitar.

Los siguientes reactivos se deben preparar justo antes del ensayo.

PIRUVATO: 100 mM (PM = 88)

Disolver 0.011g en 1 ml de amortiguador de enzima.

NADH: 3 mM (PM = 709.4)

Disolver 0.0021g en 1 ml de amortiguador de enzima.

TPP (tiaminpirofosfato o cocarboxilasa): 2 mM (PM = 460.8)

Disolver 0.0009 g en 1 ml de amortiguador de enzima.

ADH (alcohol deshidrogenasa): 200 U / 0.1 ml amortiguador

Disolver 0.0007 g en 0.1 ml de amortiguador de enzima.

### Procedimiento de permeabilización

Verificar la  $DO_{600}$  de un cultivo fresco, usando el mismo medio que se usó para el cultivo como blanco. Cosechar 1 ml de una suspensión celular de una  $DO_{600}$  de 1. Centrifugar esta suspensión durante 2 min a 12000 rpm.

Lavar dos veces el paquete celular con 1 ml de amortiguador de permeabilización.

Resuspender el paquete lavado en 0.1 ml de amortiguador de permeabilización.

Adicionar 2 gotas de cloroformo y mezclar vigorosamente por 15 s en un vortex. Mezclar en la velocidad más alta por 15 s (3 ciclos de 4s de mezclado y 1s de descanso).

Después adicionar 0.9 ml de amortiguador de permeabilización y mezclar suavemente por inversión 10 veces.

### Mezcla de ensayo

Medir y depositar los siguientes reactivos en una celda de 1 cm de paso.

Compuesto	Conc. final	Volumen ( $\mu$ L)
NADH: 3 mM	0.15 mM	50
TPP: 2 mM	0.1 mM	50
PIRUVATO: 100 mM	5.0 mM	50
ADH: 200 U / 0.1 ml	10 U	5
Amortiguador		745
Extracto celular		100

Usando un parafilm mezclar por inversión. Después de mezclar, determinar la absorbancia a 340 nm por 3 min en un espectrofotómetro.

### CÁLCULOS.

#### Actividad volumétrica

$$U_{enzima/ml} = [\Delta A_{340}/\text{min}] \times 1 / [6.22 \times 0.1]$$

1 = volumen de reacción

6.22 = coeficiente de extinción milimolar del NADH a 340 nm.

0.1 = volumen en mililitros del extracto celular usado.

#### Actividad específica

$$IU/mg_{PROT} = (\text{Actividad volumétrica}) / (mg_{PROT}/ml)$$

$$mg_{PROT}/ml = DO_{600} \times 0.23$$

### Eliminación de actividades inespecíficas

A la actividad específica resultante de las cepas problema restar o eliminar la actividad específica de la cepa silvestre.

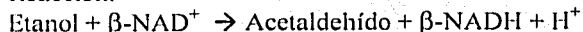
### Referencias.

(Conway *et al.*, 1987a; Hoppner *et al.*, 1983; Neale *et al.*, 1986).

## APÉNDICE B.

## Ensayo Enzimático de ADH

Reacción:



Permeabilización de células:

Reactivos:

A. Solución Stock del Amortiguador (MES)-KOH pH=6.5

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
3.901g	(MES)-KOH	195.24	20 mM
0.407g	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	203.31	2 mM
2.992g	NaCl	58.44	50 mM

Se disuelven las sales en poco menos de un litro de agua destilada, ajustando el pH a 6.5 con KOH al 45% y se afora a un litro con agua destilada.

B. Amortiguador de Cosecha.

El amortiguador de cosecha se prepara de forma fresca, para preparar 100 ml del mismo, se adicionan los siguientes compuestos a 100 ml de la solución stock del amortiguador (MES)-KOH pH 6.5.

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad	
0.1762g	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	176.2	10mM	L-ácido ascórbico
0.0196g	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	392.1	0.5mM	

C. Amortiguador de permeabilización

A 10 ml de amortiguador de cosecha se le adiciona 10 mg de lisozima.

D. Cloroformo

Se toma de forma fresca un poco de cloroformo en un tubo de ensayo de 18X150. Se usa una pipeta Pasteur y un bulbo de plástico para adicionar el cloroformo.

### Procedimiento de Permeabilización:

De un cultivo fresco (12, 16 o 24 h, según el caso) se mide la DO<sub>600</sub>. Usando el mismo medio que se utilizó para el cultivo (enfriado previamente en hielo), se ajusta la DO<sub>600</sub> a 1 y se cosecha 1 ml de tal suspensión celular, se centrifuga 2 min. a 12000 rpm. La DO se midió en un espectrofotómetro usando celdas de plástico de 1 ml y usando el medio apropiado como blanco.

Se lava dos veces los paquetes celulares con 1 ml de amortiguador de cosecha.

Se resuspende el paquete lavado en 200 µL de amortiguador de permeabilización.

Se adicionan 2 gotas de cloroformo y se mezcla vigorosamente en un vortex por 15 s (mezclar con velocidad 5, 3 ciclos de 4 s de mezclado y 1 s de descanso).

Se incuba en hielo durante 10 min, después se adiciona 0.8 ml de amortiguador de cosecha frío y se mide la actividad inmediatamente sin almacenar las muestras.



**Reactivos:**

1. Amortiguador de enzima: 30 mM tris/HCl

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
3.63g	Trizma base	121.15	30 mM

Se disuelve Trizma base en agua destilada, se ajusta el pH a 8.5 con HCl y se afora a 1L

2. Etanol en tris 1M (etanol PM=46.0, densidad=0.8)

0.288 ml de etanol absoluto (100%) por 5 ml de Amortiguador de enzima.

3. NAD<sup>+</sup> 20 mM

0.0133g / 1 ml de tris Amortiguador

**Notas:**

El Amortiguador de enzima puede conservarse en refrigeración y llevarse a temperatura ambiente antes del ensayo. La solución B debe prepararse fresca el mismo día del ensayo porque los componentes de esta solución pueden oxidarse fácilmente. El NAD<sup>+</sup> es inestable y debe mantenerse en hielo y usarse después de prepararse.

**Procedimiento:**

Mezcla del ensayo: Pipetear los siguientes reactivos en una celda de 1cm de trayecto de luz.

Solución	Concentración final en la mezcla del ensayo	Volumen $\mu$ L
NAD <sup>+</sup> 20 mM	1 mM	50
Etanol 1 M		850
Extracto celular		100

Se usa parafilm para mezclar por inversión. Después de mezclar, monitorear la absorbancia a 340 nm por 3 min en el espectrofotómetro Beckman. Usar el método cinético para monitorear a 340 y obtener la diferencia de absorbancias a 340 por min calculando la velocidad linear de la curva.

**Cálculos:**

Actividad volumétrica:

$$U_{ENZIMA/ml} = [(\Delta A_{340}/\text{min}) \times 1] / [6.22 \times 0.1]$$

1 = volumen de reacción

6.22 = coeficiente de extinción milimolar de NADH a 340 nm

0.1 = volumen en ml de extracto celular usado.

Actividad específica:

$$U/mg_{PROT} = DO_{600} \times 0.23$$

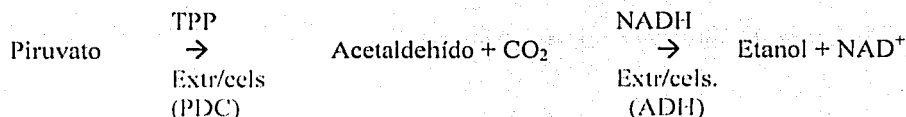
**Referencias.**

(Conway *et al.*, 1987b; Mackenzie *et al.*, 1989; Neale *et al.*, 1986)

## APÉNDICE C.

Ensayo para Producir Etanol *in vitro*

## Reacción



## Preparación de reactivos

## 1. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
6.90g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	137.99	0.05M

Disolver 6.9g en agua destilada, aforando a 1 L. Antes de aforar ajustar el pH a 6.5 con NaOH 50%

## 2. Amortiguador de permeabilización

Añadir a 100 ml de la solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5, los siguientes compuestos para hacer 100 ml del amortiguador de permeabilización.

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
0.0203g	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	203.3	1mM
0.0461g	Tiaminpirofosfato (TPP)	460.8	1mM

## 3. Amortiguador de enzima

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
9.7620g	MES	195.24	50 mM
1.0165g	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	203.3	5 mM

Disolver MES y MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O en agua destilada aforando a 1 L y ajustar el pH a 6.5 con KOH 45%. El amortiguador de enzima puede guardarse en refrigeración y antes del ensayo sacar a temperatura ambiente el volumen que se vaya a necesitar.

Los siguientes reactivos se deben preparar justo antes del ensayo.

GLUCOSA: 100 mM (PM = 180.1)

Disolver 0.0180 g en 1 ml de amortiguador de enzima.

PIRUVATO: 200 mM (PM = 88)

Disolver 0.0176 g en 1 ml de amortiguador de enzima.

NADH: 200 mM (PM = 709.4)

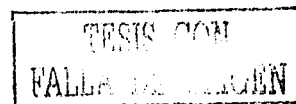
Disolver 0.1419 g en 1 ml de amortiguador de enzima.

TPP (tiaminpirofosfato o cocarboxilasa): 200 mM (PM = 460.8)

Disolver 0.0922 g en 1 ml de amortiguador de enzima.

ADH (alcohol deshidrogenasa): 200 U / 0.1 ml amortiguador

Disolver 0.0007 g en 0.1 ml de amortiguador de enzima.



### Condiciones del cultivo

En un matraz con mamparas de 250 ml agregar 100 ml de medio Schaeffer con  $\text{Cm}^5$ , e inocular de glicerol la cepa H2, incubación a 37°C, 300 rpm durante 20 h.

En un matraz con mamparas de 250 ml agregar 100 ml de medio Schaeffer sin antibiótico, e inocular de glicerol la cepa silvestre *B. subtilis* Hpr, incubación a 37°C, 300 rpm durante 20 h (control negativo).

En un matraz con mamparas de 250 ml agregar 50 ml medio LB sin antibiótico, e inocular la cepa *E. coli* KO11, incubación a 37°C, 300 rpm durante 3-5 hrs (control positivo).

### Obtención del extracto celular

Medir la  $\text{DO}_{600}$  del cultivo, usando como blanco el mismo medio del cultivo. Para KO11, concentrar centrifugando a 10,000 rpm por 6 min, 12.5 DO para cada reacción, desechando el sobrenadante usando una trampa de vacío. Para *B. subtilis*, concentrar centrifugando a 10,000 rpm por 6 min, 22.2 DO para cada reacción, desechando el sobrenadante con la ayuda de una trampa de vacío.

Nota. Si se van a llevar a cabo 11 reacciones para KO11 se pueden concentrar 137.5 DO en un solo paso, en el caso de *B. subtilis* se concentrarían 244.4 DO para 11 reacciones.

Lavar dos veces el paquete celular con 1 ml de amortiguador de permeabilización, resuspender el paquete celular en 400  $\mu\text{l}$  por reacción

Nota. Para 11 reacciones se lavaría con 11 ml de amortiguador de permeabilización cada vez, desechando el sobrenadante con la trampa de vacío, y al final se resuspendería en 4.4 ml de amortiguador de permeabilización.

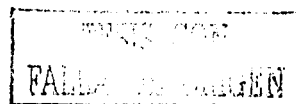
### Permeabilización de las células

Sonicar a una potencia de 10-15 seg cada muestra en 4 ciclos alternando: 1 pulso de 15 seg en baño con hielo y etanol seguido de 1 min. en baño con hielo (aprox. 4°C). Pre-refrigerar la centrifuga a 4°C. Centrifugar 10 min a 13500 rpm y 4°C.

### Ensayo para producir etanol *in vitro*

Tomar 400  $\mu\text{l}$ . de este sobrenadante de la cepa problema para las reacciones A-N.

Reactivos	Sol/St ock mM	Con /Fin mM	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	LL	M	N
Glc	100	5	----	100	----	----	100	----	100	----	100	----	100	----	100	----	100
Piruv	200	10	100	----	100	100	----	100	----	100	----	100	----	100	----	100	----
NADH	200	10	----	----	----	----	----	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
IPP	200	10	----	----	----	100	100	----	----	100	100	100	100	100	100	100	100
ADH	2000 1ml	10 1	----	----	10	----	----	----	----	----	----	10	10	10	10	----	----
Extracto celular			400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	400	----	----	----
Amortu guador enz			1500	1500	1490	1400	1400	1400	1400	1300	1300	1290	1290	1690	1690	1700	1700
Vol tot			2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000



*Condiciones del ensayo*

Cada mezcla de reacción se llevará a cabo en un tubo de ensayo de 10 X 100 tapado con parafilm. El tiempo de reacción será 90 min a temperatura constante de 25°C, 60 rpm. Trabajar cada tubo por duplicado.

*Preparación de la muestra para analizar en el cromatógrafo*

Centrifugar, trasvasar el sobrenadante. Poner en un vial para cromatógrafo 500µL de éste un vial con 500 µL del estándar interno.

## REFERENCIAS

- Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. (1961). Requirement for transformation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 81, 741-746.
- Arbige, M.V. and Picher, W.H. (1989). Industrial enzymology: a look towards the future. *Trends in Biotechnology* 7, 330-335.
- Bailey, J.E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252, 1668-1675.
- Barbosa, M.F.S. and Ingram, L.O. (1994). Expression of the *Zymomonas mobilis* Alcohol Dehydrogenase II (*adhB*) and Pyruvate Decarboxylase (*pdC*) Genes in *Bacillus*. *Current Microbiology* 28, 279-282.
- Beall, D.S., Otha, K., and Ingram, L.O. (1991). Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 38, 296-303.
- Besson, F., Chevanet, C., and Michel, G. (1987). Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. *General Microbiology*, 133, 767-772.
- Brau, B. and Sahm, H. (1986). Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 144, 296-301.
- Conway, T., Osman, Y.A., Konnan, J.I., Hoffmann, E.M., and Ingram, L.O. (1987a). Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Journal of Bacteriology* 169, 949-954.
- Conway, T., Sewell, G.W., Osman, Y.A., and Ingram, L.O. (1987b). Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology* 169, 2591-2597.
- Cruz-Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology* 182, 3072-3080.
- Denner, H.G. and Spiegelmen, G.B. (1987). *Bacillus subtilis* rRNA promoters are growth rate regulated in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 169, 995-1002.
- Espinosa-de-los-Monteros, J., Martinez, A., and Valle, F. (2001). Metabolic profiles and *aprE* expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 379-384.
- Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolivar, F., and Valle, F. (1996). Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 14, 620-623.

Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A.A., Clark, I., Niño, I., Gosset, G., and Martínez, A. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. Accepted in Applied Microbiology and Biotechnology, 2003.

Gold, R.S., Meagher, M.M., Tong, S., Hutins, R.W., and Conway, T. (1996). Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* "production of ethanol" genes in *Lactobacillus casei*. Current Microbiology 33, 260.

Harwood, C.R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. Trends in Biotechnology. 10, 247-256.

Helmann, J.D. (1995). Compilation and analysis of *Bacillus subtilis*  $\sigma^A$ -dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. Nucleic Acids Research 23, 2351-2360.

Hernández Bustos, C. I. Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Tesis de Licenciatura, 98 pag. 2003. Instituto Tecnológico de Zacatepec. Zacatepec, Mor.

Ho, N.W.Y., Chen, Z., and Brainard, A.P. (1998). Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. Applied Environmental Microbiology. 64, 1852-1859.

Hoppner, T.C. and Doelle, H.W. (1983). Purification and kinetic characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 17, 152-157.

Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C.C., Causey, T.B., Martínez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yomano, L.P., York, S.W., Zaldivar, J., and Zhou, S. (1999). Enteric bacterial catalyst for fuel ethanol production. Biotechnology Progress. 15, 855-866.

Ingram, L. O., Alterthum, F., and Conway, T. Ethanol production by *Escherichia coli* strains coexpressing *Zymomonas pdc* and *adh* genes. [5000000]. 1991. U.S.

Ingram, L.O. and Conway, T. (1988). Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology. 54, 397-404.

Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., and Preston, J.F. (1987). Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. Applied Environmental. Microbiology. 53, 2420-2425.

Ingram, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., and York, S.W. (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. Biotechnology Bioengineering. 58, 204-214.

- Jan,J., Valle,F., Bolivar,F., and Merino,E. (2000). Characterization of the 5' subtilisin (aprE) regulatory region from *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology letters 183, 9-14.
- Jan,J., Valle,F., Bolivar,F., and Merino,E. (2001). Construction of protein overproducer strains in *Bacillus subtilis* by an integrative approach. Applied Microbiology and Biotechnology. 55, 69-75.
- Katzen,R., Madson,P.W., Monceaux,D.A., and Bevernitz,K. (1999). Lignocellulosic feedstocks for ethanol production: the ultimate renewable energy source. In The Alcohol Textbook, K.A.Jacques, T.P.Lyons, and D.R.Kelsall, eds. (Nottingham: Nottingham University Press), pp. 107-116.
- Kötter,P. and Ciriacy,M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 38, 776-783.
- Krispin,O. and Allmansberger,R. (1998). The *Bacillus subtilis* AraE protein displays a broad substrate specificity for several different sugars. Journal of Bacteriology 180, 3250-3252.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685.
- Lai,X., Davis,F.C., Hespell,R.B., and Ingram,L.O. (1997). Cloning of cellobiose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase genes: Functional expression in recombinant *Escherichia coli* and identification of a putative binding region for disaccharides. Applied and Environmental Microbiology. 63, 355-363.
- Lee,S.Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology 14, 98-105.
- Lewin, E. (2000). Genes VII. (Oxford University Press), pp. 649-684.
- Lindsay,S.E., Bothast,R.J., and Ingram,L.O. (1995). Improved strains of recombinant *Escherichia coli* for ethanol production from sugar substrates. Applied Microbiology and Biotechnology 43, 70-75.
- Louwrier,A. (1998). Industrial products - the return to carbohydrate-based industries. Biotechnology and Applied Biochemistry. 27, 1-8.
- Mackenzie,K.F., Eddy,C.K., and Ingram,L.O. (1989). Modulation of alcohol dehydrogenase isoenzyme levels in *Zymomonas mobilis* by iron and zinc. Journal of Bacteriology. 171, 1063-1067.
- Maniatis,T., Fritsch,E.F., and Sambrook,J. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Martínez, A. Estrategias de fermentación para la producción de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis*. 1997. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Martínez A., Bolívar F., and Gosset G. (2002). Biotecnología energética sustentable: etanol carburante para el transporte. *Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México*. Número 617, páginas centrales.

Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. (New York: Cold Spring Harbor, N.Y.).

Mironov, A.S., Gusarov, I., Rafikov, R., López, L.E., Shatalin, K., Kreneva, R.A., Perumov, D.A., and Nudler, E. (2002). Sensing Small Molecules by Nascent RNA: A Mechanism to Control Transcription in Bacteria. *Cell* 111, 747-756.

Murray, H.D., Appleman, J.A., and Gourse, R.L. (2003). Regulation of the *Escherichia coli* *rrnB* P2 promoter. *Journal of Bacteriology* 185, 28-34.

Nakano, M.M., Dailly, V.P., Zuber, P., and Clark, D.P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *Journal of Bacteriology* 179, 6749-6754.

Neale, A.D., Scopes, R.K., Kelly, J.M., and Wettenhall, R.E.H. (1986). The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*: purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterization and physiological role. *European Journal of Biochemistry* 154, 119-124.

Nichols, N.N., Dien, B.S., and Bothast, R.J. (2003). Engineering lactic acid bacteria with pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes for ethanol production from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.

Ohta, K., Beall, D.S., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (1991). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 893-900.

Park, S.S., Wong, S.L., Wang, L.F., and Doi, R.H. (1989). *Bacillus subtilis* subtilisin gene (*aprE*) is expressed from a  $\sigma^A$  ( $\sigma_{43}$ ) promoter in vitro and in vivo. *Journal of Bacteriology* 171, 2657-2665.

Parris, T.M. and Kates, R.W. (2003). Characterizing a sustainability transition: Goals, targets, trends, and driving forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 100, 8068-8073.

PEMEX. Petróleos Mexicanos: Anuario estadístico 1999. 1999. México, D.F., PEMEX.

Peschke, U., Beuck, V., Bujard, H., Gentz, R., and Le Grice, S. (1985). Efficient utilization of *Escherichia coli* transcriptional signals in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*. 186, 547-555.

Priest, F.G. (1985). Synthesis and secretion of extracellular enzymes by bacilli. *Microbiology Science* 2, 278-282.



Prodromou, C. and Pearl, L.H. (1992). Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.* 5(8):827-9. *Protein Engineering*. 5, 827-829.

Quintero, R. Estudio de pre-factibilidad técnico-económica del proyecto "Biotecnología energética sustentable: Diversidad genómica e ingeniería de vías metabólicas en la producción de etanol", 2000. México, CONACyT.

Rodríguez, R. L., Tait, J., Shine, J., Bolivar, F., Heyneker, H., Betlach, M., and Boyer, H. W. Characterization of tetracycline and ampicillin resistant plasmid cloning vehicles. 13, 73-78. 1975. Miami winter Symposia. *Molecular cloning in recombinant DNA*.

Rodríguez, R.L. and Tait, R.C. (1983). Recombinant DNA techniques: an introduction. (Massachusetts, USA: Addison-Wesley Publishing Co. Advanced Book Program Reading, Massachusetts, USA), pp. 1-236.

Rudner, R., Chevrestt, A., Buchholz, S.R., and Studamire, B. (1993). Two tRNA gene associated with rRNA operons *rrnD* and *rrnE* in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 175, 503-509.

Saier, M.H., Bromberg, F.G., and Roseman, S. (1973). Characterization of constitutive galactose permease mutants in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 113, 512-514.

Sharma, R.C. and Schimke, R.T. (1996). Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20, 42-44.

Sheehan, J. and Himmel, M. (1999). Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. department of energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnology Progress* 15, 817-827.

Snay, J., Jeong, J.W., and Atai, M.M. (1989). Effects of growth conditions on carbon utilization and organic by-product formation in *B. subtilis*. *Biotechnology Progress* 5, 63-69.

Steinmetz, M. and Richter, R. (1994). Plasmids designed to alter the antibiotic resistance expressed by insertion mutations in *Bacillus subtilis*, through in vivo recombination. *Gene* 142, 79-83.

Stephanopoulos, G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 1, 1-11.

Stülke, J. and Hillen, W. (2000). Regulation of carbon metabolism in *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology*. 54, 849-880.

Talarico, L.A., Ingram, L.O., and Maupin-Furlow, J.A. (2001). Production of the Gram-positive *Sarcina ventriculi* pyruvate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Microbiology* 147, 2425-2435.

Tolan, J.S. and Finn, R.K. (1987a). Fermentation of D-xylose and L-arabinose to ethanol by *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 2033-2038.

Tolan, J.S. and Finn, R.K. (1987b). Fermentation of D-xylose to ethanol by genetically modified *Klebsiella planticola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 2039-2044.

Wooley, R., Ruth, M., Glassner, D., and Sheehan, J. (1999). Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. *Biotechnology Progress* 15, 794-803.

Ye, R., Yang, L.P., and Wong, S.L. (1996). Construction of protease deficient *Bacillus subtilis* strains for expression studies: Inactivation of seven extracellular proteases and the intracellular IonA protease. *Proceedings of the International Symposium on Recent Advances in Bioindustry* 25-26.

Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., and Picataggio, S. (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267, 240-243.